

УДК 621.384.668.8: 577.122: 615.099.07

© Я. А. Дубровский, Е. А. Мурашко, М. Ю. Комбарова, Е. П. Подольская,  
В. Н. Бабаков, Н. В. Краснов, А. С. Радилов

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ АДДУКТОВ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА С ЦИАНИДАМИ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

МАЛДИ-масс-спектрометрия была использована для выявления аддуктов цианидов с сывороточным альбумином человека. В триптическом гидролизате сывороточного альбумина человека, инкубированного с цианидами (натриевые и калиевые соли), удалось выявить модифицированный по Cys-34 пептид Cys-Pro-Phe-Glu-Asp-His-Val-Lys с  $MH^+$  999.44 Да. В результате взаимодействия образуется цистеин, содержащий группу SCN. Последовательность модифицированного пептида была подтверждена с помощью ВЭЖХ-МС-МС-анализа на приборе типа ионная ловушка.

Кл. сл.: MALDI, ионная ловушка, сывороточный альбумин, цианиды

### ВВЕДЕНИЕ

Масс-спектрометрия с мягкими методами ионизации позволяет определять следовые количества биомолекул. Анализ посттрансляционных модификаций белков реакционноспособными ксенобиотиками, в основном необратимо связывающимися с биомолекулами, получил название "аддуктомики". Биоактивные ксенобиотики, поступающие в организм, могут взаимодействовать непосредственно с белками-мишенями или в процессе биотрансформации образовывать реакционноспособные метаболиты. Практически все биологические макромолекулы, такие как ДНК, РНК и белки, могут взаимодействовать с электро- и нуклеофильными соединениями. Исходное соединение или его метаболиты выводятся из организма в течение нескольких дней. В результате детекция ксенобиотика становится возможной только высокочувствительными аналитическими методами. Аддукты с ДНК и белками сохраняются в организме на протяжении длительного времени.

В основном опубликованы работы научных групп, работающих над проблематикой уничтожения химического оружия. Фосфорорганические отравляющие вещества способны фосфонилировать сывороточный альбумин и бутирилхолинэстеразу [1–3]. Другой мажорный белок крови — гемоглобин способен образовывать аддукты с сернистым ипритом [4, 5]. N-концевой алкилированный валин был выявлен в организме спустя 94 дня после экспозиции [6]. Таким образом, аддукты ксенобиотиков с биомолекулами могут рассматриваться как потенциальные биомаркеры ретроспек-

тивной химико-токсикологической диагностики.

К опасным токсикантам относится синильная кислота и ее соли (далее CN). Основными источниками загрязнения CN атмосферного воздуха является промышленность и выхлопные газы автомобильного транспорта. Также CN являются компонентами дыма от сигарет или дыма, образовавшегося в результате пожаров. Неорганические цианиды также широко используются в химической, кожевенной, текстильной промышленности, в фотографии, сельском хозяйстве, при добыче золота и в гальванопластике. CN или CN-содержащие сахара находятся в косточках фруктов, таких как персик, а также в других пищевых продуктах — миндале, шпинате, сое. Взаимодействие цианидов с цистеиновыми группами белков было продемонстрировано еще в середине прошлого века. Однако с развитием масс-спектрометрии и биоаналитических методов появились возможности идентифицировать модифицированные аминокислоты в полипептидной цепи. Недавно было продемонстрировано, что масс-спектрометрически возможно определить фрагменты сывороточного альбумина, модифицированного цианидами. В триптическом гидролизате выявлены и идентифицированы основные участки связывания — Cys-34, -53, -124, -392, -477 [7].

Большинство работ выполнено на масс-спектрометрах с методом ионизации "электроспрей". Другой метод ионизации нелетучих термолабильных соединений МАЛДИ редко применяется в решении подобных задач, несмотря на то, что данный метод является мощным инструментом в исследованиях сложных смесей пептидов и для его

использования не требуется дополнительной пробоподготовки. Время одного анализа может составлять менее одной минуты, а образец, нанесенный на масс-спектрометрическую мишень, может храниться длительное время, и имеется возможность провести повторный анализ.

Основной задачей данной работы являлась детекция аддуктов сывороточного альбумина с цианидами с использованием МАЛДИ-масс-спектрометрии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Реагенты и материалы:** ацетонитрил, трифторуксусная кислота, муравьиная кислота, трипсин (proteomic grade), бикарбонат аммония,  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричная кислота, этилацетат (*Sigma-Aldrich*, США), соляная кислота (*Вектон*, Санкт-Петербург), деионизированная вода (18.2 МОм, *Millipore*, США).

**Аппаратура:** времяпролетный масс-спектрометр MALDI-TOF-TOF Axima Perfomance (*Shimadzu / Kratos Analytical*, Великобритания), жидкостный хроматограф Infinity 1290 (*Agilent Technologies*, США), ионная ловушка amaZon ETD (*Bruker Daltonik GmbH*, Германия), твердотельный термостат (*Eppendorf*, Германия).

### Выделение сывороточного альбумина из плазмы крови человека

Для ингибирования протеаз к 100 мл донорской плазмы крови прилили 0.8 мл 0.25 М раствора ЭДТА. Далее к 100 мл плазмы крови при активном перемешивании добавили 16.6 г сульфата аммония, массовая концентрация соли в плазме составила 30 %. Осаждение белков проводили при 4 °С в течение 4 ч. Осадок отделили центрифугированием при 4000 г в течение 20 мин, а к супернатанту для достижения 70 % насыщения постепенно при активном перемешивании добавили еще 25.3 г сульфата аммония. Осадок получили центрифугированием при 4000 г в течение 20 мин. Для осаждения альбумина к супернатанту добавили шестикратный объем холодного этанола. Образец оставили на ночь при 4 °С для полного выпадения осадка, надосадочную жидкость слили. Полученный альбумин промыли небольшим объемом холодного этанола и высушили с помощью лиофильной сушки.

### Инкубирование выделенного сывороточного альбумина с цианистым натрием и калием

К 1 мл раствора белка (1 мг/мл) в 25 мМ аммоний-бикарбонатном буфере добавляли *in vitro* раствор цианидов до конечной концентрации 0.1 мг/мл. Смесь инкубировали в течение 3 ч при 37 °С.

### Получение триптических гидролизатов сывороточного альбумина

К 100 мкл раствора модифицированного белка (1 мг/мл) добавляли 10 мкл раствора трипсина в 1 мМ HCl (0.1 мг/мл) и оставляли в термостате на 3 ч при 37 °С, после чего добавляли столько же трипсина и оставляли еще на 3 ч при 37 °С.

### Нанесение образцов на масс-спектрометрическую мишень

На поверхность мишени смешивали 0.5 мкл раствора матрицы CHCA (5мг/мл,  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричная кислота) с 0.5 мкл гидролизата и высушивали на воздухе до образования кристаллов.

### Масс-спектрометрический анализ

Масс-спектрометрический анализ проводили с помощью времяпролетного масс-спектрометра Axima Perfomance с источником МАЛДИ, оснащенного 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 5000 Да. Масс-спектры регистрировали при помощи программы Launchpad 2.8.4 MALDI-MS Shimadzu Biotech (*Shimadzu*, Япония). Калибровку проводили по масс-спектру смеси пептидов: ангиотензин 2 ( $MH^+$  1046.542 Да), ангиотензин 1 ( $MH^+$  2296.685 Да), N-ацетил ренин ( $MH^+$  1800.943 Да), адренокортикотропный гормон (1-17) ( $MH^+$  2093.086 Да).

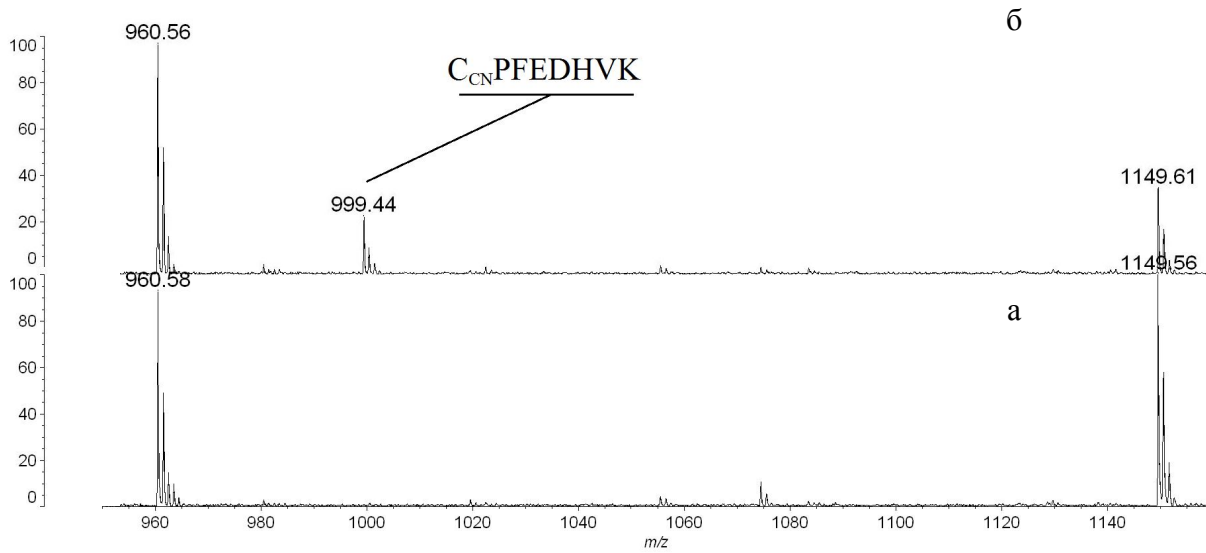
### Обработка полученных МАЛДИ-масс-спектров

Обработку полученных МАЛДИ-масс-спектров проводили с помощью программ Launchpad 2.8.4 MALDI-MS Shimadzu Biotech (*Shimadzu*, Япония) и MASCOT Distiller (*Matrix Science*, Англия).

### Условия хроматографического разделения

Объем вводимого образца 10 мкл. Колонка Zorbax SB-C18 2.1×150 мм, 3.5 мкм (*Agilent*, 830990-902). Разделение смеси пептидов гидролизатов белков проводили в градиентном режиме. А — 1 % раствор ацетонитрила в 0.1 % водном растворе муравьиной кислоты, Б — 90 % раствор ацетонитрила в 0.1 % водном растворе муравьиной кислоты. 0–30 мин: от 95 % А / 5 % Б до 50 % А / 50 % Б; 30–50 мин: от 50 % А / 50 % Б до 10 % А / 90 % Б; 50–55 мин: от 10 % А / 90 % Б до 95 % А / 5 % Б; 55–60 мин: 95 % А / 5 % Б. Скорость потока подвижной фазы 0.2 мл/мин.





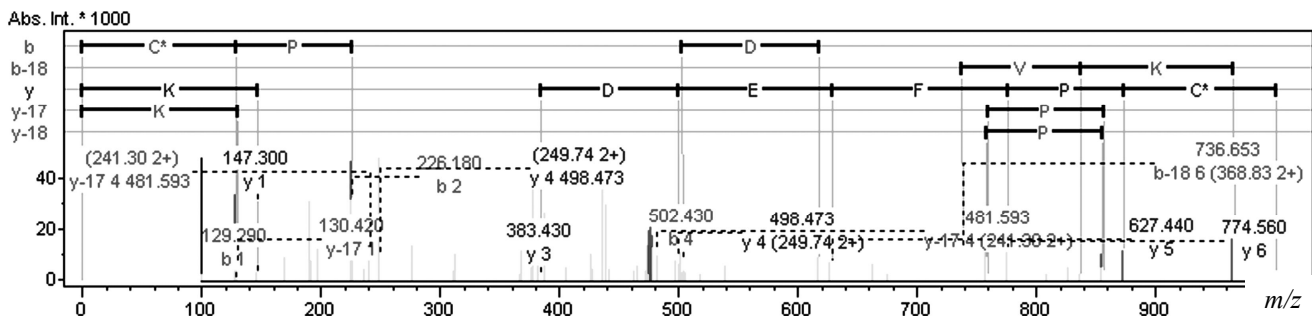
**Рис. 2.** МАЛДИ-масс-спектры триптических гидролизатов сывороточного альбумина человека. а — контроль, б — инкубированный с CN

Для подтверждения был проведен тандемный МАЛДИ-масс-спектрометрический анализ. К сожалению, полученные спектры имели небольшое количество фрагментных сигналов, и их недостаточно для достоверного восстановления аминокислотной последовательности.

Поскольку удалось выявить только один сигнал, отсутствующий в контроле, эксперимент был повторно проведен с использованием масс-спектрометра с методом ионизации "электроспрей". Результаты полностью согласуются с полученными с помощью МАЛДИ-масс-спектрометра. После обработки спектров с помощью про-

граммы Mascot удалось идентифицировать пептид с массой  $M_{Mo}$  998.43 Да, модифицированный CN. С помощью тандемной масс-спектрометрии удалось восстановить аминокислотную последовательность, используя программный пакет BioTools V 3.2 (рис. 3).

В работе [8] было показано, что цианиды не могут взаимодействовать со свободными сульфгидрильными группами сывороточного альбумина быка. Нам удалось выявить только аддукт с Cys-34, который является единственным свободным цистеином в молекуле сывороточного альбумина человека.



**Рис. 3.** Фрагментный масс-спектр пептида Cys-Pro-Phe-Glu-Asp-His-Val-Lys, обнаруженного в триптическом гидролизате сывороточного альбумина человека, инкубированного с CN (программа BioTools)

Данный результат может быть связан с тем, что в нашей работе мы использовали сывороточный альбумин человека, выделенный из донорской плазмы крови. Особенностью выделения является высаливание сульфатом аммония и преципитация фракции 70 % от насыщения сульфатом аммония ледяным этанолом. Таким образом, получается электрофоретически чистый нативный сывороточный альбумин. Сульфгидрильная группа Cys-34 активно участвует в осуществлении транспортной функции сывороточного альбумина и может ковалентно присоединять различные соединения, такие как глутатион, аминокислоту цистеин и другие низкомолекулярные соединения со свободными сульфгидрильными группами. Взаимодействие Cys-34 с цианидами может объясняться наличием в нативном альбумине пула занятого какими-либо соединениями цистеина. Эти соединения могут вытесняться цианидами по известным механизмам.

Отсутствие других модифицированных пептидов можно объяснить тем, что одним из возможных путей метаболизма присоединенного цианида является образование свободного тиоцианата и переход цистеина в дегидроаланин (рис. 1).

На ранней стадии хронического отравления неорганическими цианидами появляются головные боли, головокружение, общая слабость, ослабление памяти, бессонница, боли в области сердца, одышка, сухость в горле, диспепсические явления, усиленная потливость, что не всегда удается ассоциировать с отравлением. Высокая скорость выведения неорганических цианидов из организма затрудняет химико-токсикологический анализ. В связи с этим идентификация аддуктов с легкодоступными белками крови человека, в частности аддуктов сывороточного альбумина человека с цианидами, приобретает значимость в практической работе врачей гигиенического профиля и профпатологов по экспертизе связи заболеваний с воздействием вредных факторов производственной среды.

В результате проделанной работы было показано, что разработанные ранее методы для обнаружения SCN-аддуктов с белками крови для ВЭЖХ-МС-МС могут быть успешно использованы на времяпролетных масс-спектрометрах с МАЛДИ-источником.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Li B., Schopfer L.M., Hinrichs S.H. et al. Matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass-spectrometry assay for organophosphorus toxicants bound to human albumin at Tyr411 // *Anal. Biochem.* 2007. V. 36. P. 263–272.
2. Гладилевич В.Д., Краснов И.А., Подольская Е.П. и др. Идентификация пептидов сывороточного альбумина, модифицированных фосфорорганическими соединениями, с применением методов хроматографии и масс-спектрометрии // *Научное приборостроение.* 2010. Т. 20, № 4. С. 84–92.
3. Read R.W., Riches J.R., Stevens J.A. et al. Biomarkers of organophosphorus nerve agent exposure: comparison of phosphorylated butyrylcholinesterase and phosphorylated albumin after oxime therapy // *Arch. Toxicol.* 2010. V. 84. P. 25–36.
4. Дубровский Я.А., Подольская Е.П., Войтенко Н.Г. и др. Идентификация алкилированных аддуктов глобина крысы методами масс-спектрометрии // *Научное приборостроение.* 2010. Т. 20, № 4. С. 77–83.
5. Maisonneuve A., Callebat I., Debordes L., Coppet L. Biological fate of sulfur mustard in rat: toxicokinetics and disposition // *Xenobiotica.* 1993. V. 23. P. 771–780.
6. Benschtop H.P., Noort D., Van der Schans G.P., De Jong L.P.A. Diagnosis and dosimetry of exposure to sulfur mustard: development of standard operating procedures; further exploratory research of protein adducts // *Final report cooperative agreement DAMD 17-97-2-7002. NTIS number: ADA381035/XAB.* 2000.
7. Fasco M.J., Stack R.F., Lu S. et al. Unique cyanide adduct in human serum albumin: potential as a surrogate exposure marker // *Chem. Res. Toxicol.* 2011. V. 24, N 4. P. 505–514.
8. Catsimpoilas N., Wood J.L. The reaction of cyanide with bovine serum albumin // *J. Biol. Chem.* 1964. V. 239. P. 4131–4137.
9. Jacobson G.R., Schaffer M.H., Stark G.R., Vanaman T.C. Specific chemical cleavage in high yield at the amino peptide bonds of cysteine and cystine residues // *J. Biol. Chem.* 1973. V. 248, N 19. P. 6583–6591.

*Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека ФМБА России (Дубровский Я.А., Мурашко Е.А., Комбарова М.Ю., Бабаков В.Н., Радилов А.С.)*

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

*Институт токсикологии ФМБА, г. Санкт-Петербург (Подольская Е.П.)*

Контакты: Дубровский Ярослав Александрович, dubrovskiy.ya@gmail.com

Материал поступил в редакцию 25.12.2012

**IDENTIFICATION OF CYANIDE ADDUCT WITH HUMAN SERUM ALBUMIN USING MASS-SPECTROMETRY****Ya. A. Dubrovskiy<sup>1,2</sup>, E. A. Murashko<sup>1</sup>, M. Yu. Kombarova<sup>1</sup>, E. P. Podolskaya<sup>2,3</sup>,  
V. N. Babakov<sup>1</sup>, N. V. Krasnov<sup>2</sup>, A. S. Radilov<sup>1</sup>**<sup>1</sup>*Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Saint-Petersburg*<sup>2</sup>*Institute for Analytical Instrumentation of RAS, Saint-Petersburg*<sup>3</sup>*Institute of Toxicology FMBA of Russia, Saint-Petersburg*

MALDI mass spectrometry was used to identify cyanide adducts with human serum albumin. Peptide with  $MH^+$  999.44 Da was detected in the tryptic digestion of human serum albumin, incubated with cyanide (sodium and potassium salts). As a result SCN adduct at Cys-34 are formed. The sequence Cys-Pro-Phe-Glu-Asp-His-Val-Lys was confirmed by HPLC-MS-MS analysis on ion trap.

*Keywords:* MALDI-TOF, ion trap, serum albumin, cyanide