

УДК 615.011.4: 577.121.9

© Я. А. Дубровский, В. Д. Гладилевич, Е. П. Подольская,  
В. Н. Бабаков, Н. В. Гончаров, Н. В. Краснов

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЛОБИНА КРЫСЫ И ЧЕЛОВЕКА С АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ *IN VITRO*: МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ АЦЕТИЛИРОВАННЫХ ЛИЗИНОВ

В работе исследовали возможность взаимодействия ацетилсалициловой кислоты (АСК) с очищенным глобином человека и крысы *in vitro*. Показано, что глобин крысы способен модифицироваться АСК по К-17 и К-57 в субъединице альфа и К-96 в субъединице бета, а глобин человека — по К-17, К-41, К-57 в субъединице альфа и К-18, К-121 в субъединице бета.

Кл. сл.: ацетилсалициловая кислота, гемоглобин, аддукты, масс-спектрометрия, МАЛДИ

### ВВЕДЕНИЕ

Изучение связывания лекарственных препаратов с белками крови является одной из наиболее важных задач фармакологии, в частности при проведении фармакокинетических исследований. Это объясняется тем, что лекарственные средства связываются с белками плазмы в большей степени, чем с другими компонентами крови. Лишь несвязанное компонентами крови вещество способно к достижению фармакологических мишеней, доступно для биотрансформации и экскреции.

При фармакокинетических исследованиях взаимодействия лекарственных средств с белками крови применяют методы ультрафильтрации, равновесного диализа и флуоресцентной спектроскопии, что позволяет установить число центров связывания и константы связывания лекарственного средства с белком. На начальных этапах исследований часто применяют смесь белков плазмы крови.

Как правило, при дальнейших фармакокинетических исследованиях исследуют взаимодействие лекарственного средства с сывороточным альбумином. В молекуле альбумина содержится большое количество реакционноспособных участков (тиоловые, имидазольные, карбоксильные группы, аминокислотные группы лизина), благодаря которым этот белок легко вступает во взаимодействие с различными ионами, продуктами обмена и лекарственными средствами. Применение методов протеомики позволяет установить участки связывания лекарственного средства на изучаемом белке как в случае электростатических взаимодействий белок—лиганд, так и в случае образования ковалентных связей.

Хотя ацетилсалициловая кислота (АСК) подвергалась интенсивным фармакологическим и клиническим исследованиям с самого момента ее введения в лечебную практику в 19 веке, противовоспалительный механизм действия был определен только в 1970-е годы. АСК избирательно ингибирует циклооксигеназу — широко распространенный связанный с мембранами фермент, действующий как катализатор биосинтеза простагландинов и других эйкозаноидов. Фармакологический механизм действия состоит в том, что АСК необратимо ацетирует гидроксильную группу остатка серина в положении 530 в рекомбинантном ферменте циклооксигеназы из тромбоцитов человека [1]. Было также показано, что этот сериновый остаток не является единственно возможным вариантом и может быть заменен другими подходящими аминокислотами без потери циклооксигеназной активности. Таким образом, ацетилирование серинового остатка связано с неспецифическим стерическим ингибированием взаимодействия фермент—субстрат, ведущим к блокированию доступа арахидоновой кислоты к каталитическому центру циклооксигеназы [2].

Ацетилсалициловая кислота способна ацетилировать сывороточный альбумин *in vitro* [3] и *in vivo* [4]. Было установлено, что основной мишенью ацетилирования в сывороточном альбумине человека является лизин-199 [5]. В дальнейшем было показано, что при добавлении ацетилсалициловой кислоты к раствору сывороточного альбумина человека *in vitro* происходит ацетилирование лизина, входящих в состав белка. С помощью масс-спектрометрии были идентифицированы ацетили-

рованные лизин-199, -402, -519 и -545. При высоких концентрациях АСК (20 мМ) в сывороточном альбумине человека были выявлены 26 ацетилированных лизинов [6].

Кроме того, на сегодняшний день имеются данные о взаимодействии АСК с другим мажорным белком кровеносного русла — гемоглобином [7, 8]. В частности, методом ЯМР было показано, что гемоглобин человека способен нести модификацию по лизину-82 в субъединице бета. Если учесть, что суммарно субъединицы альфа и бета гемоглобина содержат 22 лизина, можно ожидать, что гемоглобин должен модифицироваться АСК по гораздо большему числу лизинов, что можно установить масс-спектрометрическими методами. Гемоглобин является основным белком эритроцитов — основных форменных элементов кровеносного русла. Такие клетки крови, как тромбоциты, могут являться основной мишенью АСК. Эритроциты также могут связывать часть свободного пула АСК. Кроме того, гемоглобин является более долгоживущим белком крови, чем сывороточный альбумин, и сохраняется все время жизни эритроцита (3–4 месяца). Таким образом, анализ модификаций и способности гемоглобина связывать лекарственные средства является важной фармакокинетической задачей.

Целью данной работы было исследование возможности образования аддуктов глобина крысы и человека с ацетилсалициловой кислотой с выявлением участков ацетилирования.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Выделение глобина крысы

Для выделения глобина крысы использовали цельную кровь с антикоагулянтом (20 мМ ЭДТА). Цельную кровь центрифугировали 15 мин при 1200 g, после чего плазму удалили, а полученную клеточную массу три раза промыли небольшим количеством физраствора для удаления остатков плазмы. К промытой клеточной массе добавили равный объем дистиллированной воды для получения гемолизата. К аликвоте гемолизата (1 мл) при помешивании добавили 6 мл 50 мМ HCl в изопропанол и затем центрифугировали 15 мин при 3000 g. Супернатант отделили от осажденного гема, добавили к нему 4 мл этилацетата и центрифугировали 15 мин при 3000 g. Осадок, содержащий гидрохлорид глобина, отделили от раствора и промыли этилацетатом, после чего высушили с помощью роторного испарителя.

### Инкубирование выделенного глобина с АСК

Навеску выделенного глобина (1 мг) растворили в 1 мл 25 мМ аммонийного бикарбонатного

буфера, раствор центрифугировали при 10 000 g для удаления нерастворившихся частиц. После этого отобрали аликвоту 500 мл и добавили к ней *in vitro* раствор АСК до конечной концентрации 0.1 мг/мл. Полученный раствор инкубировали 1 ч при 37 °С.

### Получение триптических гидролизатов глобина крысы

Из растворов, содержащих модифицированный и немодифицированный глобин, отобрали аликвоты по 100 мкл. После этого к аликвотам добавили приготовленный раствор трипсина (Sigma, proteomics grade) в 25 мМ аммонийном бикарбонатном буфере в соотношении с белком 1:100 по молярной концентрации. Трипсинолиз проходил в течение 6 часов при температуре 37 °С. Свежеприготовленный раствор трипсина добавляли к белку каждые 3 ч.

### Масс-спектрометрический анализ методом MALDI-TOF

Обессоливание проб производили на микроколонках Zip-Tip с привитой обратной фазой C18. Перед использованием колонки промывали небольшими объемами 100 %-го ацетонитрила, затем раствором 0.1 %-й трифторуксусной кислоты в воде.

На колонку наносили 5 мкл раствора образца в концентрации  $10^{-4}$  М и промывали раствором 0.1 %-й трифторуксусной кислоты (ТФУ). После чего элюировали с колонки удерживаемые на ней пептиды раствором альфа-циано-4-гидроксикоричной кислоты (7 мг/мл) в 60 %-м ацетонитриле с 0.1 %-й ТФУ непосредственно на мишень.

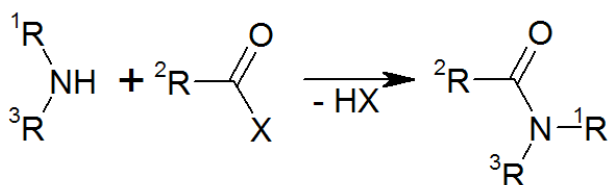
Масс-спектрометрический анализ пептидов проводили на времяпролетном масс-спектрометре Axima Performance с источником MALDI, оснащенном УФ-лазером (337 нм), в режиме детектирования положительных ионов с использованием рефлектрона при следующих настройках ионного источника: напряжение — 20 кВ, напряжение на линзах (Lens) — 6.5 кВ, напряжения на рефлектроне (Ref) — 24.38 кВ. Ионы детектировали в диапазоне  $m/z$  от 700 до 4000. Масс-спектры регистрировали при помощи программы MALDI-MS Shimadzu Biotech (Shimadzu, Япония).

В качестве внутреннего стандарта использовали пики триптических пептидов глобина крыс, представленные в табл. 1.

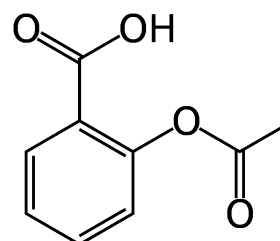
Поиск в базе SwissProt осуществляли с помощью программного комплекса MASCOT (Matrix Science, Великобритания), при этом использовались следующие параметры поиска: точность определения массы — 0.1 Да, возможные модификации — окисление метионина.

**Табл. 1.** Триптические пептиды глобина крысы, использованные в качестве внутреннего стандарта

Масса МН <sup>+</sup>	Позиция	Субъединица	Последовательность пептида
1087.62	92–100	Альфа	LRVDPVNFK
1274.72	32–41	Бета	LLVVYPWTQR
1572.74	18–32	Альфа	IGGHGGEYGEEALQR
2006.91	42–60	Бета	YFDSFGDLSSASAIMGNPK
2297.15	70–91	Альфа	AADHVEDLPGALSTLSDLHANK
2565.23	84–105	Бета	GTF AHLSELHCDKLHVDPENFR



**Рис. 1.** Схема: реакция взаимодействия сложных эфиров с первичными и вторичными аминами



**Рис. 2.** Ацетилсалициловая кислота (АСК)

Идентификацию белков проводили в программе MS-Tag (University of California, San Francisco, URL: prospector.ucsf.edu); при этом использовали следующие параметры поиска: точность определения массы родительского иона — 0.1 Да, точность определения массы фрагментов — 0.5 Да.

Точную моноизотопную массу и форму изотопного распределения для пептидов с нестандартными модификациями получали при помощи программы MassPro.

(МС-МС)-спектры обрабатывали с помощью программы Sequence Viewer 2.0 (ИАП РАН).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При взаимодействии сложных эфиров с первичными и вторичными аминами происходит ацетилирование последних с образованием N-замещенных амидов (рис. 1). Ацетилсалициловую кислоту можно отнести к сложным эфирам (рис. 2), поэтому логично ожидать, что она способна образовывать ковалентные аддукты с гемоглобином, в состав которого входит 22 лизина, содержащих свободную аминогруппу.

Для выявления аддуктов аспирина исследовали образцы очищенного глобина крысы и человека (в результате выделения и очистки простетичная

группа отщепляется и остается только сам белок — глобин) после инкубации с АСК *in vitro* с помощью масс-спектрометра, снабженного источником ионов MALDI. Масс-спектры цельных белков, полученные в линейном режиме, продемонстрированы на рис. 3. На рисунке показано, что в образцах, инкубированных с аспирином, появляются сигналы, смещенные в область тяжелых масс по сравнению с контролем. Из чего можно сделать выводы, что глобин способен присоединять некоторое количество остатков уксусной кислоты. Поскольку линейные спектры малоинформативны, были получены масс-спектры триптических гидролизатов модифицированных белков, в которых был проведен поиск сигналов с массами, отличающимися на величину 42 Да от расчетных значений масс триптических пептидов субъединиц альфа и бета глобина крысы и человека.

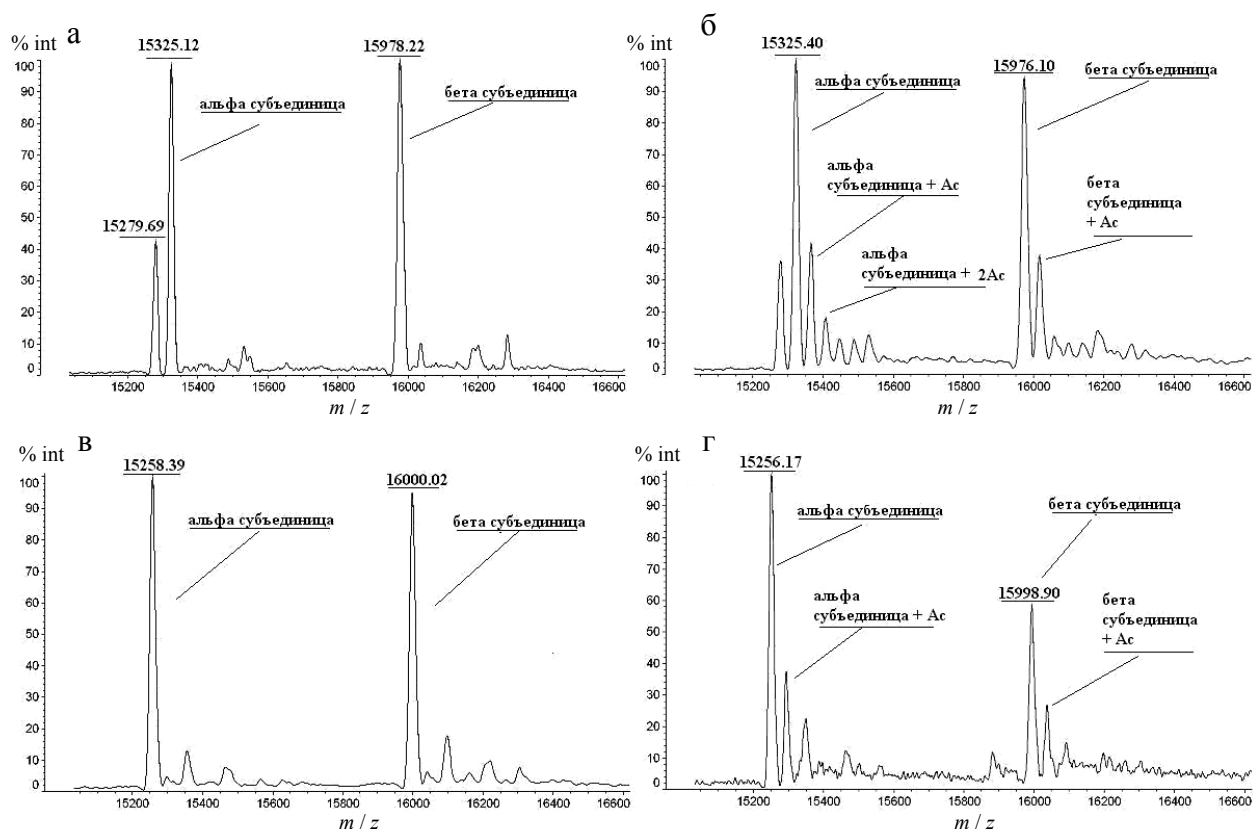
В результате был обнаружен ряд ацетилированных пептидов (табл. 2):

для субъединицы альфа глобина крысы

NCWGTKIGGHGGEYGEEALQR (МН<sup>+</sup> 2202.35 Да),  
TYFSHIDVSPGSAQVKAHGK (МН<sup>+</sup> 2171.19 Да);

для субъединицы бета глобина крысы

GTF AHLSELHCDKLHVDPENFR (МН<sup>+</sup> 2607.33 Да);

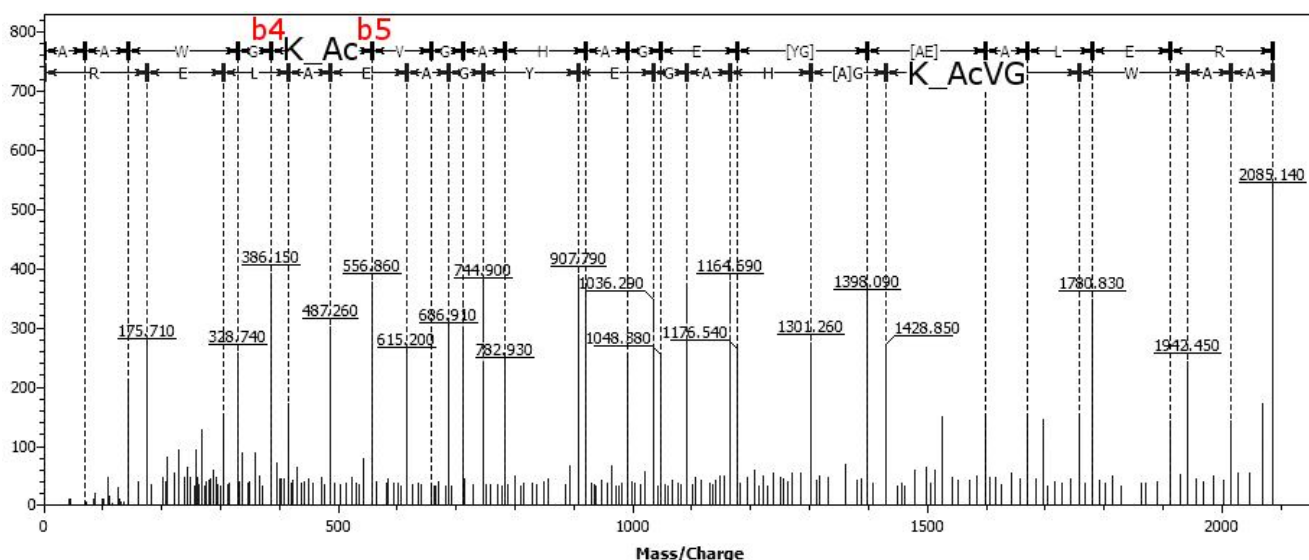


**Рис. 3.** Линейные масс-спектры.

а — глобин крысы (контроль); б — глобин крысы, инкубированный с АСК;  
 в — глобин человека (контроль); г — глобин человека, инкубированный с АСК

**Табл. 2.** Массы ацелированных пептидов, обнаруженных в спектрах триптических гидролизатов глобина крысы и человека, инкубированных с АСК

Глобин		MH <sup>+</sup> , Да (теор.)	MH <sup>+</sup> + аддукт, Да (теор.)	MH <sup>+</sup> + аддукт, Да (экспер.)	№ в последовательности	Последовательность
Крыса	Альфа-субъединица	2159.98	2202.03	2202.35	17	NCWGK*IGGHGGEYGEALQR
		2129.08	2171.12	2171.19	57	TYFSHIDVSPGSAQVK*AHGK
Крыса	Бета-субъединица	2564.22	2606.26	2607.33	96	GTFANLSELHCDK*LHVPENFR
Человек	Альфа-субъединица	2886.43	2928.47	2928.41	41	MFLSFPTTK*TYFPHFDLSHGSAQVK
		2213.09	2255.13	2255.18	57	TYFPHFDLSHGSAQVK*GHGK
		2043.00	2085.04	2085.12	17	AAWGK*VGAHAGEYGAELER
	Бета-субъединица	3078.65	3120.69	3121.63	121	LLGNVLCVLANHFGK*EFTPPVQAAAYQK
		2228.17	2270.21	2270.30	18	SAVTALWGK*VNVDEVGGEALGR



**Рис. 4.** (МС-МС)-спектр пептида AAWGK<sub>Ac</sub>VGAHAGEYGAELER (2085.12 Да), входящего в состав альфа-субъединицы глобина человека, ацетилированного по лизину-17, обработанный в программе Sequence Viewer 2.0

для субъединицы альфа глобина человека

MFLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVK  
(MH<sup>+</sup> 2928.41 Да),  
TYFPHFDLSHGSAQVKGHGK (MH<sup>+</sup> 2255.18 Да),  
AAWGKVGANAGEYGAELER  
(MH<sup>+</sup> 2085.12 Да);

для субъединицы бета глобина человека

LLGNVLVCVLANHFQKFTPPVQAAQK  
(MH<sup>+</sup> 3121.63 Да) и  
SAVTALWGKVNVEVGGEALGR  
(MH<sup>+</sup> 2270.30 Да).

Следует обратить внимание, что при триптическом гидролизе разрыв аминокислотной последовательности происходит по аргинину и, что немало важно, по лизину. Каждый из обнаруженных пептидов содержит неконцевой лизин. Можно предположить, что реакция гидролиза не прошла именно потому, что эти аминокислоты содержат модификацию остатком АСК.

Для подтверждения данного предположения обнаруженные пептиды были проанализированы методом тандемной масс-спектрометрии. (МС-МС)-анализ показал, что все обнаруженные пептиды действительно ацетилированы по лизину. В качестве примера на рис. 4 представлен (МС-МС)-спектр пептида

AAWGK<sub>Ac</sub>VGAHAGEYGAELER.

Как показано на рисунке, по сигналам фрагментных ионов практически полностью восста-

новлена аминокислотная последовательность пептида, а разница масс между фрагментными ионами b4 и b5 соответствует остатку лизина, модифицированного АСК. Это полностью доказывает наличие модификации на остатке неконцевого лизина в пептиде AAWGK<sub>Ac</sub>VGAHAGEYGAELER.

Таким образом, в результате работы было показано, что глобин крысы способен модифицироваться АСК по K-17 и K-57 в субъединице альфа и по K-96 в субъединице бета, а глобин человека — по K-17, K-41, K-57 в субъединице альфа и K-18, K-121 в субъединице бета.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Funk C.D., Funk L.B., Kennedy M.E., Pong A.S., Fitzgerald G.A. Human platelet/erythroleukemia cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment // *FASEB J.* 1991. V. 5, N 9. P. 2304–2312.
2. Shimokawa T., Smith W.L. Prostaglandin endoperoxide synthase. The aspirin acetylation region // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267, N 17. P. 12387–12392.
3. Hawkins D., Pinckard R.N., Farr R.S. Acetylation of human serum albumin by acetylsalicylic acid // *Science.* 1968. V. 160. P. 780–781.
4. Hawkins D., Pinckard R.N., Crawford I.P., Farr R.S. Structural changes in human serum albumin induced by ingestion of acetylsalicylic acid // *J. Clin. Invest.* 1969. V. 48. P. 536–542.
5. Walker J.E. Lysine residue 199 of human serum albumin is modified by acetylsalicylic acid // *FEBS Lett.* 1976. V. 66. P. 173–175.
6. Liyasova M.S., Schopfer L.M., Lockridge O. Reaction

- of human albumin with aspirin *in vitro*: Mass spectrometric identification of acetylated lysines 199, 402, 519, and 545 // *Biochem. Pharmacol.* 2010. V. 79, N 5. P. 784–791.
7. Bridges K.R., Schmidt G.J., Jensen M., Cerami A., Bunn H.F. The acetylation of hemoglobin by aspirin. *In vitro* and *in vivo* // *J. Clin. Invest.* 1975. V. 56, N 1. P. 201–207.
8. Xu A.S., Ohba Y., Vida L., Labotka R.J., London R.E. Aspirin acetylation of betaLys-82 of human hemoglobin. NMR study of acetylated hemoglobin tsumamai // *Biochem. Pharmacol.* 2000. V. 60, N 7. P. 917–922.

*Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург* (Дубровский Я.А., Гладилевич В.Д., Подольская Е.П., Краснов Н.В.)

*ФГУП "Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека" ФМБА России, Санкт-Петербург* (Бабаков В.Н., Гончаров Н.В.)

Контакты: Дубровский Ярослав Александрович, jar.chem@mail.ru

Материал поступил в редакцию 17.09.2010.

## INTERACTION OF HUMAN AND RAT GLOBIN WITH ACETYLSALICYLIC ACID *IN VITRO*: MASS SPECTROMETRIC IDENTIFICATION OF ACETYLATED LYSINES

Ya. A. Dubrovsky<sup>1</sup>, V. D. Gladilovich<sup>1</sup>, E. P. Podolskaya<sup>1</sup>,  
V. N. Babakov<sup>2</sup>, N. V. Goncharov<sup>2</sup>, N. V. Krasnov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint-Petersburg*

<sup>2</sup>*Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Saint-Petersburg*

The possibility of interaction of acetylsalicylic acid with purified human and rat globin *in vitro* was investigated. The rat globin can be modified with acetylsalicylic acid on aminoacid residues K-17 and K-57 in alpha subunit as well as on K-96 in beta subunit. The human globin can be modified with acetylsalicylic acid on aminoacid residues K-17, K-41 and K-57 in alpha subunit as well as on K-18 and K-121 in beta subunit.

*Keywords:* aspirin, acetylsalicylic acid, hemoglobin, adduct, mass-spectrometry, MALDI-TOF