

На правах рукописи

КРАСНОВ

Илья Александрович

**РАЗРАБОТКА МЕТОДИК И СИСТЕМ ВВОДА НАНОКОЛИЧЕСТВ
ОБРАЗЦОВ В МАСС-СПЕКТРОМЕТР ДЛЯ РЕШЕНИЯ ЗАДАЧ ПОИСКА И
ИДЕНТИФИКАЦИИ АДДУКТОВ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ
СОЕДИНЕНИЙ С СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ**

01.04.01 – ПРИБОРЫ И МЕТОДЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ФИЗИКИ

02.00.02 – АНАЛИТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата технических наук

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ
2010

**Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Институте
аналитического приборостроения РАН**

Научные руководители:

кандидат химических наук,
доктор биологических наук

Подольская Екатерина Петровна
Гончаров Николай Васильевич

Официальные оппоненты:

доктор физико-математических наук
профессор
доктор химических наук,
профессор

Галль Николай Ростиславович
Зенкевич Игорь Георгиевич

Ведущая организация:

ГОУ ВПО Санкт-Петербургский государственный политехнический университет

**Защита состоится «25» июня 2010 г. В 11-00 часов на заседании
диссертационного совета Д 002.034.01 при Учреждении Российской академии
наук Институте аналитического приборостроения РАН по адресу 190103,
Санкт-Петербург, пр. Рижский, д. 26.**

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института
аналитического приборостроения РАН по адресу: Санкт-Петербург, пр. Рижский,
д. 26.

Автореферат разослан «24» мая 2010 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета

Кандидат физико-математических наук



А.П.Щербаков

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы.

Фосфорорганические соединения (ФОС) используются как пестициды в сельском хозяйстве, антигельминты в медицине, добавки к гидравлическим жидкостям и масло для реактивных двигателей в авиации. Эти соединения токсичны для насекомых, рыб, птиц, млекопитающих и человека. ФОС также производили для вооруженных сил многих стран мира как химическое оружие, которое в настоящее время уничтожается в соответствии с конвенцией о запрещении химического оружия.

При определении степени и самого факта воздействия на организм ФОС наиболее простыми и распространенными являются биохимические методы измерения активности холинэстераз [1]. Однако эти методы не являются специфичными, т.е. не дают информации о том, что именно послужило причиной снижения активности холинэстераз – отравление ФОС, другим веществом или заболевание нетоксикологического генеза. В случае, когда имеются веские основания полагать, что причиной снижения активности холинэстераз является отравление ФОС, часто необходимо определить, какое именно соединение вызвало отравление. Одним из стандартных методов качественного определения некоторых продуктов распада ФОС в организме (например, метилфосфоновой кислоты в случае поражения зарин, зоманом или веществом типа VX) является хромато-масс-спектрометрия в режиме статического парофазного анализа с предварительной дериватизацией. Однако этот метод имеет низкую чувствительность и предполагает многоэтапную и трудозатратную пробоподготовку, что является его существенным недостатком. Еще одна существующая методика по определению возможных модификаций белков фосфорорганическими соединениями предполагает стадию реактивации, она также очень трудоемка, но главное - она не позволяет с большой точностью определить, какое именно соединение является причиной отравления, поскольку идентифицируется только продукт гидролиза (реактивации). Поэтому в аналитической химии существует необходимость разработки новых, более удобных и эффективных методик, которые позволяли бы определять ФОС без стадии их предварительного элиминирования в смесях, обогащенных искомыми пептидами. Альтернативным подходом для идентификации воздействия ФОС на организм может служить поиск белков и пептидов внутренних сред организма, модифицированных токсичным агентом либо его метаболитами, причем наиболее удобным объектом исследования представляется сывороточный альбумин. Альбумин является мажорным компонентом белковой фракции крови, это важнейший белок-переносчик, способный транспортировать соединения различной химической природы, что дает основания предполагать образование аддуктов с токсичными агентами, в том числе с ФОС.

Однако поиск пептидов, модифицированных фосфорсодержащими соединениями, затруднен малым числом сигналов модифицированных пептидов в спектре по отношению к немодифицированным и их низкой интенсивностью. В связи с этим, требуется тщательная разработка новых подходов и методик обогащения пептидных смесей фосфорсодержащими пептидами с использованием таких методов как аффинная и металл-аффинная хроматография.

Следует отметить, что основной проблемой при исследовании биологических проб является малое количество анализируемого вещества, и

несовершенство классических систем ввода пробы, используемых в отечественном масс-спектрометрическом оборудовании. Разработка новых систем на основе таких методов как высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) и нано-электроспрей (нано-ЭС) является необходимым условием для успешных исследований в области модификаций белков и пептидов.

В настоящее время существуют решения по созданию комплексов нано-ЖХ-ЭС-МС, как в нашей стране, так и за рубежом. Эти комплексы оказываются либо слишком дороги, либо обладают рядом недостатков, к которым относятся размывание пробы после элюирования ее с колонки и высокая скорость потока (100-150 мкл/мин), требуемая для успешного хроматографического анализа, но усложняющая работу источника ионов ЭС.

На сегодняшний день единственным отечественным комплексом, сочетающим жидкостной хроматограф и масс-спектрометр, снабженный источником ионов ЭС является тандем Милихром А2 (Институт Хроматографии, Новосибирск) – МХ 5310 (ИАНП РАН СПб). Данный комплекс позволяет успешно анализировать сложные смеси при условии, что в пробе содержится примерно 200 пкМ анализируемого вещества, при этом минимальная скорость потока элюента, обеспечивающая эффективное разделение соединений, составляет 150 мкл/мин. Для того чтобы получить качественное распыление такого потока, требуется нагрев спутного газа в источнике ионов до 150°C. Все перечисленное значительно усложняет процедуру анализа и не позволяет проводить анализ образцов, содержащих единицы пикамоль соединений.

Таким образом, наряду с разработкой новых методов по обнаружению и идентификации аддуктов альбумина с ФОС, возникает необходимость создания отечественного масс-спектрометрического оборудования, которое позволяло бы эффективно проводить анализ сложных биологических проб, отличалось простотой в использовании, было экономично в расходных материалах. Примером таких систем могут быть сочетание источников ионов нано-ЭС с времяпролетным масс-спектрометром и комплекс нано-ЖХ-ЭС-МС.

Цели и задачи исследования.

Цель настоящей работы – разработать системы ввода нанокolicеств жидких образцов в масс-спектрометр и методик определения аддуктов фосфорорганических соединений с сывороточным альбумином на примере вещества типа VX (RVX) и параоксона.

Для достижения цели были поставлены и решены следующие задачи:

1. Разработать систему ввода нанокolicеств пробы в отечественный масс-спектрометр МХ-5310;
2. Разработать методику обогащения образцов фосфорсодержащими пептидами, с использованием металл-аффинных сорбентов;
3. Разработать методику, позволяющую обнаруживать аддукты белков с ФОС в биопробах. Провести апробацию методик обнаружения аддуктов ФОС сывороточных альбуминов с помощью комплекса разработанных систем ввода пробы и МХ-5310;
4. Обнаружить и идентифицировать триптические пептиды сывороточного альбумина, содержащие модификации ФОС. Методом тандемной масс-спектрометрии, определить точные сайты модификации белков фосфорорганическими соединениями.

Научная новизна работы.

Предложена и реализована новая система ввода нанокolicеств анализируемых соединений в масс-спектрометр, совмещающая преимущества ВЭЖХ хроматографии и метода ионизации наноэлектроспрей, в которой колонка является наноэмиттером. Показана возможность использования нового комплекса наноЭС-МС для решения задач связанных с выявлением аддуктов белков крови с фосфорорганическими соединениями.

Впервые с помощью метода металл-аффинной хроматографии проведено обогащение образцов пептидами, модифицированными фосфорорганическими соединениями.

Предложена и впервые разработана универсальная методика выделения фосфорсодержащих пептидов из биологических образцов.

Впервые обнаружены и идентифицированы аддукты сывороточного альбумина человека с RVX и сывороточного альбумина крысы с параоксоном.

Практическая значимость работы:

Система ввода нанокolicеств анализируемых соединений в масс-спектрометр может быть состыкована с масс-спектрометром и применена в протеомных исследованиях.

Разработанная методика поиска аддуктов сывороточных альбуминов фосфорорганическими соединениями может быть использована при разработке новых методик поиска маркеров интоксикации ФОС.

Основные положения, выносимые на защиту:

Источник ионов наноЭС, совмещенный с системой ввода на основе наноЖХ для масс-спектрометра MX-5310, колонка-наноэмиттер. Результаты экспериментального сравнения разработанного источника ионов с имеющимся отечественным приборным комплексом Миллихром А02 – MX-5310.

Методика обогащения образцов пептидами, содержащими модификации ФОС с помощью металл-аффинной хроматографии.

Универсальная методика, позволяющая обнаруживать аддукты ФОС с белками в биологических образцах.

Методика определения модификации ФОС, включающая детектирование ранее идентифицированных аддуктов с помощью разработанных систем.

Результаты экспериментального исследования сывороточных альбуминов и сывороток крови крысы и человека, обработанных соединениями, входящими в состав группы ФОС. Идентификация аддуктов сывороточного альбумина человека с RVX и сывороточного альбумина крысы с параоксоном.

Апробация работы:

Основные результаты диссертационной работы докладывались и обсуждались на научных семинарах ИАиП РАН, на 9 симпозиуме, посвященном защите от химического и биологического оружия (Гетеборг, Швеция, 2007), 5 российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Казань, Россия, 2009), 5 съезде общества биотехнологов России им. Ю.А.Овчинникова (Москва, Россия, 2008), 56 конференции Американского масс-спектрометрического общества (Денвер, США, 2008), на конференциях: «Фундаментальная наука и клиническая медицина» (Санкт-Петербург, Россия, 2007), "МЕТРОМЕД - 2007" (Санкт-Петербург, Россия, 2007), «Химическая безопасность Российской Федерации в современных условиях» (Санкт-Петербург, Россия, 2010).

Публикации:

По материалам диссертации опубликовано 15 печатных работ, из них 3 – в реферируемых журналах, 1 – монография, 1 – методические рекомендации, 10 статей и тезисов по материалам научно-практических конференций.

Структура и объем работы:

Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения и списка литературы. Она изложена на 115 страницах и включает 44 рисунка, 9 таблиц и 101 наименование списка литературы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы исследования, сформулирована цель работы, обсуждены новизна и практическая значимость работы, приведены основные положения, выносимые на защиту.

Глава 1 носит обзорный характер. Она посвящена обзору имеющихся в литературе публикаций по принципам работы масс-спектрометрических приборов и их узлов, в частности, источников ионов с мягкими методами ионизации, методам идентификации белков, в том числе метод тандемной масс-спектрометрии, методам аффинной и металл-аффинной хроматографии, исследуемым фосфорорганическим соединениям (ФОС) и особенностям строения сывороточных альбуминов человека и крысы.

В §1.1 изложены основные аспекты масс-спектрометрического метода, имеющие отношение к данной работе. Кратко описывается история возникновения масс-спектрометрического метода и общее описание принципов работы масс-спектрометров. Приведено описание основных источников ионов на сегодняшний день. Особенностью источников мягкой ионизации является возможность получения молекулярных ионов термолabileных соединений. Необходимость в источниках мягкой ионизации возникла с развитием таких наук как биохимия, биомедицина, протеомика. Электроспрей - широко используемый метод мягкой ионизации в биомедицине. Метод был разработан в ИАнП АН СССР в восьмидесятые годы Л.Н. Галль с сотрудниками [2]. Этот метод основан на распылении образца под действием электрического поля. Метод ионизации с помощью лазерной десорбции связанной с матрицами (MALDI) основан на воздействии импульсами лазерного излучения на матрицу с анализируемым веществом. Матрица представляет собой материал, задачей которого является ионизация анализируемого вещества под действием лазерного излучения.

Также в данном разделе приводится сравнение основных методов ионизации термолabileных соединений.

В § 1.2 описываются основные химические и физиологические свойства фосфорорганических соединений, используемых в различных областях промышленности и агротехники. Также разбирается механизм модификации белков фосфорорганическими соединениями. Фосфорорганические пестициды являются наиболее распространенными из инсектицидов. Применяются различные типы пестицидов с различной степенью токсичности. В организме млекопитающих эти соединения подвергаются изменениям, в результате которых их токсичность может возрастать.

В § 1.3 Рассматриваются свойства основных исследуемых белков: сывороточных альбуминов человека и крысы, которые могут содержать модификации фосфорорганическими соединениями. Известно, что многие ФОС

способны образовывать прямые аддукты с этим белком, что может быть зафиксировано методами масс-спектрометрии [3,4]. Выявление сайтов модификации альбумина ФОС может привести к обнаружению новых биомаркеров интоксикации ФОС и разработке новых методик установления факта интоксикации. Альбумин человека имеет в своем составе 18 тирозинов и 24 серина, при этом только 5 тирозинов и 2 серина могут ковалентно связываться с большинством ФОС, однако на сегодняшний день нет информации о том, какие аддукты способен образовывать сывороточный альбумин человека с RVX, а также способен ли сывороточный альбумин крысы образовывать аддукты с ФОС.

В § 1.4 рассматриваются методы установления первичной последовательности белков, а также приемы, позволяющие определить различные модификации аминокислот в составе белка.

Первым методом определения последовательности аминокислот стало секвенирование пептидов по Сэнгеру. Суть его заключалась в последовательном отщеплении N-концевых аминокислот в результате реакции пептида с 2,4-динитрофторбензолом. Их дальнейшая хроматографическая идентификация осуществлялась путем сравнения со стандартными образцами. В настоящее время более удобным и потому часто используемым методом определения первичной структуры является деградация пептидов по Эдману, включающая анализ фенилтиогидантоиновых производных аминокислот. Тем не менее, метод деградации пептидов по Эдману обладает значительными недостатками. Прежде всего, это требование высокой степени чистоты анализируемого вещества, сравнительно большие количества образца и высокая стоимость анализа.

Метод идентификации белков по «отпечаткам пептидных масс» - РМФ (Peptide Mass Fingerprint). Суть метода состоит в том, что для каждого белка с известной последовательностью рассчитываются массы пептидов – продуктов теоретического ферментативного гидролиза с учетом указанного пользователем числа пропущенных сайтов гидролиза и возможных модификаций. Далее, фактический масс-спектр продуктов гидролиза определяемого белка сравнивается со всеми теоретическими спектрами белков и выявляется белок, у которого степень соответствия наивысшая. Для решения этой задачи разработан ряд систем программного обеспечения, таких как Mascot, Sequest, X!Tandem, Protein Prospector.

Для идентификации белков в смесях, по сложности превышающих аналитические возможности метода РМФ и секвенирования по Эдману, применяется метод тандемной масс-спектрометрии. С помощью данного метода становится возможным определение не только последовательности аминокислот в составе белка, но и конкретных модификаций каждой из них. Каждая из модификаций проявляется в масс-спектрах за счет характерного изменения массы аминокислотного остатка. Во фрагментных спектрах это выглядит как смещение серий пиков на определенную величину, соответствующую молекулярной массе присоединенной функциональной группы.

В § 1.5 рассматриваются принципы металл-аффинной хроматографии. В основе этого метода лежит различное сродство белков к ионам некоторых металлов. Ионы металлов хелатируют полидентантными лигандами, иммобилизованными на вспомогательной подложке (силикагель, полимеры агароза, сефароза, сшитый сополимер полистирола и дивинилбензола). Образование комплекса иона металла и некоторых аминокислотных остатков или

модификаций (например, фосфатных групп), находящихся на поверхности молекулы белка, легко обратимо. Следовательно, иммобилизованные ионы металлов можно использовать как сорбент, причем разрушить комплекс можно в мягких, денатурирующих условиях. Взаимодействие с белками и пептидами строго рН-зависимое, поэтому связанные пептиды можно элюировать, изменяя рН, уменьшая ионную силу буфера или используя другие хелатирующие агенты, такие как ЭДТА или имидазол. "Мишенями" иммобилизованных ионов Fe^{3+} являются аспаргиновая и глутаминовая кислоты, тирозин или фосфорилированные серин, треонин или тирозин.

Глава 2 посвящена методическому этапу работы. В главе описываются использованные в работе методики, а также этапы разработки узлов оборудования и методик для обнаружения и идентификации фосфорсодержащих пептидов.

В § 2.1 приведено описание метода аффинной хроматографии с помощью коммерчески доступных колонок Augum (serum protein mini kit, Affi-Gel Blue/Affi-Gel protein A) для выделения препаратов сывороточных альбуминов из цельных сывороток крови крысы и человека. Оценка чистоты полученных препаратов проводилась с помощью метода разделения белков SDS-электрофореза в полиакриламидном геле. Результат оценки показал применимость данного вида аффинной хроматографии для получения чистых препаратов альбумина.

В § 2.2 представлен метод ферментативного гидролиза исследуемых белков в присутствии трипсина. Описываются методики проведения трипсинолиза в растворе и полиакриламидном геле. Внесенные нами изменения в общепринятые методики касались режима добавления трипсина к образцам.

В § 2.3 описывается работа методики обогащения образцов фосфорсодержащими пептидами с помощью коммерчески доступных металл-аффинных сорбентов, содержащих ионы $Fe(III)$.

В § 2.4 описаны условия масс-спектрометрических экспериментов, применявшихся для поиска пептидов альбуминов, несущих модификации ФОС, а также методы обработки полученных масс-спектрометрических данных.

В § 2.5 представлена система прямого ввода пробы наноЭС. Электрораспылительный узел был собран на основе коммерчески доступных, а также, произведенных в нашей лаборатории блоков. В состав узла входили: трехкоординатная система позиционирования эмиттера, боросиликатные эмиттеры с внутренним диаметром 1 мкм фирмы «Прохеон» с электропроводящим палладий-золотым покрытием, токоизолирующие фторопластовые элементы, ограничивающее сопротивление (50 МОм), заземление, медно-бериллиевый зажим для игл, передающий на иглу высокое напряжение, необходимое для электрораспыления. Для удобства настройки положения эмиттера относительно сопла была установлена видеокамера Navitar Lu100m. Подаваемое на эмиттер напряжение изначально подбиралось исходя из метода расчета потенциалов распыления, предложенного Смитом и соав. в 1986 г [5]. Электрораспылительный потенциал для данной установки составил 2400 В.

Распыление с конца иглы происходило за счет электроосмотических процессов.

В § 2.6 описывается разработка систем ввода нанокolicеств образцов в масс-спектрометр. Представлен метод получения ВЭЖХ микроколонок для аналитической системы ввода нанокolicеств пробы в масс-спектрометр МХ-5310 и описание самой установки. Насадочные колонки получали набивкой кварцевых

капилляров (TSP075375, Polimicro Technologies) с ID=75 мкм и OD=375 мкм готовым коммерческим сорбентом Zorbax C18 (размер частиц 5-9 мкм). Для удерживания сорбента в колонках применялось вытягивание конца капилляра под воздействием высокой температуры. Контроль диаметра выходящего отверстия колонки проводился с помощью микроскопа и составлял не более 3 мкм. Перед использованием сорбент промывали 3 раза смесью вода-ацетонитрил (50:50) для удаления частиц менее 5 мкм.

Установка для набивки колонок сорбентом представляла собой металлическую емкость, в которую подводился воздух под давлением 2 МПа. В это устройство помещалась стеклянная пробирка, содержащая взвесь сорбента в 50% растворе ацетонитрила в воде. Капилляр погружался входным концом в виалу с взвесью сорбента, с помощью специального уплотнителя (РЕАК) колонка зажималась в выходящем отверстии устройства. Под действием высокого давления жидкость с сорбентом поступала через колонку вне установки, при этом частицы сорбента задерживались вытянутой частью капилляра, происходила набивка колонки. Полученная насадочная колонка промывалась 50%-ым раствором ацетонитрила в воде в течение 30 минут при скорости потока 200 мкл/мин и устанавливалась в систему ввода пробы в масс-спектрометр МХ-5310.

Система ввода пробы состояла из градиентного насоса со скоростью подачи растворителя 10 мкл/мин, в качестве подвижной фазы использовались: А – 0.25% HCOOH в воде и Б – 0.25% HCOOH в ацетонитриле; капилляр для отвода избыточного потока растворителя; капилляр объемом 0,4 мкл для ввода образца в систему. Подведение напряжения порядка 4 кВ прямо в растворитель, подаваемый на колонку, обеспечивало распыление с эмиттера колонки на сопло масс-спектрометра МХ-5310.

Модельный хромато-масс-спектрометрический анализ проводили как с использованием описанной установки (нанохроматографическая система – МХ5310) так и с использованием комплекса Милихром А02-МХ5310. В качестве модельного объекта исследования был выбран триптический гидролизат сывороточного альбумина быка (BSA). Количества наносимого на колонки гидролизата составили 200 пкМ для комплекса Милихром А02-МХ5310 и 1.8 пкМ для комплекса нанохроматографическая система – МХ5310. При использовании комплекса нанохроматографическая система – МХ5310 спутный газ не подавался.

Анализ проводился в течение 10 минут в паре растворителей ацетонитрил-вода с линейным увеличением концентрации ацетонитрила в элюенте с 0% до 70%.

Спектры регистрировались с интервалом в 1с в течение всего процесса хроматографирования. Управление настройками и запись масс-спектров проводили с помощью программы «TOF control». Масс-спектры записывали с помощью программы «TOF+» (программы разработаны в лаборатории биомедицинской масс-спектрометрии ИАиП РАН). При этом, регистрировалась величина общего ионного тока в зависимости от времени. Полученный график рассматривается как хроматограмма (зависимость интенсивности общего ионного тока от времени).

Обработку спектров проводили при помощи программного обеспечения «TOF explorer v0.2» (ИАиП РАН). После определения центра масс масс-спектрометрических пиков к полученным данным был применен алгоритм разрешения зарядных и изотопных распределений IPeX (ИАиП РАН).

Качество проведенного масс-спектрометрического анализа оценивали по степени идентификации BSA методом PMF, являющегося наиболее

распространенным при идентификации белков. Поиск в базе SwisProt осуществляли с помощью программного комплекса MASCOT (Matrix Science, Великобритания), при этом использовали следующие параметры поиска: точность определения массы – 50 ppm (parts per million, миллионная доля); возможная модификация – окисление метионина; фиксированная модификация цистеина йодацетамидом.

Глава 3 посвящена описанию результатов экспериментальной работы с использованием разработанных методик.

В § 3.1 описано исследование сывороточного альбумина человека, модифицированного RVX. Работа проводилась в рамках выполнения НИР «Применение методов масс-спектрометрии для идентификации вероятных маркеров интоксикации ОБ». Основными объектами исследования были RVX и сывороточный альбумин человека.

Нами было сделано предположение, что RVX способен образовывать аддукты с альбумином человека. Для проверки правильности сделанного предположения и определения целесообразности дальнейшей работы был получен масс-спектр коммерческого сывороточного альбумина до его взаимодействия с RVX и после. Реакцию взаимодействия альбумина с RVX проводили в НИИ ГПЭЧ (концентрация RVX составляла 1 мкг/мл, концентрация альбумина - 1 мг/мл). Линейный масс-спектр показал, что масса молекулы белка увеличилась примерно на 300-500 Да, что может соответствовать 2-3 присоединенным остаткам RVX ($-P(O)(OCH_2CH(CH_3)_2)CH_3$, изменение массы белка на один присоединенный остаток RVX составляет 134.06 Да).

Затем был проведен триптический гидролиз контрольного и модифицированного альбуминов, получены соответствующие масс-спектры, которые сравнивались между собой с целью выявления сигналов модифицированного альбумина, имеющих заданную разницу масс с пептидами из контрольного спектра.

Так, в спектре были обнаружены сигналы, которые могли бы принадлежать пептидам альбумина, модифицированным RVX: пептид YTKK с MH^+ 673.37 Да, модифицированный остатком RVX по Y-411, а также пептид HPYFYAPELLFFAK с MH^+ 1876.87 Да с возможными сайтами присоединения по Y-148 и Y-150. Исследованию последнего было уделено особенное внимание, так как имеется информация [6] о присоединении по Y-411 остатков некоторых фосфорорганических соединений, в то время как данных о возможном модифицировании пептида, содержащем Y-148 и Y-150, на момент выполнения работы не было. Для идентификации был проведен МС-МС анализ, который показал, что фрагментный масс-спектр действительно принадлежит пептиду сывороточного альбумина с аминокислотной последовательностью HPYFYAPELLFFAK (Рисунок 1), содержащему модификацию остатком RVX. По той же схеме был исследован сигнал с MH^+ 673.421 Да. Сигнал пептида с последовательностью YTKK, содержащего модификацию остатком RVX отсутствует в контрольном спектре и присутствует в спектре гидролизата альбумина, модифицированного RVX. МС-МС анализ показал, что действительно в образце содержится пептид с указанной последовательностью, модифицированный по Y-411.

Следующим этапом работы стал поиск обнаруженных пептидов в гидролизате сыворотки крови человека, к которой *in vitro* был добавлен RVX (1 мкг

RVX добавлялся к 1 мл сыворотки). Процедура проводилась сотрудниками НИИ ГПЭЧ).

Несмотря на то что сывороточный альбумин является мажорным компонентом сыворотки крови, в спектре присутствует значительное количество сигналов, в том числе и мажорных, к нему не относящихся. Тем не менее, в спектре был обнаружен сигнал с MH^+ 1876.87 Да, соответствующий пептиду $HPYFY_{RVX}APELLFFAK$, что подтвердил проведенный МС-МС анализ.

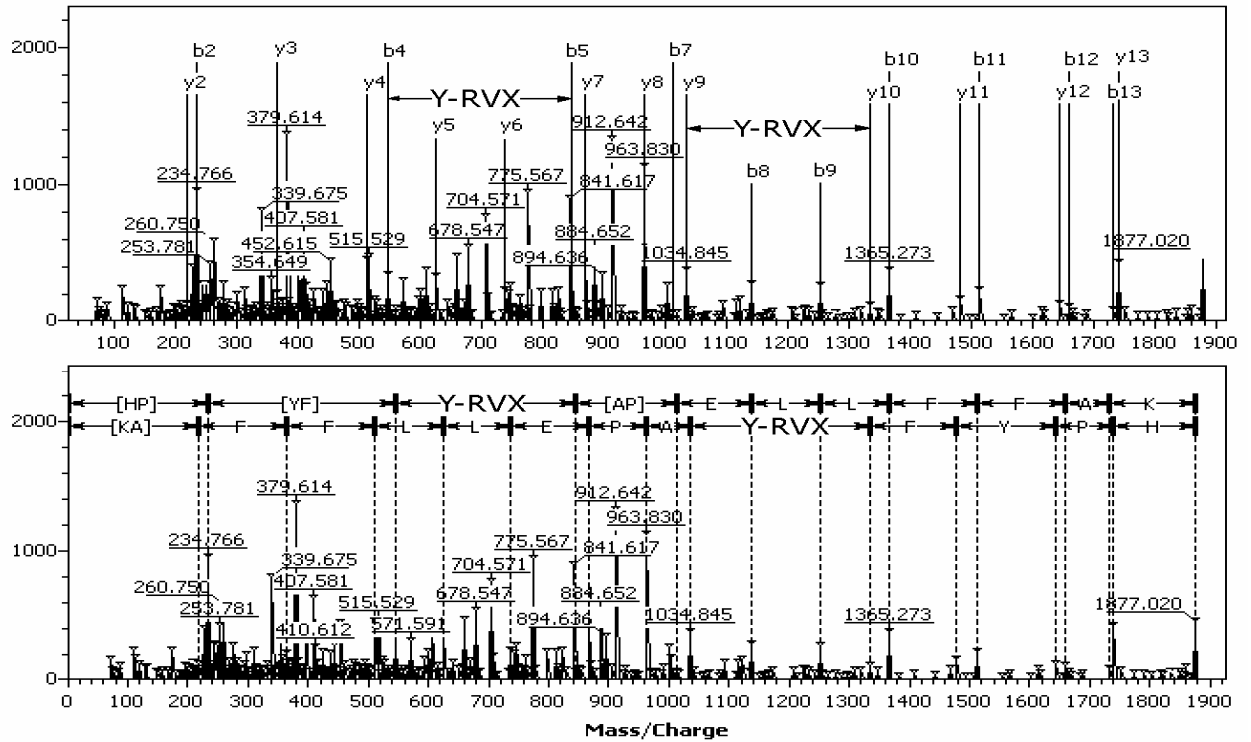


Рисунок 1 - МС-МС-спектр пептидов $HPYFYRVXAPELLFFAK$ и $HPYRVXFYAPELLFFAK$ с MH^+ 1876.87 Да, принадлежащих сывороточному альбумину человека и модифицированных RVX по тирозину-150. (MALDI-TOF-TOF).

Таким образом, было показано, что RVX способен образовывать прямые аддукты с альбумином крови человека. Были выявлены и идентифицированы пептиды сывороточного альбумина человека $HPYFY_{RVX}APELLFFAK$ и $Y_{RVX}TKK$ и показано, что в сыворотке крови с добавлением RVX *in vitro* обнаруживается только пептид $HPYFY_{RVX}APELLFFAK$.

Однако, стоит отметить, что конечная концентрация RVX в сыворотке крови при добавлении *in vitro* достаточно высокая и не может быть достигнута при воздействии RVX *in vivo*. К тому же, несмотря на то что альбумин является мажорным компонентом плазмы и сыворотки крови, остальные присутствующие в них белки мешают анализу и получению достоверных результатов, увеличивая в несколько раз количество триптических пептидов в образце при гидролизе. Кроме того, известно, что обычно количество сигналов модифицированных пептидов в спектре меньше, чем не модифицированных, а интенсивность сигналов модифицированных пептидов значительно ниже. Следовательно, необходима разработка методики, позволяющая обогащать образцы пептидами,

модифицированными остатками ФОС. Для разработки такой методики были выбраны следующие модельные объекты:

1. Параоксон - в качестве ФОС. Параоксон является инсектицидом, при этом он менее токсичен.

2. Сывороточный альбумин крысы – в качестве белка. Этот выбор обусловлен возможностью применения полученных данных для дальнейших разработок методик для поиска аддуктов в образцах, полученных от крыс после воздействия на них параоксоном *in vivo*.

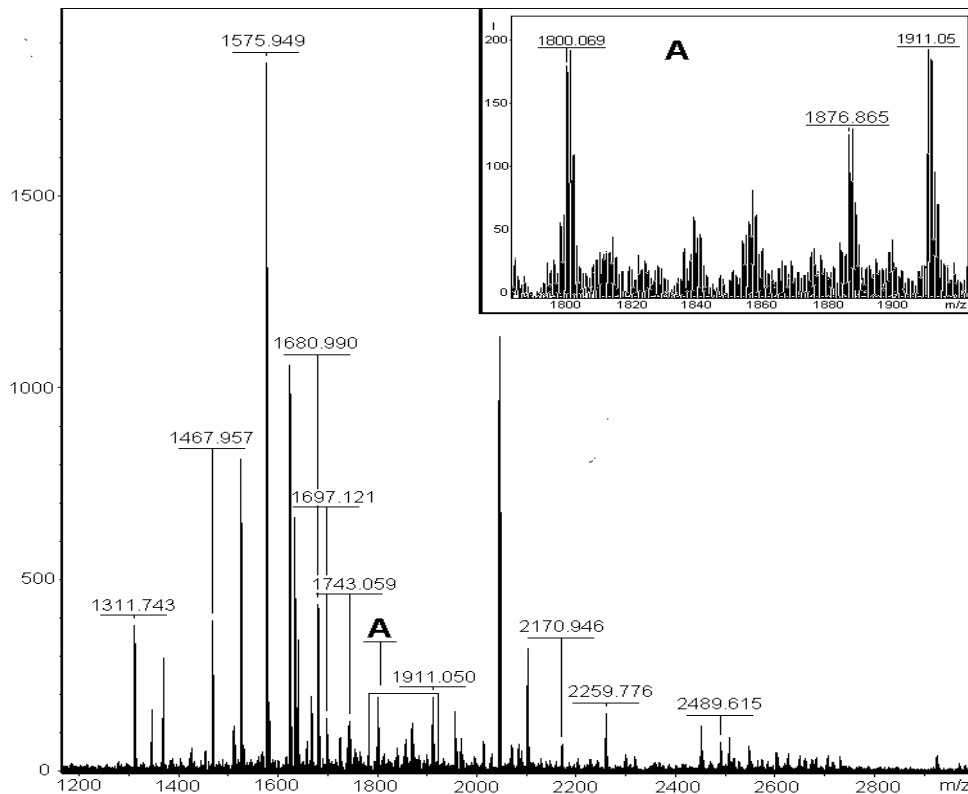


Рисунок 2 – Масс-спектр гидролизата высокомолекулярной фракции сыворотки крови человека. А. Фрагмент масс-спектра, включающий сигнал пептида $HPYFY_{RVX}APELLFFAK$.

В § 3.2 приведены экспериментальные данные, полученные в результате отработки методик обогащения проб пептидами сывороточного альбумина крысы, модифицированного остатком параоксона ($-P(O)(OC_2H_5)_2$, изменение массы модифицированного пептида – 136.03 Да на один остаток параоксона).

На сегодняшний день не существует методики, которая позволяла бы выделить из образцов пептиды, модифицированные остатками ФОС, но существуют сорбенты для обогащения биологических образцов фосфорилированными пептидами. Одним из таких методов является металл-аффинная хроматография. Мы предположили, что с помощью металл-аффинной хроматографии также могут быть выделены и пептиды, модифицированные остатками ФОС. Для проверки предположения был проведен триптический гидролиз с последующей металл-аффинной хроматографией с использованием сорбента, содержащего Fe^{3+} . В методике металл-аффинной хроматографии была проведена оптимизация условий элюирования фосфорсодержащих пептидов с помощью ступенчатого изменения pH элюента. Полученный элюат

концентрировался с помощью вакуумного испарителя, после чего проводился масс-спектрометрический анализ. В масс-спектре было обнаружено 2 сигнала с MH^+ 2096.085 Да и MH^+ 2196.069 Да, которые могут принадлежать пептидам альбумина, модифицированным параоксоном. Для обоих пептидов был проведен МС-МС анализ, который показал, что присоединение остатка параоксона произошло по Y-411 в пептиде YTQKAPQVSTPTLVEAAR и по Y-150 в пептиде RHPYFYAPELLYYAEK. Эти данные согласуются с результатами эксперимента с человеческим сывороточным альбумином человека.

В § 3.3 описаны основные стадии разработки универсальной методики выделения фосфорсодержащих пептидов из биологических образцов, и приведены экспериментальные данные по обнаружению идентифицированных аддуктов в сыворотке крови крысы. Предложенная методика включает следующие стадии: выделение альбумина из сыворотки крови методом аффинной хроматографии (при необходимости контроль чистоты выделенного альбумина осуществляется посредством SDS гель-электрофореза в полиакриламидном геле); ферментативный гидролиз белка с трипсином (при необходимости контроль прохождения гидролиза осуществляется при помощи МС-анализа гидролизата, также на этой стадии можно проводить предварительный поиск модифицированных пептидов); обогащение образца фосфорсодержащими пептидами с использованием металл-аффинной хроматографии на сорбентах, содержащих Fe^{3+} ; МС-анализ пептидов после металл-аффинной хроматографии (при необходимости идентификация модифицированных пептидов методом tandemной масс-спектрометрии).

При разработке предложенной методики в качестве образца использовали сыворотку крови крысы, модифицированную параоксоном *in vitro*. В результате проведенного эксперимента было выяснено, что, как и в случае сыворотки человека, в масс-спектре был обнаружен только один сигнал, принадлежащий пептиду альбумина, модифицированного остатком ФОС, а именно пептид RHPYFYRVXAPELLYYAEK, модифицированный по Y-150. Следует отметить, что предложенная методика является универсальной. На стадии выделения белка может быть использован аффинный сорбент для любого белка, представляющего интерес, а в качестве объекта исследования может быть использована не только сыворотка крови, но также цитоплазматический или ядерный лизат, лимфа и т.д.

В § 3.4 описаны основные характеристики узла наноЭС. Нами был собран блок источника ионов для масс-спектрометра MX5310 наноэлектроспрей на основе коммерчески доступных и произведенных на базе лаборатории Биомедицинской масс-спектрометрии

Для сравнения эффективности ионизации блока распыления наноЭС с эффективностью штатного блока электрораспыления были получены спектры тестового соединения резерпина в концентрации 10^{-5} М. Результаты такого сравнения приведены в таблице 1.

Была подтверждена эффективность источника ионов наноЭС. При снижении расхода пробы на 2 порядка (с 5 мкл/мин до 50 нл/мин) наблюдается усиление сигнала исследуемого соединения в 4 раза по сравнению со штатным электроспрейным источником на базе MX-5310, что является следствием конструктивных отличий. Такое повышение эффективности источника ионов позволило анализировать пробы, содержащие единицы пикограмм искомого соединения, что сопоставимо с показателями современных зарубежных масс-

спектрометров, с помощью которых была проведена основная аналитическая работа по идентификации модифицированных ФОС пептидов альбумина.

Таблица 1 - Сравнительные характеристики источников ионов ЭС и наноЭС для раствора резерпина (C=6,9 мг/л). Основные параметры масс-спектрометра MX-5310 идентичны, напряжения электрораспыления – 3200 В для штатного источника ионов, 2400 В для источника ионов «наноспрэй».

	ESI	nano-ESI
Расход растворов	5 мкл/мин	50-100 нл/мин
Отношение сигнал/физический шум при 100000 единичных выталкивающих импульсов	950	4337
Отношение сигнал/химический шум при 100000 единичных выталкивающих импульсов	380	1734
Время анализа до достижения соотношения сигнал/шум 10000	~170 сек.	~ 40сек
Количество анализируемого в-ва введенного в прибор (до достижения соотношения сигнал/шум 10000)	$6,1 \cdot 10^{-5}$ мг	$1,3 \cdot 10^{-7}$ мг

В § 3.5 приведены данные экспериментального сравнения разработанной системы ввода пробы наноЖХ-ЭС с существующим приборным комплексом Миллихром А02 – MX-5310. Для выяснения основных параметров полученных капиллярных колонок, входящих в состав системы ввода наноконцентрации пробы, был проведен тестовый хромато-масс-спектрометрический анализ смеси триптических пептидов BSA при помощи комплексов нанохроматографическая система – MX 5310 и Милихром А02- MX 5310. В первую очередь проводилось сравнение полученных масс-спектрометрических данных по степени характеристики исследуемого белка.

Качество анализа, проведенного с помощью комплекса нанохроматографическая система – MX5310 превышает качество анализа на комплексе Милихром А02-MX5310, в частности, степень идентификации BSA ($-\log P$, где P – вероятность, что полученный результат является случайным событием) возрастает с 114 до 197. Затем, из числа пептидов, отнесенных к BSA, были выбраны те, которые надежно воспроизвелись в обоих экспериментах. Из хроматограммы общего ионного тока были выделены пики, соответствующие выходу каждого выбранного пептида (Рисунок 3), и затем для каждого пика рассчитывались основные характеристики используемых колонок, такие как времена удерживания пептидов (t_r), ширина пиков на полувысоте (W_h). Из их значений было рассчитано число теоретических тарелок (ЧТТ) и высота, эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ), для капиллярной колонки. Эти данные сравнивались с данными стандартных колонок ВЭЖХ с обращенной фазой.

В частности, сравнение проводилось с колонками Prontosil 120-5C18 (2/75 мм, зернение сорбента 5мкм), поставляющимися к хроматографу Милихром А02

$N=5.45(tr/W_h)^2$, где N – число теоретических тарелок (ЧТТ), определенное для конкретного соединения, tr – время удерживания, W_h – ширина пика на полувысоте. (1)

$H=L/N$, где H – высота, эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ), L – длина колонки. (2)

$N_{cp}=(\sum 1_i N_i)/n$, где N_i – ЧТТ для каждого отдельного соединения, n – число соединений. (3)

$N'=100N/L$, где N' – приведенное ЧТТ для колонки длиной в 1 м. (4)

По результатам, представленным в таблице видно, что при применении капиллярной колонки полуширина пиков уменьшается в среднем в два раза, во столько же повышается эффективность колонки для каждого пептида. Высота, эквивалентная теоретической тарелке для капиллярной колонки составила 2,7 мкм, для Prontosil 120-5C18 – 13 мкм. Приведенные эффективности составили $2,8 \cdot 10^5$ и $0,7 \cdot 10^5$ ЧТТ/м для капиллярной колонки и Prontosil 120-5C18, соответственно. Как известно, коэффициент разбавления в жидкостной хроматографии пропорционален длине колонки и квадрату ее диаметра. Для капиллярной колонки в связи с уменьшением ее диаметра концентрация компонента возрастает, что, соответственно, приводит к повышению чувствительности обнаружения: концентрация определяемого компонента в максимуме пика примерно в 100 раз больше, чем для обычных колонок ВЭЖХ. При этом в новой системе имеет место уменьшение времени анализа и, как следствие, значительное уменьшение ширины пиков и увеличения разрешающей способности системы.

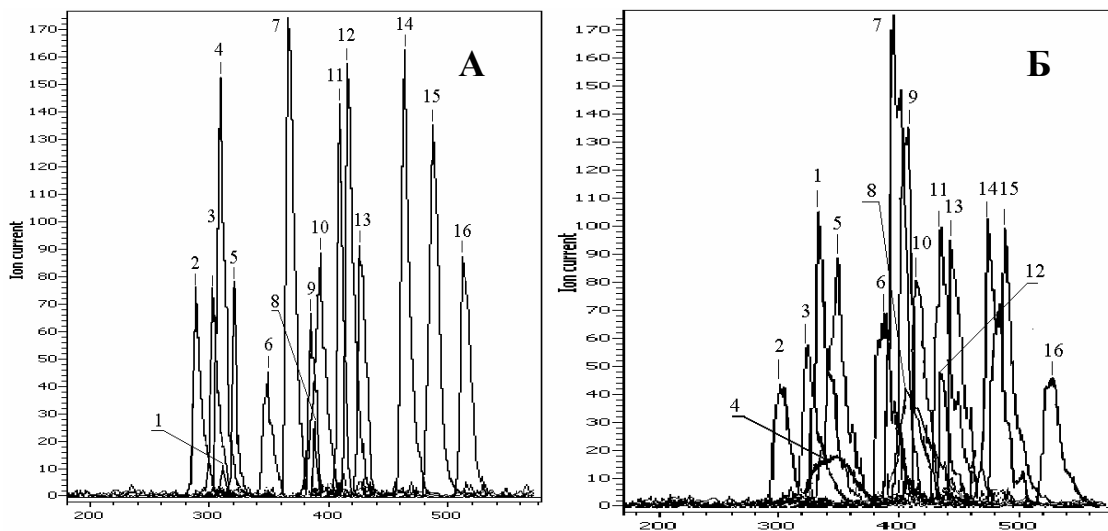


Рисунок 3 - Хроматограммы пептидов, принадлежащих BSA. А. Система ввода нанокolicества пробы – Масс-спектрометр MX 5310. Б. Тандем Милихром А2 – Масс-спектрометр MX 5310.

Все перечисленные достоинства новой системы ввода пробы имеют особое значение при анализе сложных смесей биополимеров. Наряду с набивной колонкой может быть также использован незаполненный капилляр, что позволяет проводить анализ в изократическом режиме без сложных манипуляций по отключению хроматографа в режиме прямого ввода образца. И, наконец, при использовании для

анализа новой системы ввода пробы исчезает потребность в напуске спутного газа, даже при распылении водных растворов образцов.

Таблица 2 – Основные характеристики систем Милихром А02-МХ5310 и нанохроматографическая система-МХ5310.

Характеристики	Милихром А02 – МХ5310 (колонка Prontosil 120-5С18)	Система ввода наноколичества пробы – МХ5310 (набивная капиллярная колонка)
Объем пробы	50 мкл	0,4 мкл
Количество вещества, содержащегося в пробе	200 пкМ	1,8 пкМ
Скорость потока подвижной фазы	150 мкл/мин	~100-200 нл/мин
Нагрев спутного газа	требуется	спутный газ не используется
ЧТТ ср. колонки	5363,51	13812,3
Высота, эквивалентная теоретической тарелке	13 мкм	2,7 мкм
Приведенная эффективность колонки	$0,7 \cdot 10^5$ ЧТТ/м	$2,8 \cdot 10^5$ ЧТТ/м
Преимущества	<ul style="list-style-type: none"> • возможность приобрести коммерческий готовый продукт 	<ul style="list-style-type: none"> • возможность изготавливать колонки в ходе работы • невысокие траты на расходные материалы

В § 3.6 приведены результаты анализа образцов, содержащих элюаты с металл-аффинных сорбентов триптических гидролизатов коммерческого сывороточного альбумина крысы, и альбумина, выделенного из сыворотки крови крысы после добавления параоксона с использованием разработанных методик и систем ввода наноколичеств пробы.

Результаты анализа показали, что при использовании системы нано-ЭС МХ-5310 в масс-спектрах образцов модифицированного сывороточного альбумина крысы надежно детектируются оба идентифицированных пептида ($Y_{P_{7X}}$ TQKARQVSTPTLVEAAR и RHPYFY $_{P_{7X}}$ APELLLYAEK). Также как в случае сыворотки крови крысы, обработанной по предложенной методике, детектируется пептид RHPYFY $_{P_{7X}}$ APELLLYAEK. Те же результаты были получены при анализе этих образцов с помощью нано-хроматографической системы в режиме прямого ввода (Рисунок 4).

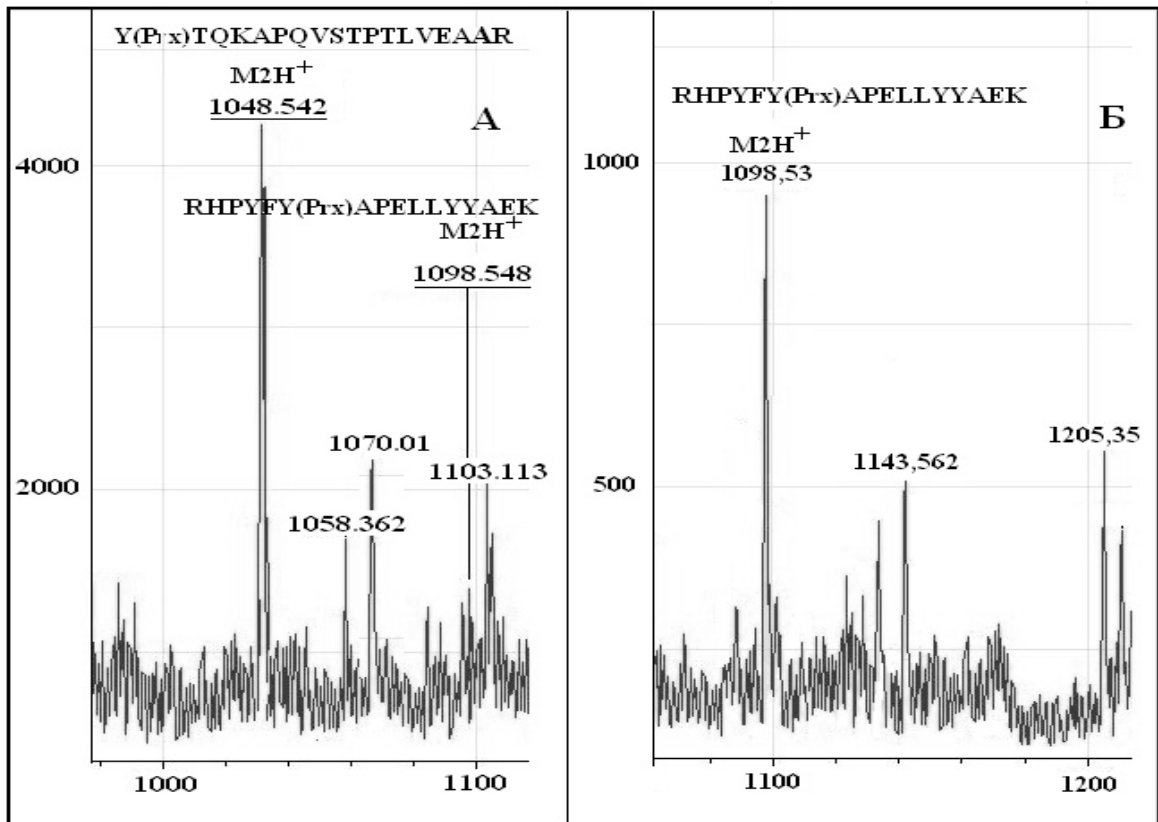


Рисунок 4 – Фрагменты масс-спектров (система нано-ЭС-МХ-5310), содержащие сигналы модифицированных пептидов, полученных с помощью металл-аффинной хроматографии. А. Сывороточного альбумина крысы, обработанного параоксоном *in vitro*; Б. Сывороточного альбумина крысы, полученного из обработанной параоксоном сыворотки крысы с использованием разработанной универсальной методики.

Основные результаты

1. Предложена новая отечественная система ввода нанокolicеств анализируемых соединений в масс-спектрометр, совмещающая преимущества ВЭЖХ хроматографии и метода ионизации нано-электроспрей. Разработана методика получения ВЭЖХ нано колонок. Показана высокая эффективность и чувствительность разработанного комплекса нано-ЖХ-ЭС-МС по сравнению с комплексом Милихром А02 - МХ-5310.
2. Впервые предложена и разработана методика, позволяющая обогащать образцы фосфорсодержащими пептидами с помощью методов металл-аффинной хроматографии.
3. Разработана универсальная методика выделения фосфорсодержащих пептидов из биологических образцов.
4. Показана возможность использования комплекса нано-ЭС-МС для решения задач связанных с выявлением аддуктов белков крови с фосфорорганическими веществами
5. Впервые обнаружены и идентифицированы триптические пептиды сывороточного альбумина человека, модифицированные остатком RVX по Y411 и Y150.

6. Впервые обнаружены и идентифицированы триптические пептиды сывороточного альбумина крысы, модифицированные остатком параоксона по Y411 и Y150.

Список публикаций

В реферируемых журналах

1. **И.А.Краснов**, М.З.Мурадымов, М.В.Апацкая, Я.И.Лютвинский, С.В.Фиронов, А.В.Витин, К.А.Беляев, Д.И.Корнев, А.А.Каюмов, А.В.Подтележников, Е.П.Подольская, Л.Н.Галь, Н.В.Краснов. Разработка системы ввода нанокolicеств пробы в масс-спектрометр // Научное приборостроение. – 2008. - т. 18. - №4. - С.88-96
2. **И.А. Краснов**, Н.В. Гончаров, В.Н. Бабаков, Л.М. Глашкина, Е.Е. Ермолаева, Я.А. Дубровский, Д.С. Прокофьева, Н.Г. Войтенко, Т.И. Смолихина, Н.Б.Поляков, А.С., Радилов, Е.П. Подольская, Н.В. Краснов. Идентификация алкилированного аддукта сывороточного альбумина человека методами масс-спектрометрии // Научное приборостроение. - 2008. - т.18. - №4 - С.46-53.
3. **И.А. Краснов**, Н.В. Гончаров, В.Н. Бабаков, Л.М. Глашкина, Е.Е. Ермолаева, Я.А.Дубровский, Д.С. Прокофьева, Н.Г. Войтенко, Т.И. Смолихина, Н.Б.Поляков, Е.П.Подольская, А.С. Радилов, Н.В. Краснов. Изменения спектра производных фибринопептида в плазме крови при действии О-изобутил-S-(2-диэтиламиноэтил) метилтиофосфоната // Научное приборостроение. – 2008. - т.18. - №4. - с.29-36.
4. В.Н. Бабаков, Е.П. Подольская, Н.В. Гончаров, Л.М. Глашкина, **И.А. Краснов**, Н.Б. Поляков, Н.Г. Войтенко, Д.С. Прокофьева, Н.В. Краснов, А.С. Радилов. Новые маркеры интоксикации фосфорорганическими соединениями в пептидной фракции плазмы крови крыс // Токсикологический вестник. - 2010.- №2. – С.31-38.

В монографиях

5. A. Radilov, V. Rembovskiy, I. RybaZhXhenko, E. Podolskaya, E. Savelieva, V. Babakov, E.Ermolaeva, S. Dulov, S. Kuznetsov, I. Mindukshev, A. Shpak, **I. Krasnov**, N. Khlebnikova, R. Jenkins, N. Goncharov. Russian VX: monitoring and toxicity // In: Gupta, R.C. ed. Handbook of the Toxicology of Chemical Warfare Agents. - 2009. - Oxford: Elsevier. - P. 69-91.

Материалы научно-практических конференций и методические рекомендации

6. Методы определения биохимических маркеров фосфорорганических отравляющих веществ в биосредах // Методические рекомендации утв. зам. Руководителя Федерального медико-биологического агентства М.Ф.Киселёвым № 38 -08
7. N.V. Goncharov, E.P. Podolskaya. M.V. Apatskaya, **I.A. Krasnov**, L.M. Glashkina, A.S. Radilov, N.V. Krasnov. Effects of organophosphates on peptide fraction of rat plasma The 9th international symposium on protection against chemical and biological warfare agents // Gothenburg, Sweden, 22-25 MAY, 2007.
8. Е.П. Подольская, Н.В. Гончаров, М.В. Апацкая, **И.А. Краснов**, Л.М. Глашкина, Н.Б. Поляков, А.С. Радилов, Н.В. Краснов, Изменение состава плазмы крови крыс, вызванное воздействием фосфорорганических соединений //

- «Фундаментальная наука и клиническая медицина». Санкт-Петербург, 2007. - С.88-89.
9. N.V. Goncharov, E.P. Podol'skaya, M.V. Apatskaya, **I.A. Krasnov**, L.M. Glashkina, A.S. Radilov, N.V. Krasnov. «The 9th international symposium on protection against chemical and biological warfare agents» // Gothenburg, Sweden, 22-25 MAY, 2007. - P.70.
 10. E. Podolskaya, V. Babakov, N. Goncharov, L. Glashkina, E. Ermolaeva, D. Prokof'eva, **I. Krasnov**, A. Polyakov, A. Radilov, N. Krasnov. Effects of organophosphates on peptide fraction of human blood serum // «HUPO 2008 7-th world congress». Amsterdam, 2008. - P.100.
 11. **И.А. Краснов**, Е.П. Подольская. Поиск вероятных маркеров интоксикации фосфорорганическими соединениями в плазме крови крыс // Международная научно-практическая конференция «МЕТРОМЕД – 2007», Архангельск, 2007. - С.71.
 12. **И.А. Краснов**, Е.П. Подольская, Н.В. Гончаров, В.Н. Бабаков, Л.М. Глашкина, Е.Е. Ермолаева, Д.С. Прокофьева, А.С.Радилов, Н.В. Краснов. Идентификация модификации фрагмента сывороточного альбумина человека RVX // «Материалы пятого съезда общества биотехнологов России им. Ю.А.Овчинникова». Москва, 2008. – С.222-223.
 13. E. Podolskaya, N. Goncharov, L. Glashkina, N. Polyakov, V. Babakov, **I. Krasnov**, A. Radilov, N. Krasnov. Identification of new biomarkers of organophosphates intoxication in peptide fraction of rat plasma // «56th ASMC Conference on Mass Spectrometry June 1 – 5». Denver (USA), 2008.
 14. В.Н. Бабаков, Е.П. Подольская, Н.В. Гончаров, **И.А. Краснов**, Л.М. Глашкина, Я.А. Дубровский, Е.Е. Ермолаева, Д.С. Прокофьева, Войтенко, А.С. Радилов Н.Г., Н.В. Краснов, В.Р. Рембовский. Использование масс-спектрометрии с методом ионизации maldi при поиске биомаркеров интоксикаций высокоопасными отравляющими веществами // V российский симпозиум <<Белки и пептиды>>. Тезисы докладов, Казань, 2009 - С.78.
 15. **И.А.Краснов**, В.Д. Гладилович, Я.А. Дубровский, В.Н. Бабаков, Е.П. подольская. Идентификация пептидов альбумина, модифицированных фосфорорганическими соединениями, с применением методов хроматографии и масс-спектрометрии // <<Химическая безопасность Российской Федерации в современных условиях>>. Санкт-Петербург, 2010. - С.47.

Список цитируемой литературы

- 1 Worek F, Koller M, Thiermann H, Szinicz L. Diagnostic aspects of organophosphate poisoning. // Toxicology. 2005. 214(3):182-9
- 2 Александров М.Л., Галль Л.Н., Краснов Н.В., Николаев В.И., Шкуров В.А. Экстракция ионов из растворов при атмосферном давлении – новый метод масс-спектрометрического анализа // Доклады Академии наук СССР. — М.: 1984. Т. 277. 2. С. 379-383.
- 3 Black R.M., Harrison J.M., Read R.W. The interaction of sarin and soman with plasma proteins: the identification of a novel phosphorylation site // Arch Toxicol. 1999; v.73, p.123-126.
- 4 Williams, N. H., Harrison, J. M., Read, R. W., and Black, R. M. Phosphorylated tyrosine in albumin as a biomarker of exposure to organophosphorus nerve agents. // Arch. Toxicol. 2007;v.81, p.627–639.
- 5 Smith D. The electrohydrodynamic atomization of liquids // Trans Ind Appl, 1986. № 22. p.527–535.
- 6 Eric S. Peeples, Lawrence M. Schopfer, Ellen G. Duysen, Reggie Spaulding, Troy Voelker, Charles M. Thompson, and Oksana Lockridge. Albumin, a New Biomarker of Organophosphorus Toxicant Exposure, Identified by Mass Spectrometry // Toxicological sciences. 2005; 83, p.303–312.