

Aus dem
Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München



**Untersuchung von phosphororganischen Verbindungen, deren
Abbauprodukten und Metaboliten mittels LC-ESI-MS/MS**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Christian Ralf Walter Schmitt

aus
Schwabach

Jahr
2025

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Erstes Gutachten: Prof. Dr. Franz Worek
Zweites Gutachten: Prof. Dr. Annette Nicke
Drittes Gutachten: Prof. Dr. Michael Vogeser

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 20.03.2025

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

Untersuchung von phosphororganischen Verbindungen, deren Abbauprodukten und Metaboliten mittels LC-ESI-MS/MS

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 27.03.2025

Christian Ralf Walter Schmitt

Unterschrift

Erklärung zur Übereinstimmung der gebundenen Ausgabe der Dissertation mit der elektronischen Fassung

Hiermit erkläre ich, dass die elektronische Version der eingereichten Dissertation mit dem Titel:

Untersuchung von phosphororganischen Verbindungen, deren Abbauprodukten und Metaboliten mittels LC-ESI-MS/MS

in Inhalt und Formatierung mit den gedruckten und gebundenen Exemplaren übereinstimmt.

München, den 27.03.2025

Christian Ralf Walter Schmitt

Unterschrift

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	7
Publikationsliste	8
Abkürzungsverzeichnis	9
1 Einführung	10
1.1 Phosphororganische Verbindungen	10
1.1.1 Geschichte	10
1.1.2 chemische Strukturen	11
1.2 Vergiftungen durch phosphororganische Verbindungen	12
1.2.1 Das cholinerge System	12
1.2.2 Pathophysiologie der Organophosphatvergiftung	13
1.2.3 Therapiemöglichkeiten	14
1.3 Instrumentelle Analytik	16
1.3.1 (Hochleistungs)-flüssigkeitschromatographie, (HP)LC	16
1.3.2 Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS)	18
2 Zielsetzung	19
3 Veröffentlichungen	20
3.1 Erste Veröffentlichung	20
3.1.1 Zusammenfassung	20
3.1.2 Erklärung zum Eigenanteil	21
3.2 Zweite Veröffentlichung	28
3.2.1 Zusammenfassung	28
3.2.2 Erklärung zum Eigenanteil	29
3.3 Dritte Veröffentlichung	36
3.3.1 Zusammenfassung	36
3.3.2 Erklärung zum Eigenanteil	37
4 Zusammenfassung	44
5 Abstract	46
Literaturverzeichnis	48

Danksagung

Als Erstes möchte ich meinem Doktorvater Oberstarzt Prof. Dr. Franz Worek meinen aufrichtigen Dank aussprechen. Seine fachliche Anleitung, Geduld und wertvollen Ratschläge waren von unschätzbarem Wert und haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Bei allen Fragen und Problemen hatte Prof. Worek stets ein offenes Ohr und hat alle ihm vorgelegten Dokumente in einer bemerkenswerten Geschwindigkeit korrigiert. Durch seine enorme Fachkompetenz habe ich sehr viel lernen können.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch meiner Arbeitsgruppenleiterin Dr. Marianne Koller für die Aufnahme in Ihre Arbeitsgruppe und die Betreuung meiner Doktorarbeit. Ihre wertvollen Beiträge und Ihr kritisches Feedback haben meine Arbeit sehr bereichert. Ihre Expertise und Ermutigung haben mich motiviert, stets mein Bestes zu geben.

Weiterhin möchte ich mich bei Oberfeldarzt Dr. Niko Amend für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit an zwei Publikationen bedanken und bei Oberfeldapotheker Dr. Veronika Niessen für die äußerst kompetente Betreuung meiner Weiterbildung zum Fachapotheker für Toxikologie und Ökologie.

Ich danke ebenfalls meinen Doktorandenkollegen, die mir in den vergangenen Jahren sowohl akademisch als auch persönlich zur Seite gestanden haben. Ihr habt für schöne Momente auch außerhalb des Laboralltages gesorgt. Ein besonderer Dank gilt hier Sven Anspann, Helena Sieber und Amelie Schwab.

Weiterhin möchte ich mich bei den Kollegen meiner Arbeitsgruppe, Susanne Hänel, Jochen Rehm, Christian Nützl und Swea Lewerenz, für die großartige Einarbeitung in alle Labortätigkeiten bedanken. Ihr hattet immer ein offenes Ohr für mich und stets den passenden Rat bei allen Fragestellungen oder Problemen im Labor.

Ein herzlicher Dank gilt auch meinen Kolleginnen aus dem Nachbarlabor HptFw Natalie Boos, Sarah Kopp und Madlen Urban für die vielen lustigen Gespräche, die eine schöne und willkommene Abwechslung, neben dem oft stressigen Laboralltag, waren.

Mein tiefster Dank gilt aber meinen Eltern Sonja und Udo, für ihre bedingungslose Unterstützung und Liebe. Ohne ihre ständige Ermutigung und ihren Glauben an mich, stünde ich nicht da, wo ich jetzt bin.

Schlussendlich möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts noch für den schönen Zusammenhalt im Kollegenkreis und das gute Arbeitsklima bedanken. Die letzten Jahre mit euch zusammenzuarbeiten hat mir wahnsinnig viel Spaß gemacht.

Vielen Dank für Alles!

Christian

Publikationsliste

Publikationen der kumulativen Dissertation:

1. **C. Schmitt**, M. Koller, A. Köhler, F. Worek. Determination of tissue distribution of VX and its Metabolites EMPA and EA-2192 in various rat tissues by LC-ESI-MS/MS after phosphotriesterase treatment. *Toxicology Letters*, 398:13-18, 2024
DOI: 10.1016/j.toxlet.2024.06.003
2. N. Amend, M. Koller, **C. Schmitt**, F. Worek, T. Wille. The suitability of a polydimethylsiloxane-based (PDMS) microfluidic two compartment system for the toxicokinetic analysis of organophosphorous compounds. *Toxicology Letters*, 388:24-29, 2023
DOI: 10.1016/j.toxlet.2023.10.007
3. N. Amend, M. Koller, **C. Schmitt**, F. Worek. Toxicokinetic analysis of the highly toxic nerve agent VX in commercially available multi-organ-chips – Ways to overcome compound absorption. *Toxicology Letters*, 393:78-83, 2024
DOI: 10.1016/j.toxlet.2024.01.013

Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
BChE	Butyrylcholinesterase
ChE	Cholinesterase
CoC	cyclisches Olefin-Copolymer
CVX	chinesisches VX
DAD	Diodenarraydetektor
E 605	Parathion
EA-2192	toxischer Metabolit von VX
EMPA	Ethylmethylphosphonsäure
ESI	Elektrospray-Ionisation
g	Gramm
h	Stunde
i.v.	intravenös
kg	Kilogramm
L	Liter
LC	liquide chromatography ($\triangleq$ Flüssigchromatographie)
LD₅₀	letale Dosis
mAChR	muskarinerger Acetylcholinrezeptor
min	Minute
mol	Mol
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
nAChR	nikotinerger Acetylcholinrezeptor
OoC	Organ-on-a-Chip
PDMS	Polydimethylsiloxan
PEI	Polyethylenimin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Oxoniumionen-Konzentration
PTE	Phosphotriesterase
s.c.	subkutan
t	Zeit
µg	Mikrogramm
µmol	Mikromol
OP	Organophosphat
Q	Quadrupol
UV/vis	Ultraviolett/visible
VR	russisches VX
VX	<i>O</i> -Ethyl- <i>S</i> -2-diisopropylamino-ethylmethylphosphonothiolat
ZNS	zentrales Nervensystem
%	Prozent

1 Einführung

1.1 Phosphororganische Verbindungen

1.1.1 Geschichte

Die Erforschung phosphororganischer Verbindungen, auch Organophosphate (OP) genannt, für die Nutzung als chemische Waffe beginnt in den 30er-Jahren des 20. Jahrhunderts. Gerhard Schrader begann 1934 bei der I.G. Farbenindustrie, unter Otto Bayer, mit der Entwicklung synthetischer Insektizide [1, 2]. Ab 1936 wandte Schrader sich den Organophosphaten zu, deren toxische Wirkung einige Jahre zuvor von Lange und Krüger erstmalig beschrieben wurde [3]. Im März 1937 ließ er sich eine allgemeine Formel für alle Insektizide auf Organophosphat-Basis patentieren. Seine Arbeiten auf dem Gebiet der Organophosphat-Pestizide führten zur Synthese von über 2000 Verbindungen, darunter auch das hochgiftige Tabun (1936) und Sarin (1937) [4]. 1937 wurden Proben von Sarin und Tabun an die Abteilung für chemische Waffen des deutschen Heereswaffenamtes (Wa Prüf 9) geschickt, wo ihr Wert für militärische Zwecke sofort erkannt wurde und daher alle Patenanmeldungen zu diesen Verbindungen als geheim deklariert wurden [3, 4]. Ein weiterer Nervenkampfstoff namens Soman wurde 1944 von dem Nobelpreisträger Richard Kuhn erstmalig synthetisiert. Bis zum Ende des zweiten Weltkriegs wurden etwa 10 000 bis 12 000 Tonnen Tabun und 600 Tonnen Sarin hergestellt [3, 4].

Mittlerweile ist jedoch eine Vielzahl weiterer Substanzen bekannt, die sich von diesen phosphororganischen Verbindungen ableiten lassen und als Nervenkampfstoffe eingesetzt werden. Die OPs Sarin, Tabun, Soman und auch Cyclosarin zählen zu den Kampfstoffen der G-Reihe („G“ für Germany) [Abb. 2]. Neben den Kampfstoffen der G-Reihe gibt es auch noch die Kampfstoffe der V-Reihe („V“ für Victory) [Abb. 3], wie VX, VR und CVX. Die Erforschung dieser Nervenkampfstoffe geht auf den Chemiker Ranajit Gosh zurück, der für das britische Unternehmen Imperial Chemical Industries an Pflanzenschutzmitteln geforscht hat und auf Lars-Erik Tammelin. Dieser war im Auftrag für das Schwedische Forschungsinstitut der Verteidigung seit den 1950er-Jahren ebenfalls an der Entwicklung der V-Reihe beteiligt [2-4]. Eine weitere Klasse von Nervenkampfstoffen ist die Novichok-Reihe (russ. für „Neuling“), welche in den 1970er-Jahren in der Sowjetunion entwickelt und anschließend bis in die 1990er in Russland weiter erforscht wurden [5, 6].

Phosphororganische Verbindungen sind seit ihrer Nutzung als chemische Waffen in den letzten Jahrzehnten mehrfach eingesetzt worden. Von irakischen Streitkräften wurde im ersten Golfkrieg u.a. Tabun und Sarin eingesetzt [7]. Weiterhin kam es 1988 durch irakische Streitkräfte im irakischen Halabdscha zu einem Einsatz von Senfgas und Sarin gegen die kurdische Bevölkerung [1]. 1995 wurde bei einem Terroranschlag in der U-Bahn von Tokyo von der Aum Shinrikyo Sekte Sarin eingesetzt und dadurch 13 Menschen getötet [8]. Der Halbbruder des nordkoreanischen Staatschefs Kim Jong-un, Kim Jong-nam, wurde im Februar 2017 bei einem Attentat am Flughafen von Kuala Lumpur durch VX ermordet [9]. Weiterhin wurden 2018 der ehemalige britische Spion Sergei Skripal und seine Tochter im britischen

Salisbury durch einen Nervenkampfstoff der Novichok-Reihe schwer vergiftet [9]. Ein weiteres Attentat mit einem Novichok-Nervenkampfstoff erfolgte 2020 gegen den russischen Oppositionspolitiker Alexei Nawalny, welcher ebenfalls schwer vergiftet wurde [9, 10].

1.1.2 Chemische Strukturen

Alle OP-Nervenkampfstoffe gleichen sich in ihrer Grundstruktur, welche durch die sog. „Schrader-Formel“ beschrieben wird [Abb. 1].

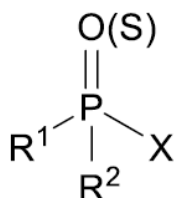


Abbildung 1: Allgemeiner Aufbau phosphororganischer Verbindungen (Schrader-Formel) nach [2]. R^1 , R^2 = Alkyl-, Alkoxy-, oder (Dialkyl)aminogruppen; X = Halogenid oder Pseudohalogenid

Wie bereits im vorherigen Kapitel erwähnt, lassen sich die als Nervenkampfstoffe verwendeten Organophosphate in 3 verschiedene Gruppen einteilen: die G-Reihe, die V-Reihe und die Novichok-Reihe. Dies ist jedoch keine chemische Einteilung der Verbindungen, sondern eher historisch durch ihre Entwicklung bedingt. Trotzdem lassen sich den einzelnen Reihen bestimmte chemische Eigenschaften zuweisen. Während es sich bei den Nervenkampfstoffen der G-Reihe [Abb. 2] um nicht-persistente und relativ flüchtige Verbindungen handelt, haben die Nervenkampfstoffe der V-Reihe [Abb. 3] eine deutlich geringere Volatilität und somit eine deutlich größere Persistenz. Ihre Konsistenz als Reinstoff wird als zähflüssig und ölarzig beschrieben [11]. Neben einer geringeren Hydrolyse-Anfälligkeit und somit höheren Stabilität im Vergleich zu den G-Stoffen, zeigt sich für V-Stoffe zusätzlich eine deutlich höhere Toxizität (LD_{50} $7 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ für VX (Ratte, i.v.) und $39 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ für Sarin (Ratte, i.v.)) [11, 12].

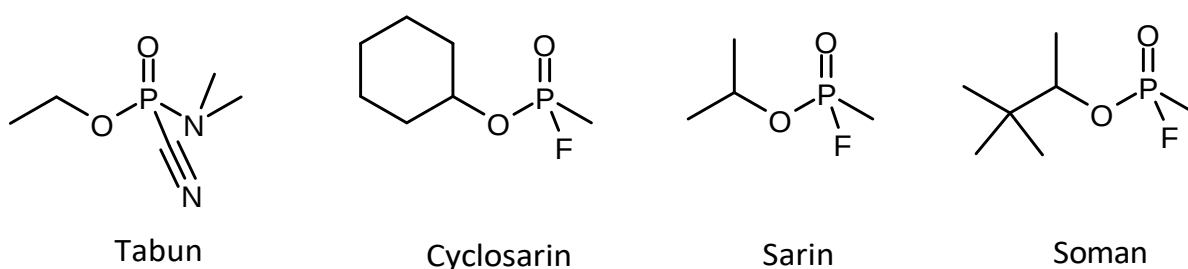


Abbildung 2: Prominente Vertreter der G-Reihe (vereinfachte Darstellung, ohne Angabe der Stereochemie)

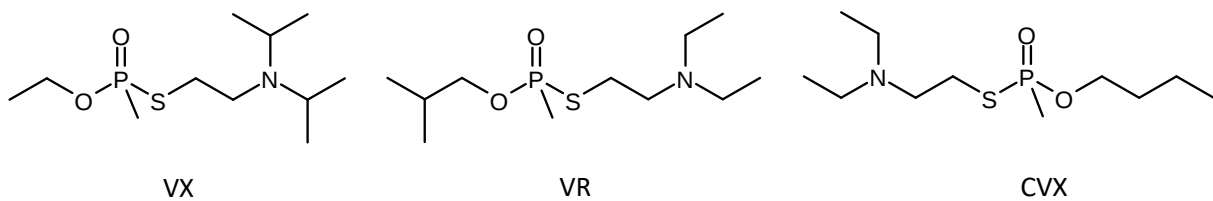


Abbildung 3: Prominente Vertreter der V-Reihe (vereinfachte Darstellung, ohne Angabe der Stereochemie)

1.2 Vergiftungen durch Phosphororganische Verbindungen

1.2.1 Das cholinerge System

Angriffspunkt einer Vergiftung mit Organophosphaten im menschlichen Körper ist das cholinerge System. Der Neurotransmitter des cholinergen Systems ist Acetylcholin und gleichzeitig einer der wichtigsten Neurotransmitter des Menschen. Cholinerge Neurone finden sich im somatischen Nervensystem an der neuromuskulären Endplatte und sind hier an der Kontraktion der quergestreiften Muskulatur beteiligt. Im vegetativen Nervensystem findet sich ACh an präganglionären Neuronen des Sympathikus und an postganglionären sympathischen Neuronen zu den Schweißdrüsen. Im Parasympathikus an prä- und postganglionären Neuronen und wirkt hier hauptsächlich an glatten Muskelzellen (Steigerung der Darmmotilität, Bronchokonstriktion, Miosis, Kontraktion der Blase) oder Drüsen (gesteigerte Sekretion in Speichel-, Tränen-, Verdauungs-, Bronchialdrüsen), aber auch am Herzen (Senkung der Erregungsleitung und Herzfrequenz) und im ZNS (Steigerung der kognitiven Leistungsfähigkeit).

Diese durch ACh vermittelten cholinergen Effekte werden postsynaptisch von zwei membranständigen Rezeptoren übertragen, den nikotinergen (nAChR) und muskarinergen (mAChR) Acetylcholinrezeptoren. Der nAChR ist ein Liganden-gesteuerter Ionenkanal (ionotroper Rezeptor) und befindet sich an der neuromuskulären Endplatte der Skelettmuskeln und in den Ganglien des vegetativen Nervensystems. Der mAChR ist hingegen ein G-Protein gekoppelter Rezeptor (metabotroper Rezeptor), welcher hauptsächlich im zentralen und parasympathischen Nervensystem vorkommt.

Ein weiteres wichtiges Protein im cholinergen System ist das Enzym Acetylcholinesterase (AChE). Dieses Enzym spielt eine entscheidende Rolle, da es den Neurotransmitter ACh im synaptischen Spalt abbaut und somit die Signalübertragung von Prä- zu Postsynapse beendet. Die AChE gehört zu der Gruppe der Cholin-Esterasen, welche Cholin-Ester (z.B. ACh) hydrolytisch spalten. Im Falle von ACh entsteht hierbei Essigsäure und Cholin. Durch diese Spaltung sorgt die AChE für eine Regulierung der Konzentration des Neurotransmitters ACh im synaptischen Spalt, was entscheidend ist für die Kontrolle und Feinabstimmung der cholinergen Reizweiterleitung. Somit trägt das Enzym wesentlich zum reibungslosen Funktionieren des kompletten Nervensystems bei, besonders bei der Regulierung vegetativer Prozesse und der Steuerung von Muskelkontraktionen [Abb. 4] [13-15].

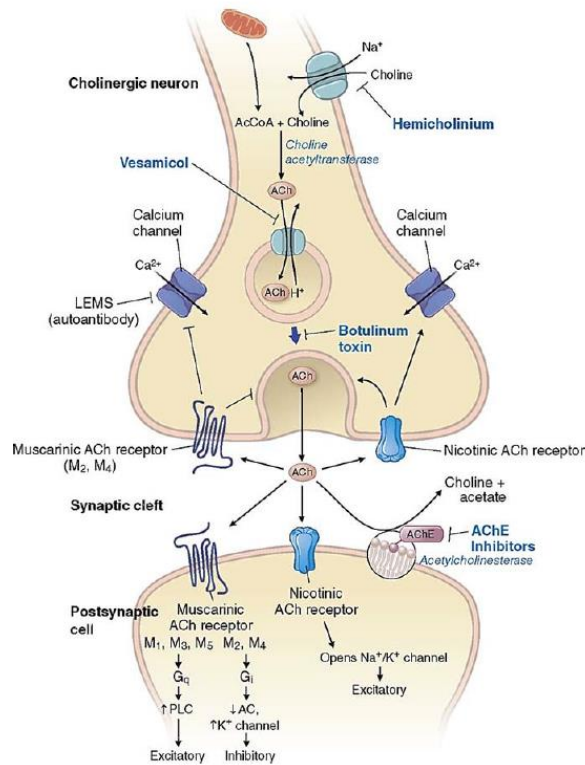


Abbildung 4: Schematische Darstellung einer cholinergen Synapse nach [15].

1.2.2 Pathophysiologie der Organophosphatvergiftung

Unabhängig von der Struktur des Organophosphats, liegt einer Vergiftung immer der gleiche Mechanismus zu Grunde, die irreversible Hemmung der AChE [16]. Wie in Kapitel 1.2.1 bereits beschrieben, sorgt die AChE für den Abbau des Neurotransmitters ACh im synaptischen Spalt und beendet somit die cholinerge Reizweiterleitung. Da die AChE nun gehemmt und somit funktionslos ist, wird ACh nicht mehr abgebaut und kumuliert im synaptischen Spalt, was schließlich zu einer Dauererregung der nAChR und mAChR an der Postsynapse bzw. neuromuskulären Endplatte führt. Unbehandelt kommt es zur cholinergen Krise und letztendlich zum Tod durch Lähmung der Atemmuskulatur [17-19].

Die hydrolytische Spaltung von ACh erfolgt durch die sog. katalytische Triade im aktiven Zentrum der AChE, an der im Wesentlichen die drei Aminosäuren Serin, Histidin und Glutamat beteiligt sind. Durch einen nucleophilen Angriff der Hydroxyl-Gruppe des Serins auf den Carbonylkohlenstoff des Acetylcholins wird zunächst, unter katalytischer Beteiligung von Glutamat und Histidin, die Acetylfunktion des Substrats auf Serin übertragen und aus der Esterbindung gelöst, wodurch Cholin freigesetzt wird. Danach erfolgt ein nucleophiler Angriff von Wasser am Carbonylkohlenstoff des Acetyl-Serin-Intermediats unter Abspaltung von Essigsäure. Serin liegt nun wieder in seinem Ausgangszustand vor. Gelangt aber anstelle von ACh ein Organophosphat-Molekül in das aktive Zentrum der Acetylcholinesterase, wird nun anstelle des Acetyl-Rests ein Phosphoryl- bzw. Phosphonyl-Rest des OP, unter Abspaltung

einer Abgangsgruppe, auf die Hydroxyl-Gruppe des Serins übertragen. Auf Grund der hohen Stabilität dieses OP-AChE-Komplexes ist die Nucleophilie des Wassermoleküls nicht mehr ausreichend, um das Organophosphat vom Serin zu lösen. Die AChE ist somit gehemmt [20-22].

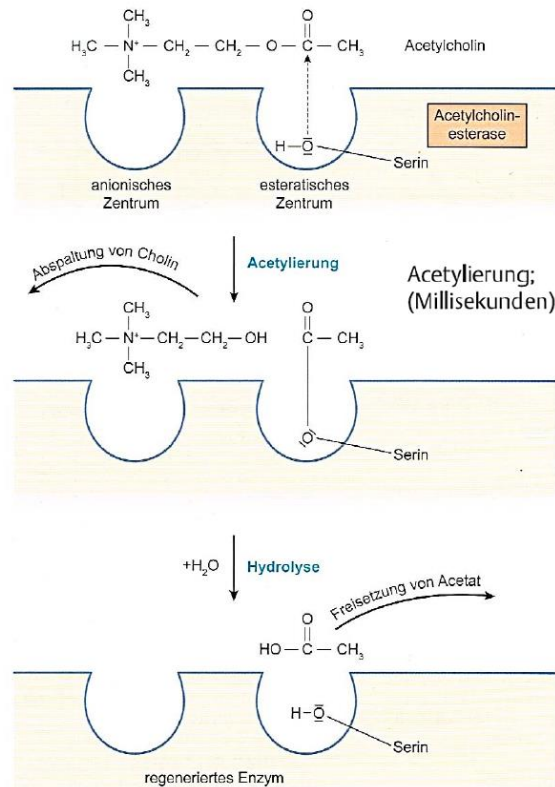


Abbildung 5: Schematische Darstellung der katalytischen Triade im aktiven Zentrum der Acetylcholinesterase nach [23].

1.2.3 Therapiemöglichkeiten

Bei einer Vergiftung durch phosphororganische Verbindungen stehen mehrere Therapieoptionen zur Auswahl. Durch die frühzeitige Gabe von Oximen (z.B. Pralidoxim oder Obidoxim) kann eine Reaktivierung der Acetylcholinesterase, durch Abspaltung des kovalent gebundenen Phosphoryl- bzw. Phosphonyl-Rests erreicht werden. Die Abspaltung erfolgt durch einen nucleophilen Angriff des Oxims auf den am Serin gebundenen Phosphoryl- bzw. Phosphonyl-Rest [Abb. 5] [24-26]. Um die muskarinergen Effekte des im synaptischen Spalt kumulierten Acetylcholins zu antagonisieren, wird das Anticholinergikum Atropin eingesetzt. Dieses wirkt durch kompetitive Inhibition der muskarinischen Acetylcholinrezeptoren, indem es Acetylcholin vom Rezeptor verdrängt und somit die Reizweiterleitung unterbricht [27]. Weiterhin werden zur Behandlung von Krämpfen und zur Neuroprotektion Benzodiazepine wie Diazepam gegeben. Zusätzlich werden zum Erhalt lebensnotwendiger Funktionen auch noch allgemeine Maßnahmen wie Beatmung, Herz-Lungen-Wiederbelebung oder Dekontamination durch Entfernung der Kleider und Reinigen der Haut durchgeführt. Leider

bringt diese Therapie einige Einschränkungen mit sich. Anticholinergika wie Atropin wirken nur auf die muskarinergen Effekte, nicht aber auf die nikotinergen [28]. Somit kann zwar einer Bronchokonstriktion entgegengewirkt werden, aber keiner Entkrampfung der Atemmuskulatur. Weiterhin müssen Oxime vor der „Alterung“ des OP-Enzym-Komplexes gegeben werden [Abb. 6]. Hier kommt es zu einer hydrolytischen Abspaltung eines Alkoxy-Rests des phosphorylierten- bzw. phosphonylierten Serins. Auf Grund dieser Alterung muss eine Oxim-Gabe möglichst frühzeitig erfolgen, da sonst eine Reaktivierung der gehemmten AChE nicht mehr möglich ist. Das Enzym bleibt dauerhaft gehemmt und eine Wiederherstellung der AChE-Aktivität ist erst wieder durch de-novo-Synthese möglich [29-31]. Weitere Einschränkungen einer Therapie mit Oximen sind zudem die schlechte Passage durch die Blut-Hirn-Schranke und die Tatsache, dass trotz jahrzehntelanger Forschung noch kein „Breitbandoxim“ verfügbar ist [25,32].

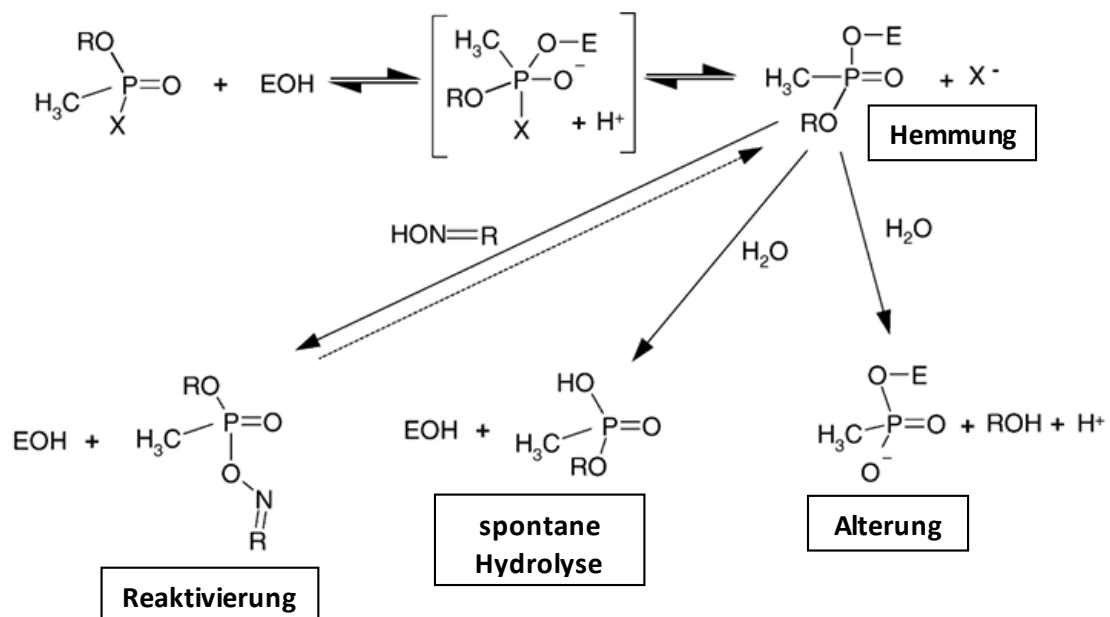


Abbildung 6: Mögliche Reaktionswege einer OP-gehemmten AChE nach [34].

Auf Grund dieser Limitationen wird intensiv an alternativen Therapieoptionen geforscht. Besonders sogenannte „Scavenger“ stehen im Fokus der aktuellen Forschung [33]. Die Wirkung beruht auf der Bindung oder Hydrolyse des Organophosphats in der Blutbahn, bevor es zu einer Hemmung der AChE in Zielorganen kommt und eine irreversible Hemmung des Enzyms stattfindet. Scavenger können in zwei Gruppen eingeteilt werden: small molecule Scavenger und Bioscavanger. Zu den small molecule Scavengern zählen cyclische Verbindungen wie Cyclodextrine oder Calixarene. Diese sind in der Lage Komplexe mit den OPs zu bilden, wodurch sie so deren toxische Wirkung verhindern. Zu den Bioscavengern zählen Enzyme wie die AChE oder die Butyrylcholinesterase (BChE), welche im menschlichen Organismus hauptsächlich in der Leber und im Blut vorkommt. Durch die Gabe von exogener, humaner AChE und BChE werden dem Körper weitere Bindungspartner, zusätzlich zu den

körpereigenen, zur Verfügung gestellt, an welche die Organophosphate binden können. Ein großer Nachteil dieser Therapie ist, dass diese Art von Bioscavengern stöchiometrisch wirken und während der Detoxifikation verbraucht werden. Dem Patienten müssen somit große Mengen zugeführt werden, was zu einem hohen Kosten- und Produktionsaufwand führt [35, 36].

Eine Alternative hierfür wären katalytisch wirksame Bioscavenger. Diese haben die Fähigkeit, OPs mittels Hydrolyse abzubauen. Dabei spalten sie die PO- bzw. PS-Bindung dieser Verbindungen, wodurch sie inaktiviert oder in ungiftigere Abbauprodukte umgewandelt werden. Da diese Bioscavenger enzymatisch wirken, stehen sie anschließend wieder für Reaktionen mit weiteren OP-Molekülen zur Verfügung. Im Vergleich zu den stöchiometrisch wirkenden Bioscavengern sind somit deutlich geringere Behandlungsmengen erforderlich [36, 37]. Phosphotriesterasen (PTE) sind eine vielversprechende Klasse von katalytisch wirksamen Bioscavengern. Sie sind Aryldialkylphosphatasen und Teil der Aminohydrolase-Proteinsuperfamilie. Weiterhin handelt es sich um Metalloenzyme, welche Zn^{2+} als zentrales Ion enthalten. Ursprünglich aus Bakterien wie *Agrobacterium radiobacter* oder *Brevundimonas diminuta* isoliert, zielt die Weiterentwicklung von PTEs durch Proteinengineering u.a. darauf ab, sowohl die katalytische Aktivität zu verbessern, als auch die enantioselektive Wirkung, insbesondere im Hinblick auf VX und dessen toxischeres (-)-VX Enantiomer [38, 39]. Dies macht sie zu äußerst aussichtsreichen Kandidaten in der Wirkstoffentwicklung bei OP-Vergiftungen [40,41].

1.3 Instrumentelle Analytik

1.3.1 (Hochleistungs)-flüssigkeitschromatographie, (HP)LC

Die Chromatographie ist eine chemisch-analytische Methode zur Auftrennung, Identifizierung und quantitativen Bestimmung der Bestandteile komplexer Substanzgemische. Während einer chromatographischen Analyse wird die Substanzmischung durch ein System aus zwei Phasen bewegt: einer stationären und einer mobilen Phase. Die stationäre Phase bleibt dabei fest bzw. unbeweglich, während die mobile Phase, welche flüssig oder gasförmig sein kann, entlang der stationären Phase fließt. Je nach ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften, verteilen sich die zu analysierenden Substanzen unterschiedlich stark zwischen stationärer und mobiler Phase. Durch diese unterschiedlich starken Wechselwirkungen werden die Analyten mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten bewegt, was schließlich zu ihrer Auftrennung führt [42, 43].

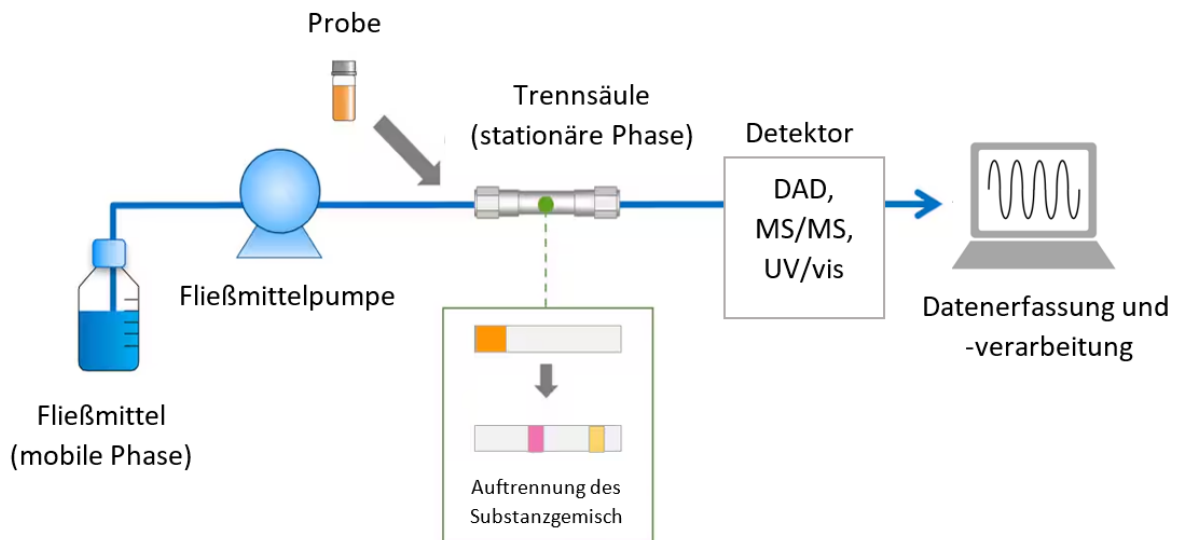


Abbildung 7: Schematischer Aufbau eines Hochleistungsflüssigkeitschromatographen nach [44].

Im Falle der (Hochleistungs)-flüssigkeitschromatographie wird die hier flüssige mobile Phase mit hohem Druck durch eine Trennsäule, welche die stationäre Phase enthält, gepumpt. Durch dieses Verfahren werden hohe Trennleistungen und schnelle Analysezeiten erreicht [Abb. 7]. Die Messung der aufgetrennten Substanzen kann durch verschiedene Typen von Detektoren erreicht werden, wie UV/vis-Detektoren, Diodenarraydetektoren (DAD) oder mit Massenspektrometern (MS). Die Ergebnisse werden in Form von Chromatogrammen dargestellt, welche die Zeitpunkte (Retentionszeiten) und Intensitäten der detektierten Signale zeigen [Abb. 8] [42,43].

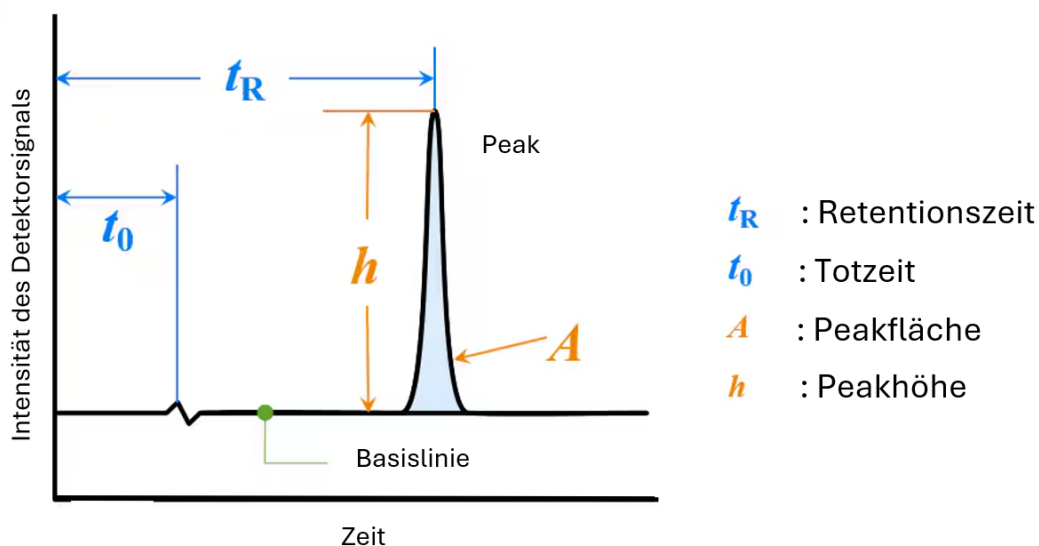


Abbildung 8: Schematische Darstellung eines Flüssigchromatogramms nach [39].

1.3.2 Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS)

Die Massenspektrometrie ist ein chemisch-analytisches Messverfahren zur Bestimmung der Masse von Atomen oder Molekülen anhand ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z). Diese Analysetechnik kann sowohl zur Strukturaufklärung und Identifizierung unbekannter Substanzen, aber auch zur Quantifizierung dieser verwendet werden. Entscheidend bei der Massenspektrometrie ist, dass nur Ionen, also geladene Atome bzw. Moleküle, erfasst werden. Diese Ionen werden bei der Kopplung des Massenspektrometers mit einem Flüssigchromatographen (LC-MS) durch Elektrospray-Ionisation (ESI), oder durch chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI) in der Ionenquelle erzeugt.

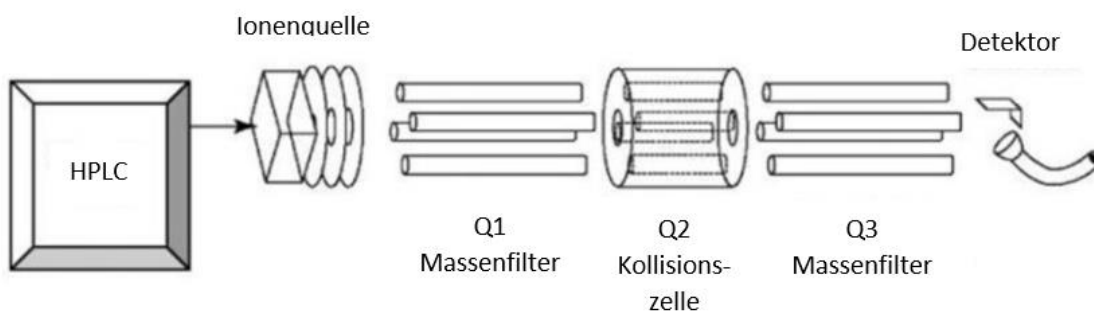


Abbildung 9: Schematische Darstellung eines Triple-Quadrupol-Massenspektrometers nach [48].

Durch Kopplung zweier Massenspektrometer (Tandem-Massenspektrometrie, MS/MS) lassen sich u.a. die Selektivität und die Empfindlichkeit (Nachweisgrenze) einer Quantifizierungsmethode deutlich verbessern, wie auch Fragmentierungen studieren. Die gängigsten Tandem-Massenspektrometer sind sog. Triple-Quadrupol-Massenspektrometer „triple quads“. Hier sind drei Quadrupole (Q1, Q2, Q3) nacheinander angeordnet. Während der Q1 und Q3 als „Massenfilter“ dienen, wird der Q2 als Kollisionskammer genutzt. Dort kollidieren die Ionen mit einem Inertgas (meist Stickstoff) und es kommt zur Fragmentierung [Abb. 9].

Die so entstandenen Fragmente/Produkt-Ionen können im Q3 nun „gescannt“ oder selektiv betrachtet werden. Wird der Q3 im Scanmodus betrieben, können alle Fragmente, die im Q1 erfassten Molekül-Ions, erfasst werden (PIS $\triangleq$ product ion scan). So sind z.B. Rückschlüsse auf die Struktur des Molekül-Ions möglich. Betreibt man den Q3 jedoch als Massenfilter einzelner Ionen, lässt sich so selektiv quantifizieren und die Empfindlichkeit der Messung enorm steigern (MRM $\triangleq$ multiple reaction monitoring) [45-47].

2 Zielsetzung

Auf Grund der sehr großen Gefahr, welche von OP-Nervenkampfstoffen ausgeht, ist die stetige Forschung auf diesem Gebiet eminent wichtig. Sei es die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten, oder die Aufklärung von Pathomechanismen. Aber auch die Etablierung neuer analytisch-chemischer Methoden spielt hier eine wichtige Rolle. Für die Verifikationsanalytik ist die Identifizierung neuer z.B. stabilerer Biomarker unabdingbar, um eine Exposition mit Nervenkampfstoffen länger nachzuweisen zu können. Weiterhin ist es ebenfalls wichtig neue Matrices für die analytischen Methoden zu erfassen, um z. B. so neue Themengebiete oder Fragestellungen zu erforschen.

Das primäre Ziel dieser Arbeit lag in der Entwicklung neuer LC-ESI-MS/MS basierter Methoden zur Bestimmung und Quantifizierung des Nervenkampfstoffs VX und seiner Metabolite EMPA und EA-2192, speziell für tierische Gewebematrizes (Leber, Niere, Herz, Milz, Muskel, Haut). Anschließend sollten die Methoden dann auf Tierproben aus einem am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr durchgeführten Tierversuch angewendet werden [40]. In diesem Tierversuch wurden neue, modifizierte PTE-Mutanten zur Behandlung einer VX-Vergiftung an Ratten getestet. Ihre Wirksamkeit auf den beschleunigten Abbau von VX wurde bereits anhand von Vollblut-Proben gezeigt. Da aber unklar war, wie sich diese Behandlung auf die VX-Verteilung im Gewebe der Tiere auswirkt, sollte dies nun mit den neuen Methoden untersucht werden. Neben der Bestätigung der Wirksamkeit des beschleunigten VX-Abbaus anhand der Gewebeproben, sollte auch noch ein Überblick gewonnen werden, wie sich VX und seine Metaboliten im Gewebe verteilen, da aus dem Tierversuch Gewebe von vergifteten, aber nicht therapierten Ratten (Kontrollen) zur Verfügung stand.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten LC-ESI-MS/MS Methoden für weitere Projekte eingesetzt werden, um die Anwendbarkeit auch für andere Matrices zeigen zu können und so die Methoden als neues Werkzeug in der Forschung zu etablieren.

3 Veröffentlichungen

3.1 Erste Veröffentlichung

Determination of tissue distribution of VX and its Metabolites EMPA and EA-2192 in various rat tissues by LC-ESI-MS/MS after phosphotriesterase treatment

C. Schmitt, M. Koller, A. Köhler, F. Worek. *Toxicology Letters*, 398:13-18, 2024.

DOI: 10.1016/j.toxlet.2024.06.003

3.1.1 Zusammenfassung

Wie in Kapitel 1.2.3 Therapiemöglichkeiten bereits angesprochen, zeigt die aktuelle Therapie von OP-Vergiftungen noch einige Einschränkungen, weshalb intensiv an alternativen Therapiemöglichkeiten geforscht wird, wie z. B. Bioscavenger. Diese binden oder hydrolysieren Nervenkampfstoffe in der Blutbahn und verhindern eine Bindung des Nervenkampfstoffs an die AChE in den Zielorganen. Von besonderem Interesse sind katalytisch wirkende Bioscavenger, z.B. Phosphotriesterasen (PTE). Zur Überprüfung der Wirksamkeit neuer, modifizierter PTE-Mutanten auf den beschleunigten Abbau von VX wurde am InstPharmToxBw ein Tierversuch mit männlichen Wistar-Ratten durchgeführt, in welchem die katalytische Aktivität dieser PTE anhand von Analysen in Vollblut-Proben bestätigt wurde. In der ersten Veröffentlichung dieser Dissertation wurde nun der Effekt dieser PTE auf den VX-Gehalt in verschiedenen Geweben der Ratten untersucht und die Wirksamkeit des beschleunigten VX-Abbaus auch in den Geweben bestätigt. Der Datensatz wurde zusätzlich durch die Untersuchung der VX-Metabolite EMPA und EA-2192, welcher selbst hoch toxisch ist, erweitert. Da VX am Phosphoratom ein chirales Zentrum besitzt, bildet es zwei Enantiomere (+)-VX und (-)-VX. Diese beiden Enantiomere wurden durch die VX-Messmethode aufgetrennt, womit das Verhältnis dieser bestimmt werden konnte. Weiterhin wurde ein Überblick über die Verteilung von VX und seiner Metabolite in den Geweben von vergifteten, aber nicht therapierten Ratten, gewonnen. Für dieses Projekt wurde Nieren-, Herz-, Leber-, Milz-, Muskel- und Hautgewebe untersucht. Weiterhin wurde die Haut mit Einstichstelle in die Untersuchung mit eingebunden, um einen möglichen Depoteffekt nachweisen zu können. Der Tierversuch beinhaltete 5 therapeutische Gruppen (Kontrollgruppe, PTE-1-Gruppe, PTE-2.1-Gruppe, PTE-2.2-Gruppe und PTE-3-Gruppe). Nach Anästhesie mit Medetomin, Midazolam und

Fentanyl wurde bei $t = 0$ min VX in einer Dosis von $25 \mu\text{g/kg}$ (s.c.; $\sim 2 \times \text{LD}_{50}$) appliziert. Bei $t = 5$ min wurden $1,0 \text{ mg/kg}$ PTE-1 (PTE-1-Gruppe), $1,3 \text{ mg/kg}$ PTE-2 (PTE-2.1-Gruppe), $2,6 \text{ mg/kg}$ PTE-2 (PTE-2.2-Gruppe), $1,4 \text{ mg/kg}$ (PTE-3-Gruppe) oder Kochsalzlösung (Kontrollgruppe) subkutan appliziert. Die Tiere der Kontrollgruppe ($n = 6$) sind im Durchschnitt nach 46 min und die Tiere der PTE-1-Gruppe ($n = 8$) im Durchschnitt nach 54 min verstorben. Die Tiere der PTE-2.1 ($n = 4$), PTE-2.2 ($n = 4$) und PTE-3-Gruppe ($n = 8$) haben bis zum Ende des Tierversuchs überlebt und wurden nach 180 min euthanasiert.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen eine deutliche Abnahme der VX-Konzentration in allen Gewebetypen nach Behandlung mit PTE-2 und PTE-3 im Vergleich zur Kontrollgruppe und PTE-1-Gruppe. Im Herz- und Lebergewebe ist kein VX mehr nachweisbar. Da es sich bei PTE-1 um den Wildtyp handelt, zeigt sich im Vergleich zur Kontrollgruppe kein großer Unterschied in den VX-Konzentrationen. Bei Betrachtung des toxischen VX-Metaboliten EA-2192 zeigt sich auch hier eine deutlich verringerte Konzentration im Vergleich zur Kontroll- und PTE-1-Gruppe. In den Konzentrationen von EMPA zeigen sich hingegen nur sehr geringe Konzentrationsunterschiede zwischen den Therapiegruppen. Hier sind weitere Untersuchungen von VX und seinen Metaboliten durch z.B. gleichzeitige Bestimmung von Gewebe- und Blutproben notwendig. Weiterhin sollte zusätzlich noch der Urin untersucht werden, da EMPA sehr hydrophil ist und nicht bekannt ist, wie viel EMPA während des Tierversuchs über den Urin ausgeschieden wurde. Durch die Auftrennung der VX-Enantiomere wurde deutlich, dass das giftigere (-)-VX durch PTE-2 und PTE-3 bevorzugt abgebaut wurde. In der Leber, Milz und im Herz war kein (-)-VX mehr nachweisbar und im Nierengewebe nur noch in sehr geringen Mengen. Ebenfalls konnte ein Depot-Effekt in der Haut bestätigt werden. Hier zeigte sich eine >1000 fache niedrigere VX-Konzentration der PTE-2 und PTE-3-Gruppe im Vergleich zur Kontroll- und PTE-1-Gruppe. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Behandlung mit den modifizierten PTE-2 und PTE-3 Mutanten zu deutlich verringerten Konzentrationen von VX und EA-2192 in den untersuchten Geweben geführt haben. Diese Ergebnisse decken sich mit den abgeschwächten klinischen Symptomen der Versuchstiere der PTE-2 und PTE-3-Gruppe und der deutlich erhöhten AChE-Aktivität der Tiere.

Die teilweise hohe Streuung der Messwerte lässt sich vorrangig auf die biologische Variabilität zwischen den Versuchstieren zurückführen. Individuelle Unterschiede in Pharmakokinetik und Pharmakodynamik, auf Grund von Unterschieden in der Enzymausstattung, metabolischer Kapazität einzelner Tiere und Unterschiede in der Aktivität von Transportproteinen können hierbei eine zentrale Rolle spielen [49].

Methodische Herausforderungen ergaben sich besonders durch die Durchführung der Messungen im niedrigen Spurenbereich, besonders im Hinblick auf die Sensitivität und Nachweisgrenze der verwendeten Methoden in den unterschiedlichen Matrices.

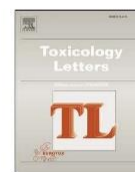
3.1.2 Erklärung zum Eigenanteil

Die Anpassung der Methoden von VX, EMPA und EA-2192 auf Gewebeproben wurde von mir durchgeführt. Weiterhin war ich für die Aufarbeitung der Gewebeproben, für die Messung und Auswertung und die grafische Darstellung der Ergebnisse verantwortlich. An der Diskussion der Messergebnisse waren neben mir, noch Franz Worek und Marianne Koller beteiligt. Das Manuskript zu dieser Studie wurde von mir geschrieben und von Marianne Koller, Anja Köhler und Franz Worek korrigiert.



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology Letters

journal homepage: www.journals.elsevier.com/toxicology-letters

Determination of tissue distribution of VX and its metabolites EMPA and EA-2192 in various rat tissues by LC-ESI-MS/MS after phosphotriesterase treatment

Christian Schmitt^{*}, Marianne Koller, Anja Köhler, Franz Worek

Bundeswehr Institute of Pharmacology and Toxicology, Neuherbergstraße 11, Munich 80937, Germany

ARTICLE INFO

Editor: Dr. Angela Mally

Keywords:

VX
Distribution
EA-2192
EMPA
Liquid chromatography
Mass spectrometry
Organs
Phosphotriesterases
Rat
Tissue

ABSTRACT

Phosphotriesterases (PTE) are a new and promising approach for the treatment of organophosphate poisoning, since the current therapy of such intoxications shows some limitations. A previous rat *in vivo* study confirmed the therapeutic effect of PTE, which were specifically designed for VX breakdown, and demonstrated rapid degradation of VX in whole blood samples. The present study now focuses on the degradation of VX and its distribution in organ tissues of the animals used in the aforementioned study. In order to gain a broader overview, we have extended the investigations to the VX metabolites EA-2192 and EMPA by using methods developed for an LC-ESI-MS/MS system. Applying these methods, we were able to verify the effectiveness of the PTE treatment and gained an overview of VX tissue distribution in poisoned but untreated rats.

1. Introduction

Organophosphorus (OP) compounds are a very heterogeneous group of chemicals with a broad range of applications. In the 1930s very toxic OP were discovered in a pesticide development program leading to further development for military use as chemical warfare agents (Sznitz, 2005). Since then, OP nerve agents have been used as chemical weapons during the Iran-Iraq war against the Kurds in Birjinni (Black et al., 1994) or in the Tokyo terroristic attack 1995 (Tu, 1996). Recent use in Syria or for poisoning of Sergei Skripal and Alexej Nawalny, respectively, show that the threat posed by these substances is still extremely acute and menacing (John et al., 2018; Steindl et al., 2021). The toxic effect of nerve agents is based on the inhibition of the enzyme acetylcholinesterase (AChE), which leads to a reduced degradation of the neurotransmitter acetylcholine in the synaptic cleft and at the neuromuscular junction. This results in an overstimulation of muscarinic and nicotinic receptors in the peripheral and central nervous system and may finally result in death (Holmstedt, 1959). *O*-ethyl *S*-(diisopropylaminoethyl) phosphonothioate (VX) is one of the most dangerous representatives of nerve agents. On the one hand, this results

from a very high toxicity (LD_{50} 7 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, rat, *i.v.*) compared to sarin (LD_{50} 103 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, rat, *i.v.*) (Aldridge and Reiner, 1972), on the other hand VX exerts a high persistence in the body and its hydrolytic cleavage is substantially slower compared to nerve agents such as sarin and tabun (Wille et al., 2014).

The current standard therapy for OP poisoning comprises the administration of atropine to counteract muscarinic effects, an oxime to remove the phosphyl moiety from the AChE and to restore the enzyme activity and an anticonvulsant for neuronal protection. Unfortunately, this therapy has some limitations, e.g. oximes have to be given in an OP-dependent time frame before the inhibited AChE is aged (2 min for soman – 40 h for VX), some OP are unsuceptible for reactivation by an oxime, or the oximes show insufficient effectiveness *per se* in some poisonings (Thiermann et al., 2013; Worek et al., 2020). Due to these limitations, alternative therapeutic options are under investigation. One of these options is to administer catalytic bioscavengers. Up to now, numerous enzymes from various organisms have been identified capable of detoxifying OP (Elsinghorst et al., 2013). New phosphotriesterase (PTE) mutants specifically designed for an accelerated breakdown of VX and other V-agents were assessed in an *in vivo* rat model previously

^{*} Corresponding author.

E-mail address: christian2schmitt@bundeswehr.org (C. Schmitt).

<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2024.06.003>

Received 12 March 2024; Received in revised form 16 May 2024; Accepted 7 June 2024

Available online 8 June 2024

0378-4274/© 2024 Published by Elsevier B.V.

(Stigler et al., 2022). In this study, the degradation of VX enantiomers by PTE was quantified in whole blood. So far, it is unknown, how therapeutic application of engineered PTE mutants might alter distribution of VX and its metabolites in different tissues. Therefore, our project now focuses on the VX distribution in organ tissues from animals of the above mentioned study. Five therapeutic groups were investigated: a VX control group and four groups with administration of three different PTEs after VX challenge: wildtype PTE-1, the mutants PTE-2 (PTE-2.1 single dose, PTE-2.2 double dose) and PTE-3. The following tissues were examined: liver, kidney, spleen, heart, muscle and skin. Since VX was applied subcutaneously, the injection site was also examined in order to be able to demonstrate a potential depot effect. In addition to VX enantiomers, (-)-VX and (+)-VX, the VX metabolites *O*-ethyl methylphosphonic acid (EMPA) and *S*-[2

(diisopropylamino)ethyl] methylphosphonothioic acid (EA-2192), which is highly toxic itself (Munro et al., 1999) were quantified. After appropriate sample preparation, the tissue samples were measured applying especially developed LC-ESI-MS/MS methods, which have already been used for previous projects (Amend et al., 2024; Amend et al., 2023).

2. Materials and methods

2.1. Materials

2.1.1. Chemicals

VX, its internal standard *O*-isobutyl *S*-(diethylaminoethyl) phosphonothioate

(VR), EA-2192 ($\geq 98.0\%$ by ^1H and ^{31}P NMR) and its internal standard *S*-[2

(diisopropylamino)ethyl] ethylphosphonothioic acid (EtVX-OH) ($\geq 99.0\%$ by ^1H and ^{31}P NMR) were made available by the German Ministry of Defence. EMPA ($\geq 99.0\%$ by ^1H and ^{31}P NMR) was obtained from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany) and its internal standard *n*-butylphosphonic acid (*n*-BPA) ($\geq 95.0\%$ by ^1H and ^{31}P NMR) from Lancaster (Newgate, UK). [Fig. 1] Ammonia solution (25 %, LiChropur for LC-MS), acetonitrile, methanol and water (LiChrosolv hypergrade for LC-MS) were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Perchloric acid (1 mol/L) and formic acid ($\geq 99.0\%$) were from VWR Chemicals

(Darmstadt, Germany). Potassium acetate ($\geq 99.0\%$, Ph.Eur. BP) and hydrochloric acid (37 %, fuming) were from Carl Roth (Karlsruhe, Germany).

2.1.2. Tissue samples

The tissue samples were collected from male wistar rats ($n = 30$) (Stigler et al., 2022). After anesthesia with a mixture of medetomidine, midazolam and fentanyl, VX was administered at a dose of $25\text{ }\mu\text{g/kg}$ (s. c.) at $t = 0\text{ min}$. At $t = 5\text{ min}$ PTE or saline for the control group ($n = 6$), were administered intravenously. The doses were 1.0 mg/kg for PTE-1 treatment group ($n = 8$), 1.3 mg/kg for PTE-2.1 ($n = 4$), 2.6 mg/kg for PTE-2.2 ($n = 4$) and 1.4 mg/kg for PTE-3 ($n = 8$). After euthanasia at $t = 180\text{ min}$ (PTE-2.1, PTE-2.2, PTE-3) or death (control group, PTE-1) the organs were removed, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at $-80\text{ }^\circ\text{C}$. The average survival time for the animals of the control group was 45.76 min and for the PTE-1 group 53.50 min .

2.1.3. Instruments

The analysis for all biomarkers was performed by an LC-ESI-MS/MS system, consisting of a 1260 Infinity II liquid chromatograph from Agilent (Waldbronn, Germany) and a Sciex 6500+ Triple Quad mass spectrometer from AB Sciex (Darmstadt, Germany). For the liquid chromatography, $10\text{ }\mu\text{L}$ of the sample were injected and the oven temperature was kept at $30\text{ }^\circ\text{C}$. For VX and EA-2192, the ESI source was used in the positive ionisation mode at 5500 V and for EMPA at -4500 V in the negative mode, respectively. For evaporation of the organic solvents, a centrifugal evaporator RVC 2–18 CD plus, performing at 1300 rpm , $21\text{ }^\circ\text{C}$ and 7.0 mbar , from Christ (Osterode, Germany) and for separation of precipitated proteins a Mikro 220 R centrifuge with a 1158-L angle rotor, performing at $10,847\text{ x g}$ and $4\text{ }^\circ\text{C}$ for 10 min , from Hettich (Tuttlingen, Germany), respectively, were used. The tissue homogenization was carried out with an Ultra Turrax T25 basic from IKA-Werke (Staufen, Germany).

2.1.4. Columns

For the analysis of VX a Chiralpak AGP column ($150\text{ mm} \times 2.1\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$) was obtained from Chiral Technologies Europe (Illkirch-Graffenstaden, France), for EMPA an Atlantis T3 column ($150\text{ mm} \times 2.1\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$) from Waters (Milford, MA, USA) and for EA2192 a Hypercarb

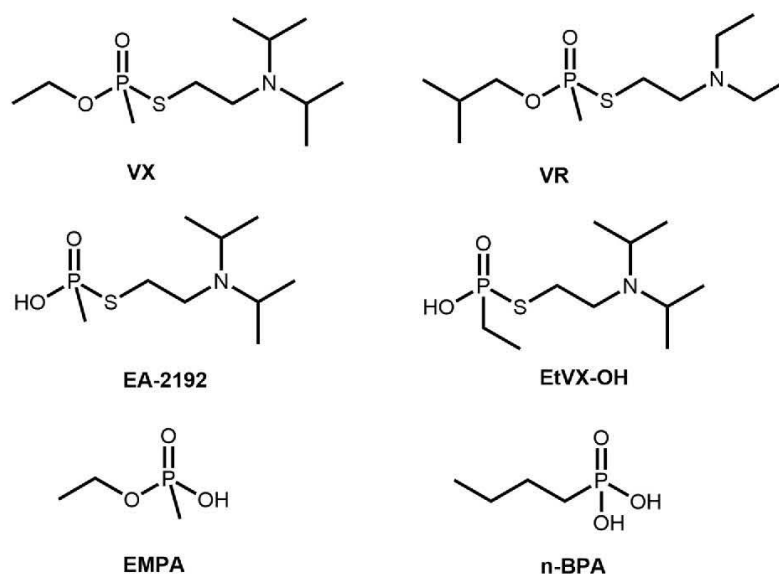


Fig. 1. Structures of VX and its metabolites EA-2192 and EMPA and their internal standards VR, EtVX-OH and *n*-BPA.

column (100 mm×2.1 mm, 5 µm) from Thermo Scientific (Rockwood, TN, USA) was used.

2.1.5. SPE cartridges

Strata-X 33 µm Polymeric Reversed Phase (30 mg, 1 mL) SPE cartridges were obtained from Phenomenex (Aschaffenburg, Germany), Isololute ENV+ (25 mg, 1 mL) SPE cartridges were from Biotage (Uppsala, Sweden) and HyperCarb HyperSep (50 mg, 1 mL) SPE cartridges were obtained from Thermo Scientific (Rockwood, TN, USA). Ep.T.P.S. Reloads (0.1 – 10 µL, 2 – 200 µL and 50 – 1000 µL) and Safe-Lock Tubes 2.0 mL were obtained from Eppendorf (Hamburg, Germany). Vials (0.3 mL and 1.5 mL) and their closure caps and were from Chromatographie Handel Müller (Fridolfing, Germany).

2.2. Analytical methods

2.2.1. Sample Preparation

After thawing the tissue samples, homogenization was achieved by mixing 1 part of tissue (1.0 g) with three parts of purified water (3 mL) in a centrifuge tube. Then, an Ultra Turrax instrument equipped with a disposable knife was used at 13,500 rpm for 6 cycles of 10 s under ice cooling to prevent overheating of the sample. After homogenization was complete, the homogenate was aliquoted to 0.25 mL in 2.0 mL Safe-Lock Tubes and stored at –80° C until further use.

2.2.2. VX

The volume for processing samples of all biomarkers was 0.25 mL each. VX enantiomers in the samples were quantified by LC-ESI-MS/MS as described before (Amend et al., 2024; Amend et al., 2023) with slight modifications. In short, for protein precipitation 37.5 µL perchloric acid (1 mol/L) and 7.5 µL potassium acetate (1 mol/L) were added and subsequently centrifuged at 4 °C and 10,847 x g for 10 min. After the supernatant was transferred to a new 2.0 mL safe-lock tube, the pH was increased by addition of 50 µL ammonia hydroxide (0.5 %). Subsequently, after spiking them with 10 µL of the internal standard solution (VR, 1 ng/µL in acetonitrile), the samples were introduced to pre-conditioned Strata-X 33 µm SPE cartridges and sucked through by moderate vacuum. The cartridges were then washed with water and dried under full vacuum. Elution was achieved with 0.5 mL acetonitrile which was collected in a Safe-Lock Tube containing 50 µL of purified water as keeper. After evaporation of the acetonitrile, the samples were made up to 0.2 mL with purified water and placed in the autosampler of the LC system for analysis. Separation of the enantiomers was performed by gradient elution applying the following gradient program: 90 % A (ammonium formate buffer, 25 mmol/L, pH 8.5) at a flow rate of 0.175 µL/min, which was held for 3 min. Between 3 and 23 min, the mobile phase changed to 50 % A, which was held for 3 min. Finally, between 26 and 27 min, the mobile phase returned to 90 % A which was held for 5 min. B consisted of ammonium formate buffer (25 mmol/L, pH 8.5) in 50 % methanol. The detection of the compounds was achieved by the following transitions: m/z 268.1 → 128.1, 86.0 (VX) and m/z 268.1 → 100.1, 72.2 (VR).

2.2.3. EMPA

EMPA was quantified by LC-ESI-MS/MS as described before (Amend et al., 2024) with slight modifications. In short, the 0.25 mL samples were mixed with 10 µL of the internal standard n-BPA (1 ng/µL in methanol). For protein precipitation, 75 µL of concentrated hydrochloric acid was added, vortexed and subsequently centrifuged at 4 °C and 10,847 x g for 10 min. In the next step, the supernatant was added to preconditioned (1 mL methanol, 1 mL purified water) ENV+ cartridges and sucked through by moderate vacuum. The cartridges were then washed with water and dried under full vacuum. Elution was achieved with 1 mL of a solution, consisting of 49.5 % purified water, 50 % methanol and 0.5 % ammonia solution, which was collected in a Safe-Lock Tube containing 50 µL of purified water as keeper. After

evaporation of the methanol and ammonia, the samples were made up to 1 mL with purified water and placed in the autosampler of the LC system for analysis. The LC-analysis was performed by gradient elution applying the following gradient program: 90 % A (0.5 % formic acid) and 10 % B (20 % formic acid (1.0 %) and 80 % methanol) at a flow rate of 0.2 mL/min was held for 1 min. Between 1 and 6 min the mobile phase changed to 50 % A which was held for 1 min. After that, the mobile phase returned to 90 % A between 7 and 8 min and was held for 6 min. The detection of the compounds was achieved by the following transitions: m/z 123.0 → 94.8, 78.9 (EMPA) and m/z 137.0 → 78.9, 62.9 (n-BPA).

2.2.4. EA-2192

The toxic metabolite EA-2192 in the samples was quantified by LC-ESI-MS/MS as described before (Amend et al., 2024) with slight modifications. In short, for protein precipitation 37.5 µL perchloric acid (1 mol/L) and 7.5 µL potassium acetate (1 mol/L) were added and subsequently centrifuged at 4 °C and 10,847 x g for 10 min. After the supernatant was transferred to a new 2.0 mL safe-lock tube, 0.2 mL of formate buffer (25 mM, pH 8.5) and 10 µL of the internal standard solution (EtVX-OH, 1 ng/µL in 2-propanol) was added. Subsequently, the samples were introduced to preconditioned (1 mL methanol, 2 × 1 mL ammonium formate buffer, 25 mM, pH 8.5) HyperCarb cartridges and sucked through by moderate vacuum. The cartridges were then washed with water and dried under full vacuum. Elution was achieved with 1.0 mL methanol which was collected in a Safe-Lock Tube containing 50 µL of ammonium formate buffer (25 mM, pH 8.5) as keeper. After evaporation of the methanol, the samples were made up to 1.0 mL with purified water and placed in the autosampler of the LC system for analysis. The LC-analysis was performed by gradient elution applying the following gradient program: 50 % A (purified water) and 50 % B (100 % methanol) at a flow rate of 0.175 mL/min was held for 2 min. Between 2 and 3 min the mobile phase changed to 0 % A which was held for 5 min. After that, the mobile phase returned to 50 % A between 8 and 10 min which was held for 5 min. The detection of the compounds was achieved by the following transitions m/z 240.2 → 128.2, 86.1 (EA-2192) and 254.3 → 162.0, 153.0, 128.2 (EtVX-OH).

2.2.5. Data analysis

Data processing was performed using Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). The figures were created with GraphPad Prism Version 9.5.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) and ChemDraw Professional Version 21.0.0.28 (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA). Data are presented as means ± SD.

3. Results

The results of this study confirm the efficacy of the optimized PTE-2 and PTE-3 mutants as post-VX exposure treatment, compared to wild type PTE-1 and the control group, due to a considerably reduced accumulation of VX in the different tissue types. This is clearly shown in the heart and liver, where VX is no longer detectable due to successful treatment with the modified PTEs. In skin, spleen, muscle and kidney VX is at a very low level (Fig. 2).

The distribution of the VX enantiomers also show the effectiveness of PTE-2 and PTE-3. In the control group, the more toxic (-)-VX is found in all organ tissues except the liver. In wildtype PTE-1, (-)-VX is still found in the kidney and muscle and at a very low level in the spleen. In PTE-2.1, PTE-2.2 and PTE-3 a tiny (-)-VX concentration is only found in the kidney (Fig. 3).

The levels of the toxic metabolite EA-2192 also showed a notable reduction in all tissues after the successful PTE treatment. In the control and PTE-1 group, highest EA-2192 concentrations were found in kidney and liver. In PTE-2.1, PTE-2.2 and PTE-3 groups very low EA-2192 levels were determined in all organs (Fig. 2).

Only little difference in EMPA levels between the different groups

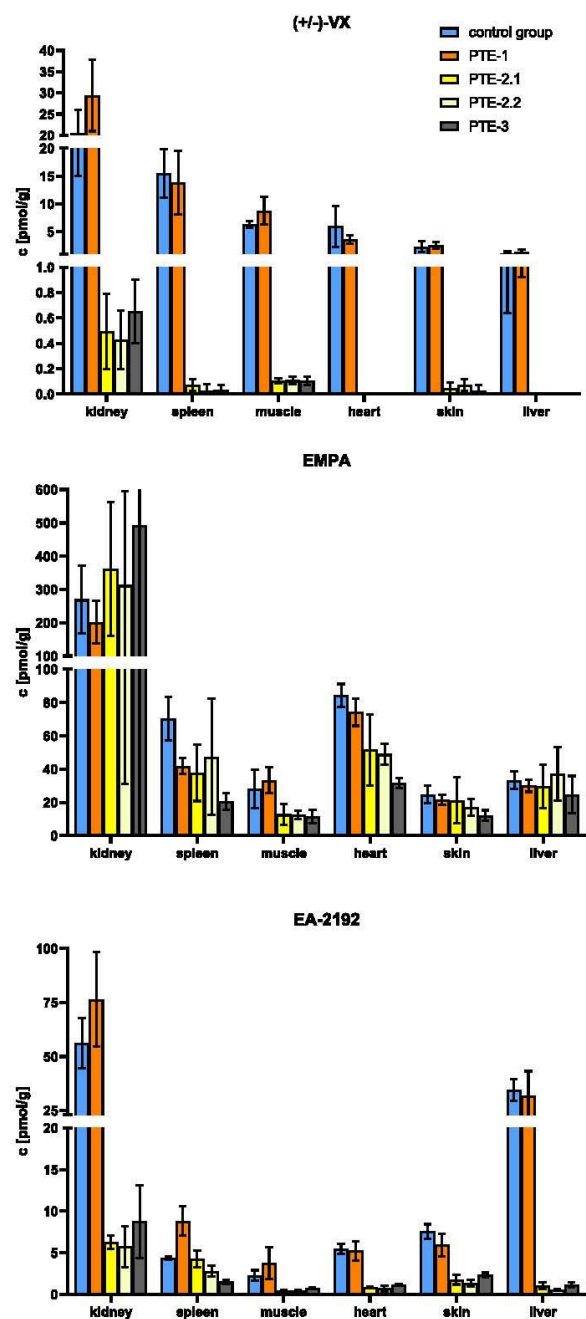


Fig. 2. Concentration of (+/-)-VX and its metabolites EMPA and EA-2192 in different tissues of male Wistar rats in [pmol/g] (n = 8 or n = 6 for control group, mean $\pm$ SD). The average survival time for the animals of the control group was 45.76 min, for the PTE-1 group 53.5 min, for PTE-2.1, PTE-2.2 and PTE-3 180 min until euthanasia.

was found in all organ tissues.

Furthermore, a depot effect of VX was demonstrated by examining the skin with the puncture site (right inguinal region). In comparison to normal skin (left thigh), clearly increased levels of VX were measured in the control and PTE-1 group. After administration of PTE-2 (single and

double dose) and PTE-3, a strong reduction of the VX levels, as well as EMPA and EA-2192 was observed (Table 1). In contrast to other tissues (Fig. 3) the ratio of VX enantiomers was comparable within the different groups.

4. Discussion

The aim of the current study was to investigate the effect of PTE treatment on VX levels in rat tissue samples. Stigler et al. (2022) already demonstrated the therapeutic efficacy and accelerated VX degradation in blood by the optimized mutants PTE-2 and PTE-3 administered to VX-poisoned rats. The optimized PTE mutants, PTE-2 and PTE-3, exhibit a significantly improved in vitro catalytic activity (k_{cat}/K_m $21 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ and $38 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$, respectively) compared to wild type PTE-1 (k_{cat}/K_m $0.02 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$) and show a marked elongation of their biological half-life (165 min for PTE-2, 94 min for PTE-3 vs 39 min for PTE-1) due to PASylation (Stigler et al., 2022). These modifications are essential for effective and rapid VX degradation, as VX shows high stability and long persistence in vivo (Goldsmith et al., 2017; van der Schans et al., 2003). In our study, we were now able to demonstrate the efficacy of optimized PTE mutants in different rat tissues by examining liver, spleen, kidney, skin, muscle, heart and the skin with injection site. VX tissue concentration is markedly lower after treatment with PTE-2 and PTE-3 compared to control and PTE-1 groups with no detectable VX in heart and liver samples (Fig. 2).

These results are consistent with the data from Stigler et al. (2022) based on whole blood VX levels at $t = 180 \text{ min}$, below quantification limit in the PTE-2 and PTE-3 groups, and at time of death in the control and PTE-1 groups. The low catalytic efficacy of wild-type PTE towards VX was already shown by Masson and Rochu, (2009) and Kolakowski et al. (1997).

Furthermore, PTE-2 and PTE-3 were designed to increase the degradation of the more toxic VX enantiomer (-)-VX. This enantioselective degradation was already confirmed by Köhler et al. (2021) in vitro and by Stigler et al., (2022) in blood samples of VX poisoned rats. Our data also show an increased degradation of (-)-VX in tissue samples by PTE-2 and PTE-3. (-)-VX is no longer detectable in the liver, spleen, muscle and heart and only found at a very low level in kidney tissue. In contrast, relevant (-)-VX concentrations were determined in tissue samples from animals of the control group and to less extent of PTE-1 group.

To expand the data set, the VX metabolites EMPA and EA-2192 were additionally analysed. It turned out that EA-2192 concentration was markedly lower in all organs after treatment with PTE-2 and PTE-3 compared to the control and PTE-1, particularly in the liver and kidney. In contrast, only small differences of EMPA levels were determined between the groups (Fig. 2). This observation requires further investigation by simultaneous analysis of VX, EMPA and EA-2192 in blood and tissue samples of VX poisoned animals.

Former studies (Chilcott et al., 2005) have already shown that lipophilic nerve agents such as VX form depots in the skin, which can result in a continuous release into systemic circulation and a long persistence of toxic VX levels (van der Schans et al., 2003). In fact, high VX concentrations were determined in skin puncture sites in control and PTE-1 groups while the respective VX concentrations were >1000fold lower in PTE-2 and PTE-3 groups (Table 1). Most likely, this was due to on-site VX degradation in the latter groups. In addition, EMPA and EA-2192 concentrations were substantially lower in PTE-2 and PTE-3 groups which may be due to distribution of the agents into systemic circulation within the longer survival time (180 min).

In conclusion, the effective therapy of VX-poisoned rats with the optimized PTE-2 and PTE-3 mutants resulted in a low to negligible VX concentrations in the tested organs. This finding correlates with virtually absent clinical signs and significantly higher tissue AChE activities in PTE-2 and PTE-3 treated animals (Stigler et al., 2022). In addition, the tissue concentration of the toxic VX metabolite EA-2192 was markedly

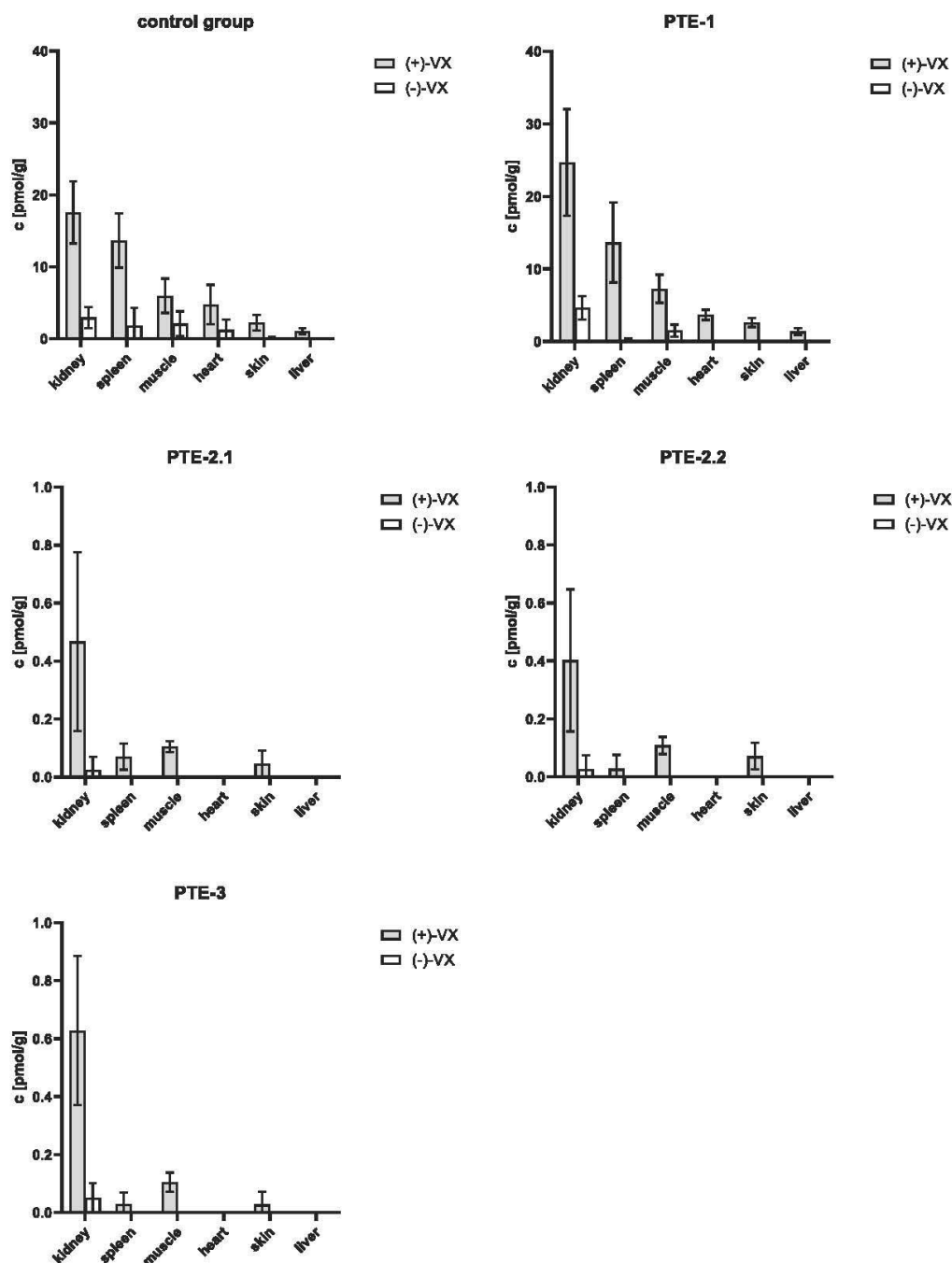


Fig. 3. Concentration of (+)-VX and (-)-VX in different tissues of male wistar rats in [pmol/g] (n = 8 or n = 6 for control group, mean $\pm$ SD).

lower in both groups compared to control and PTE-1 groups. The presented analytical protocol for the quantitative analysis of VX enantiomers, EMPA and EA-2192 in tissue samples provides a valuable tool for further studies on the distribution of VX in different tissues and perspective of the toxicokinetics of these agents in blood and tissue.

CRediT authorship contribution statement

Anja Köhler: Writing – review & editing, Resources. **Franz Worek:** Writing – review & editing, Supervision, Resources, Project administration. **Christian Schmitt:** Writing – original draft, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation. **Marianne Koller:** Writing – review & editing, Conceptualization.

Table 1

Concentration [pmol/g] of (+/-) - VX, EMPA and EA2192 in skin puncture site (n = 8 or n = 6 for control group; mean ± SD).

Group	VX	EMPA	EA2192
control	2233 ± 1612	602.8 ± 372.8	16.92 ± 4.17
PTE-1	1015 ± 859	296.6 ± 185.2	9.21 ± 3.83
PTE-2.1	2.34 ± 1.28	55.76 ± 25.06	1.10 ± 0.31
PTE-2.2	1.11 ± 0.79	46.03 ± 28.49	1.20 ± 0.14
PTE-3	7.92 ± 12.98	34.18 ± 17.23	1.96 ± 0.51

Table 2

Concentration [pmol/g] of (+)-VX and (-)-VX in skin puncture site, (n = 8 or n = 6 for control group; mean ± SD).

group	(+)-VX	(-)-VX
control	1144 ± 800	1089 ± 814
PTE-1	599.0 ± 475.6	416.3 ± 390.7
PTE-2.1	1.96 ± 1.03	0.38 ± 0.30
PTE-2.2	0.90 ± 0.58	0.21 ± 0.23
PTE-3	5.33 ± 8.24	4.74 ± 4.74

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data Availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

The authors are grateful to J. Rehm, S. Hänel, C. Nützl and S. Lewenz for excellent technical assistance.

References

- Aldridge, W.N., Reiner, E., 1972. Enzyme Inhibitors as Substrates. Monographie 26, 1–172.
- Amend, N., Koller, M., Schmitt, C., Worek, F., Wille, T., 2023. The suitability of a polydimethylsiloxane-based (PDMS) microfluidic two compartment system for the toxicokinetic analysis of organophosphorus compounds. *Toxicol. Lett.* 388, 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2023.10.007>.
- Amend, N., Koller, M., Schmitt, C., Worek, F., 2024. Toxicokinetic analysis of the highly toxic nerve agent VX in commercially available multi-organ-chips - ways to overcome compound absorption. *Toxicol. Lett.* 393, 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2024.01.013>.
- Chilcott, R.P., Dalton, C.H., Hill, I., Davison, C.M., Blohm, K.L., Clarkson, E.D., Hamilton, M.G., 2005. In vivo skin absorption and distribution of the nerve agent VX (O-ethyl-S-2-(diisopropylamino)ethyl methylphosphonothioate) in the domestic white pig. *Hum. Exp. Toxicol.* 24, 347–352. <https://doi.org/10.1191/0960327105ht5370a>.
- van der Schans, M.J., Lander, B.J., van der Wiel, H., Langenberg, J.P., Benschop, H.P., 2003. Toxicokinetics of the nerve agent (+/-)-VX in anesthetized and atropinized hairless guinea pigs and marmosets after intravenous and percutaneous administration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 191, 48–62. [https://doi.org/10.1016/s0041-008x\(03\)00216-3](https://doi.org/10.1016/s0041-008x(03)00216-3).
- Elsinghorst, P.W., Worek, F., Thiermann, H., Wille, T., 2013. Drug development for the management of organophosphorus poisoning. *Expert Opin. Drug Discov.* 8, 1467–1477. <https://doi.org/10.1517/17460441.2013.847920>.
- Goldsmith, M., Aggarwal, N., Ashani, Y., Jubran, H., Greisen, P., Ovchinnikov, J.R., Leader, S., Baker, H., Sussman, D., Goldenzweig, J.L., Fleishman, A., Tawfik, S.J., D. S., 2017. Overcoming an optimization plateau in the directed evolution of highly efficient nerve agent bioscavengers. *Protein Eng. Des. Sel.* 30, 333–345. <https://doi.org/10.1093/protein/gzx003>.
- Holmstedt, B., 1959. Pharmacology of organophosphorus cholinesterase inhibitors. *Pharmacol. Rev.* 11, 567–688.
- John, H., van der Schans, M.J., Koller, M., Spruit, H.E.T., Worek, F., Thiermann, H., Noort, D., 2018. Fatal sarin poisoning in Syria 2013: forensic verification within an international laboratory network. *Forensic Toxicol.* 36, 61–71. <https://doi.org/10.1007/s11419-017-0376-7>.
- Kolakowski, J.E., DeFrank, J.J., Harvey, S.P., Szafraniec, L.L., Beaudry, W.T., Lai, K., Wild, J.R., 1997. Enzymatic Hydrolysis of the Chemical Warfare Agent VX and its Neurotoxic Analogues by Organophosphorus Hydrolase. *Biotransformation* 15, 297–312. <https://doi.org/10.3109/10242429709003196>.
- Masson, P., Rochu, D., 2009. Catalytic bioscavengers: the next generation of bioscavenger-based medical countermeasures, in: Gupta R (ed). *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*. Academic Press, London, pp. 1053–1065.
- Munro, N.B., Talmage, S.S., Griffin, G.D., Waters, L.C., Watson, A.P., King, J.F., Hauschild, V., 1999. The sources, fate, and toxicity of chemical warfare agent degradation products. *Environ. Health Perspect.* 107, 933–974. <https://doi.org/10.1289/ehp.99107933>.
- Steindl, D., Boehmerle, W., Körner, R., Praeger, D., Haug, M., Nee, J., Schreiber, A., Scheibe, F., Demin, K., Jacoby, P., Tauber, R., Hartwig, S., Endres, M., Eckardt, K.-U., 2021. Novichok nerve agent poisoning. *Lancet (Lond., Engl.)* 397, 249–252. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32644-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32644-1).
- Stigler, L., Köhler, A., Koller, M., Job, L., Escher, B., Potschka, H., Thiermann, H., Skerra, A., Worek, F., Wille, T., 2022. Post-VX exposure treatment of rats with engineered phosphotriesterases. *Arch. Toxicol.* 96, 571–583. <https://doi.org/10.1007/s00204-021-03199-6>.
- Szincz, L., 2005. History of chemical and biological warfare agents. *Toxicology* 214, 167–181. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.06.011>.
- Thiermann, H., Worek, F., Kehe, K., 2013. Limitations and challenges in treatment of acute chemical warfare agent poisoning. *Chem. - Biol. Interact.* 206, 435–443. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2013.09.015>.
- Tu, A.T., 1996. Basic information on nerve gas and the use of sarin by aum shinrikyo. plenary lecture at the biological mass spectrometry conference, Seto, Aichi, Japan July 3–6, 1995. *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn* 44 (3), 293–319.
- Wille, T., Thiermann, H., Worek, F., 2014. In vitro kinetics of nerve agent degradation by fresh frozen plasma (FFP). *Arch. Toxicol.* 88, 301–307. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1130-5>.
- Worek, F., Thiermann, H., Wille, T., 2020. Organophosphorus compounds and oximes: a critical review. *Arch. Toxicol.* 94, 2275–2292. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02797-0>.

3.2 Zweite Veröffentlichung

The suitability of a polydimethylsiloxane-based (PDMS) microfluidic two compartment system for the toxicokinetic analysis of organophosphorous compounds

N. Amend, M. Koller, **C. Schmitt**, F. Worek, T. Wille. *Toxicology Letters*, 388:24-29, 2023
DOI: 10.1016/j.toxlet.2023.10.007

3.2.1 Zusammenfassung

Organ-on-a-Chip-Modelle sind eine neue und vielversprechende Technologie in der Biomedizin und bieten vielfältige Möglichkeiten für Forschung und Entwicklung, gerade auch im Hinblick auf toxikologische Fragestellungen. Leider gibt es immer noch gewisse Einschränkungen in Bezug auf Material, Aufbau und Anwendbarkeit dieser Technologie. Einige Studien weisen darauf hin, dass eine große Einschränkung in der Anwendung von Organchips für toxikokinetische Studien die Absorption gerade bei sog. „small molecules“, wie z.B. Medikamente, durch das Chip-Material PDMS bestehen könnte. Zur Lösung dieser Problematik wird von einigen Autoren die Modifizierung der Chips mit lipophilen Beschichtungen vorgeschlagen, um dieser Absorption entgegenzuwirken. Aber auch dies könnte weitere Probleme mit sich bringen, da viele Organchips auf unbeschichtetes PDMS angewiesen sind, um ihre Permeabilität und Biokompatibilität zu erhalten. In der zweiten Veröffentlichung dieser Dissertation wurde nun die Eignung von kommerziell erhältlichen Organchips auf PDMS-Basis mit zwei Kompartimenten (Leber- und neuronale Spheroide) zur Durchführung von toxikokinetischen Studien des Nervenkampfstoffes VX und des Organophosphat-Pestizids Parathion geprüft. Beide zählen auf Grund ihrer niedrigen Molekulargewichte, VX (MW = 267 g/mol) und Parathion (291 g/mol), zu den niedermolekularen Substanzen. Die Messung der VX-Proben wurde mittels LC-ESI-MS/MS Technik durchgeführt. Diese speziell für Gewebe-Matrizes entwickelte Messmethode wurden in diesem Projekt erfolgreich angewendet, um eine mögliche Nutzbarkeit auch für andere Matrizes zu demonstrieren.

Nach erfolgreicher Aufarbeitung und Messung der Proben, zeigte sich für beide Substanzen ein schneller Rückgang der initialen Konzentrationen von 1000 µmol/l bzw. 100 µmol/l. In den Chips, die 1000 µmol/l VX als Startkonzentration enthielten, waren nach 72 h nur noch 17 % der ursprünglichen VX-Dosis (Spheroide) bzw. 14 % der VX-Dosis (Kontrolle) zu finden. Für die rapide Abnahme der VX-Konzentration wurden mehrere Möglichkeiten diskutiert. Zum einen kann eine hydrolytische Spaltung von VX mit Wasser dafür verantwortlich sein. Jedoch gibt es Studien, die für VX in Wasser (pH 7) deutlich längere Halbwertszeiten, zwischen 17 und 42 Tagen, beschreiben. Bei pH-Werten <6 und >10 können die Halbwertszeiten aber auch wesentlich geringer sein. Trotzdem kann hier eine relativ hohe hydrolytische Stabilität von VX

angenommen werden, da der hier verwendete Organchip ein gepuffertes System (pH 7) darstellt. Metabolismus, als weiteren Grund für die beschleunigte Konzentrationsabnahme, scheint ebenfalls unwahrscheinlich, da sich die VX-Konzentrationen nach 72 h nicht signifikant von den Konzentrationen der zellfreien Kontrollen unterschieden. Ein weiterer Punkt, der hierfür spricht, wäre, dass es keine Präferenz bei der Abnahme der beiden VX-Enantiomere gibt, welche ebenfalls bestimmt wurden. Es ist bekannt, dass in biologischen Systemen das giftigere (-)-VX stärker an die Cholinesterasen (ChE) gebunden wird. Bei der Vermessung der Parathion-Proben zeigte sich, dass die Parathion-Konzentration sogar noch schneller abnimmt als die von VX. Hier war nach 72h 99 % (1000 $\mu\text{mol/l}$) bzw. 100 % (100 $\mu\text{mol/l}$) des Parathions nicht mehr nachweisbar. Schon nach 2 h waren mehr als 90 % der ursprünglich eingesetzten Parathion-Dosis (100 $\mu\text{mol/l}$ und 1000 $\mu\text{mol/l}$) nicht mehr nachweisbar. Eine weitere Möglichkeit für die rasche Konzentrationsabnahme von VX und Parathion kann die Absorption der Substanzen durch das Chipmaterial PDMS sein, was bereits in früheren Studien beschrieben wurde. Es ist bekannt, dass die Wechselwirkung einer Substanz mit PDMS vom Molekulargewicht, der Polarität und der Hydrophobie des Moleküls abhängt und dass Verbindungen, die hydrophob und weniger polar sind, mit größerer Wahrscheinlichkeit von PDMS absorbiert werden. Trotzdem ist es nicht vollständig möglich, das Ausmaß der Absorption einer chemischen Verbindung mit dem Chipmaterial vorherzusagen. Zusammenfassend lässt sich zeigen, dass für die toxikokinetische Untersuchung von Organophosphaten ein Organchip auf PDMS-Basis nicht geeignet ist. Um dem Problem der Absorption zu entgehen, sollten alternative Kunststoffe als Chipmaterialien geprüft werden, wie z.B. cyclische Olefin-Copolymere oder Beschichtungen der PDMS-Chips mit lipophilen Verbindungen, wie Polyethylenimin.

3.2.2 Erklärung zum Eigenanteil

Die toxikokinetischen Untersuchungen von VX und Parathion mittels PDMS-basiertem Organchip-Modell, sowie die Entnahme der Proben wurden von Niko Amend durchgeführt. Dieser zeigte sich ebenfalls hauptverantwortlich für das komplette Projekt. Die Durchführung, Aufarbeitung, massenspektrometrische Vermessung und die grafische Darstellung, der aus dem Organchip entnommenen Proben hinsichtlich VX, wurde von mir durchgeführt. Für die Bearbeitung der Proben des Organophosphat-Pestizids Parathion zeigte sich Marianne Koller verantwortlich. Weiterhin war ich zusammen mit Niko Amend, Marianne Koller, Franz Worek und Timo Wille an der Diskussion der Ergebnisse beteiligt. Der Hauptteil des Manuskripts wurde von Niko Amend verfasst, während ich den Material- und Methodenteil für VX beigesteuert habe. Marianne Koller hat den Material- und Methodenteil hinsichtlich Parathion ergänzt. An der Korrektur des Manuskripts waren maßgeblich Marianne Koller, Franz Worek und Timo Wille beteiligt.



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology Letters

journal homepage: www.journals.elsevier.com/toxicology-letters

The suitability of a polydimethylsiloxane-based (PDMS) microfluidic two compartment system for the toxicokinetic analysis of organophosphorus compounds

Niko Amend^{a,*}, Marianne Koller^a, Christian Schmitt^a, Franz Worek^a, Timo Wille^{a,b}

^a Bundeswehr Institute of Pharmacology and Toxicology, Neuherbergstrasse 11, 80937 Munich, Germany

^b Department F, Medical CBRN Defence, Bundeswehr Medical Academy, Ingolstädter Str 240, Munich 80939, Germany

ARTICLE INFO

Editor: Dr. Angela Mally

Keywords:

Organ-on-a-chip
Nerve agent
VX
Spheroids
Toxicokinetics

ABSTRACT

Organ-on-a-chip platforms are an emerging technology in experimental and regulatory toxicology (species-specific differences, ethical considerations). They address gaps between in vivo and in vitro models. However, there are still certain limitations considering material, setup and applicability. The current study examined the suitability of a commercially available polydimethylsiloxane-based (PDMS) organ-chip for the toxicokinetic characterization of the highly toxic nerve agent VX and the organophosphate pesticide parathion. The respective concentrations of 1000 $\mu\text{mol/L}$ and 100 $\mu\text{mol/L}$ VX and parathion were chosen deliberately high in order to study concentrations even if high compound absorption by PDMS might occur. Neuronal and liver spheroids, totaling 2×10^6 cells were used to study concentration changes of VX and parathion. In addition, VX enantiomers were quantified. The current study suggests a significant absorption of VX, respectively parathion by PDMS. This might require future investigation of alternative materials or coatings to limit absorption for organophosphorus compounds in toxicokinetic studies.

1. Introduction

Highly-toxic organophosphorus (OP)-based nerve agents have recently been used in the Syrian civil war and for the assassination attempts on Sergei Skripal and Alexei Navalny (John et al., 2018; Vale et al., 2018; Hulse et al., 2019; Steindl et al., 2021). The therapy of nerve agent poisoning has virtually been unchanged for decades, comprising the muscarinic receptor antagonist atropine, an oxime for the reactivation of OP-inhibited acetylcholinesterase (AChE) and an anticonvulsant (Cannard, 2006; Thiermann et al., 2013; Amend et al., 2020). A major limitation in antidote development is that in vitro experiments and in vivo animal studies produce varying results, depending on the respective laboratory, species or model (Worek et al., 2016). In OP poisoning, different species show highly varying results concerning the inhibition and reactivation kinetics of AChE (Herkert et al., 2010). Besides, certain enzymes, e.g. carboxylesterases, differ in their ability to detoxify nerve agents, contributing to varying LD₅₀ doses, depending on the respective species (Maxwell et al., 1987). In general, the translational success rate of animal-to-human research seems to be insufficient (Leenaars et al., 2019).

The 3R Principle (Replacement, Reduction and Refinement) (Russell, 1959) has accelerated ethical considerations in research using animals (Wu et al., 2020). Studies on toxic effects of candidate drugs focused on the Reduction of animal trials and stressed the Refinement of methods (Törnqvist et al., 2014). However, in 2022 the U.S. Food and Drug Administration (FDA) decided that new drugs no longer need to be tested in animals to receive FDA approval (Wadman, 2023). This decision might boost organ-on-a-chip (OoC) technology to Replace animal trials in the upcoming years (Wadman, 2023). Microfluidic chips may be able to mimic the environment of a physiological organ (Wu et al., 2020). In addition, the technology might also be a promising approach to reproduce human clinical responses to novel drugs (Ingber, 2022). Nevertheless, this novel technology still has certain limitations concerning the cells, OoC design technology and quantification of effects (Danku et al., 2022). The current study examined whether a commercially available organ chip, using liver and neuronal spheroids, might be a suitable tool for toxicokinetic characterization of the highly toxic nerve agent VX and the organophosphate pesticide parathion. The respective concentrations of VX and parathion were quantified. In addition, VX enantiomers were quantified, since the more toxic P(–)

* Corresponding author.

E-mail address: nikoamend@bundeswehr.org (N. Amend).

<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2023.10.007>

Received 4 August 2023; Received in revised form 5 October 2023; Accepted 6 October 2023

Available online 10 October 2023

0378-4274/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

enantiomer has previously drawn some attention since enzymatic degradation (previously shown in mutants of the *Brevundimonas diminuta* phosphotriesterase) might preferably hydrolyze the P(–) variant (Bigley et al., 2013) (Fig. 1).

A 3D humanized spheroid model was chosen, to mimic physiological cell architecture and behavior in a more complex way compared to traditional 2D models (Baptista et al., 2022). In fact, complex 3D cell culture models are expected to improve the prediction of pharmacological and toxicological models (Baptista et al., 2022). The current experiments comprised liver spheroids that were already characterized for OP exposure and neuronal spheroids due to commercial availability (L Koenig and Marx, 2018; Horn et al., 2023). For toxicokinetic studies, the material used to manufacture the chips might be important, with regard to interaction of material and tested compounds. The most widely used material to manufacture chips is polydimethylsiloxane (PDMS) (Campbell et al., 2021; Danku et al., 2022; Ingber, 2022). PDMS can be poured into the respective OoC design casting mould and hardens after a period of time (Danku et al., 2022). This polymer has several advantages, such as high gas permeability and low cytotoxicity (Danku et al., 2022; Nitsche et al., 2022). In biochemistry and pharmacology, it is known that PDMS might absorb small molecules to some extent depending on several factors, among them are hydrophobicity and molecular weight (van Meer et al., 2017; Gökaltun et al., 2019; Herland et al., 2020; Grant et al., 2021). In toxicology, only few publications are available that address this issue (Yang et al., 2020; Akarapipad et al., 2021; Nitsche et al., 2022). Nevertheless, Ching et al. suggested that absorption of small molecules by PDMS might have effects on the use of organ-chips in toxicology (Ching et al., 2021). The current study set out to investigate the suitability of a PDMS-based OoC system for the toxicokinetic characterization of the highly toxic nerve agent VX and the organophosphate parathion.

2. Materials and methods

2.1. Organ on a chip and cell culture

The HUMIMIC Chip2 liver- and neurospheres co-culture model was obtained from TissUse (Berlin, Germany). The liver spheroids were cultured as described previously, using 1000 human stellate cells and 24,000 HepaRG cells per spheroid with a total of 40 spheroids per compartment, respectively 1×10^6 cells (Tao et al., 2023). The neuronal spheroids were differentiated as described previously in a bioreactor to a total amount of 1×10^6 cells (L Koenig and Marx, 2018). Prior to postal delivery, the chips were filled with a cold storage solution that was prepared as described previously in the Institute of Physiological Chemistry (Essen, Germany) (Tigges et al., 2021). The experiments were performed using co-culture medium (TissUse). Besides, the chips were connected to the HUMIMIC starter platform (TissUse) providing a pulsatile flow at 0.5 Hz and 500 mBar (50 kPa; Fig. 2).

Each compartment of the HUMIMIC Chip2 contained 700 μ L of co-culture medium, totaling a volume of 1.4 mL in both compartments. For analytics, the respective sample amount of 10 μ L was removed at 2, 8, 24, 48 and 72 h. The OP VX (O-ethyl S-(diisopropylaminoethyl) phosphonothioate; > 98% by 1H and 31P NMR) was made available by the German Ministry of Defence. Parathion was obtained from LGC (> 98%). VX and parathion stock solutions of 100 mmol/L were prepared in

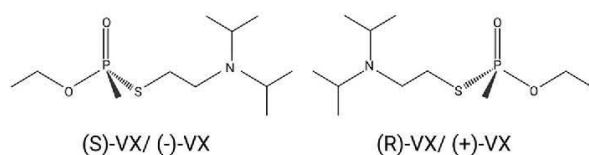


Fig. 1. Illustration of the respective enantiomers of VX. The P(–) variant is considered more toxic (Bigley et al., 2013).



Fig. 2. The HUMIMIC starter platform (TissUse, Berlin, Germany) with the respective HUMIMIC Chip2 experimental setup for the determination of VX toxicokinetics.

acetonitrile (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany). Working solutions of each compound of 1000 μ mol/L and 100 μ mol/L were prepared in co-culture medium.

2.2. Analytics

2.2.1. Materials

Strata-X 33 μ m Polymeric Reversed Phase (30 mg, 1 mL) SPE cartridges were obtained from Phenomenex (Aschaffenburg, Germany), Isolute ENV+ (25 mg, 1 mL) SPE cartridges were from Biotage (Uppsala, Sweden) and HyperCarb HyperSep (50 mg, 1 mL) SPE cartridges were obtained from Thermo Scientific (Rockwood, TN, USA).

2.2.2. Chemicals

VX and VR (> 98.0% by 1H and 31P NMR) were made available by the German Ministry of Defence. Fenitrothion as internal standard was purchased from LGC Standards. Ammonia solution (25%, LiChropur for LC-MS), acetonitrile, methanol and water (LiChrosolv hypergrade for LC-MS) were obtained from Merck (Darmstadt, Germany) and 1-chlorobutane (Chromasolv for HPLC) was obtained from Sigma-Aldrich. Perchloric acid (1 mol/L in aqueous solution) and formic acid ($\geq 99.0\%$) were from VWR Chemicals (Darmstadt, Germany). Potassium acetate ($\geq 99.0\%$, Ph.Eur. BP) and hydrochloric acid (37%, fuming) were from Carl Roth (Karlsruhe Germany).

2.2.3. Instruments

The analysis of VX was performed by an LC-ESI-MS/MS system, consisting of a 1260 Infinity II liquid chromatograph from Agilent Technologies (Waldbronn, Germany) and a Sciex 6500 + Triple Quad mass spectrometer from AB Sciex (Darmstadt, Germany). For the liquid chromatography 10 μ L of the sample were injected and the oven temperature was kept at 30 $^{\circ}$ C. The ESI source was used in the positive ionisation mode at 5500 V. For evaporation of the organic solvents, a centrifugal evaporator RVC 2–18 CD plus, performing at 1300 rpm, 21 $^{\circ}$ C and 7.0 mbar, from Christ (Osterode, Germany) was used.

The GC-MS system used for analysis of parathion consisted of a 7890 A gas chromatograph and a 5977B mass spectrometer, both from Agilent Technologies. The system was equipped with a cold injection system (CIS 4) from Gerstel (Mülheim a.d. Ruhr, Germany) which was programmed in the solvent venting mode for injection of 5 μ L. Helium 6.0, further passed over a drying and oxygen absorbing material, was used as carrier gas at a constant flow rate of 1.3 mL/min.

2.2.4. Columns

For the analysis of VX, a Chiralpak AGP column (150 mm × 2.1 mm, particle size 5 µm) was obtained from Chiral Technologies Europe (Illkirch-Graffenstaden, France). Parathion was analysed using a VF-5 ms column of 30 m length, 2.5 mm diameter and of 2.5 µm film thickness from Agilent Technologies.

2.2.5. Analytical methods

2.2.5.1. VX. The sample volume for the analysis of all products was 10 µL each. For the determination of VX enantiomers, the 10 µL samples were diluted with purified water to 0.25 mL. The samples were mixed with 37.5 µL perchloric acid (1 mol/L) and 7.5 µL potassium acetate (1 mol/L) and subsequently vortexed. Afterwards, 50 µL ammonia hydroxide (0.5%) was added and again vortexed and 10 µL of the internal

standard VR (1 ng/µL) was spiked to the samples. Then the mixture was passed over preconditioned (1 mL methanol, 1 mL purified water) Strata-X 33 µm Polymeric Reversed Phase SPE cartridges. After absorption, the cartridges were washed with 1 mL purified water and dried under vacuum for 5 min. For elution, 0.5 mL acetonitrile was added into the cartridge and the acetonitrile was removed by vacuum into 2 mL Safe-Lock Tubes filled with 50 µL purified water. For evaporation of the acetonitrile, the tubes were placed in a centrifugal evaporator for 45 min. After this procedure, the samples were diluted with purified water to 200 µL and were placed into the autosampler of the LC system for analysis. The liquid chromatography was performed by gradient elution applying the following gradient program: 90% A (ammonium formate buffer, 25 mmol/L, pH 8.5) at a flow rate of 0.175 µL/min, which was held for 3 min. Between 3 and 23 min, the mobile phase changed to 50% A, which was held for 3 min. Finally, between 26 and

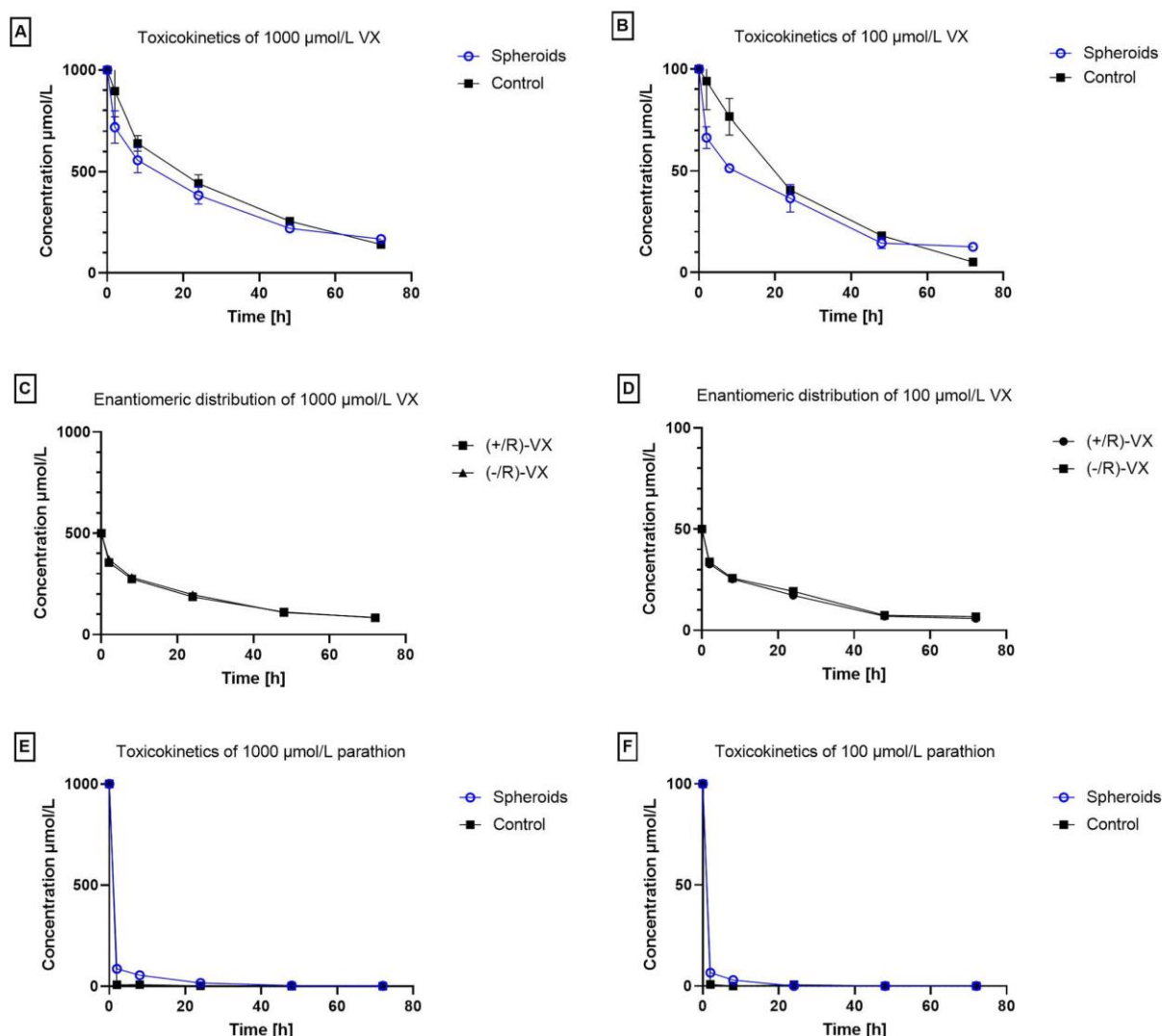


Fig. 3. The toxicokinetics of the nerve agent VX and the organophosphate pesticide parathion in a two-compartment organ-on-a-chip system comprising liver and neuronal spheroids, totaling 1×10^6 cells per compartment. A) and B) show the toxicokinetics of VX in a concentration of 1000 µmol/L, respectively 100 µmol/L. Control values were obtained from cell-free chips. C) and D) illustrate the respective concentrations of the enantiomers of VX. E) and F) show the toxicokinetics of parathion (1000 µmol/L, respectively 100 µmol/L). All results are presented as means ± SD and all results were obtained in three chips. The respective concentrations at t = 0 h, were 1000 µmol/L, respectively 100 µmol/L VX.

27 min, the mobile phase returned to 90% A which was held for 5 min. B consisted of ammonium formate buffer (25 mmol/L, pH 8.5) in 50% methanol. The mass spectrometer parameters were set automatically during the MS tune procedure for the following transitions: m/z 268.1 $\rightarrow$ 128.1, 268.1 $\rightarrow$ 86.0 (VX) and m/z 268.1 $\rightarrow$ 100.1, 268.1 $\rightarrow$ 72.2 (VR).

2.2.6. Parathion

Liquid/liquid extraction with 1-chlorobutane was applied to isolate parathion from the reaction mixture: First, the sample (10 μ L) was made up to 1 mL with purified water and spiked with 20 μ L of internal standard solution (fenitrothion 1 μ g/mL in acetonitrile). Then it was overlaid with 1 mL solvent and extracted in an overhead shaker for 15 min. After collecting the organic layer, the extraction procedure was repeated, the solvent portions were combined and the volume was then reduced to 500 μ L in a vacuum concentrator centrifuge. Gas chromatographic analysis started at 50 °C (1 min hold), the temperature was raised to 180 °C (no hold) at a rate of 30 °C/min and further to 220 °C (2 min hold) at a rate of 5 °C/min. Finally, the column was heated to 280 °C (5 min hold) at a rate of 40 °C/min.

2.3. Data analysis

Data processing was performed using GraphPad Prism Version 9.51 (GraphPad Software, San Diego, CA) and Microsoft Excel 2010 (Microsoft, Redmond, WA, USA). Data are presented as means $\pm$ SD. Statistics were determined by two-way ANOVA with Bonferroni multiple comparison test. $P < 0.05$ was considered to be statistically significant.

3. Results

The toxicokinetics of the nerve agent VX and the organophosphate pesticide parathion (1000 μ mol/L and 100 μ mol/L) were determined in a two-compartment organ-on-a-chip-system (Fig. 3). The liver and neuronal compartment comprised 1×10^6 cells per compartment. The concentrations of VX and parathion were compared to cell-free control chips (Fig. 3 A, B, E, F).

After 8 h, 557 ± 62 μ mol/L VX were detected in the chip containing 1000 μ mol/L VX, respectively 51 ± 1 μ mol/L VX in the chip containing 100 μ mol/L. The VX decrease in spheroid-filled chips seemed to be faster than cell-free control chips in the first 8 h but was only significantly different from control in the chip comprising 100 μ mol/L VX. The final concentration of VX after 72 h was 168 ± 19 μ mol/L VX in the chip containing 1000 μ mol/L and 13 ± 1 μ mol/L VX in the chip containing 100 μ mol/L. The results in both organ-chips at this timepoint were not significantly different from control. There was no preferential hydrolysis of either VX enantiomer in the current study (Fig. 3 C, D).

The concentrations of parathion showed an even steeper decline. After 2 h, $87 \mu\text{mol/L} \pm 4 \mu\text{mol/L}$ parathion in the chip containing 1000 μ mol/L were found, respectively $7 \mu\text{mol/L} \pm 1 \mu\text{mol/L}$ in the chip with 100 μ mol/L parathion. These results were not significantly different from control. After 72 h, $2 \mu\text{mol/L} \pm 1 \mu\text{mol/L}$ could be detected (chip with 1000 μ mol/L parathion). In the chip with the low parathion concentration (100 μ mol/L), no parathion at all could be found. These results were not significantly different from control.

4. Discussion

The current study set out to examine the suitability of a commercially available PDMS-based two compartment OoC model comprising liver and neuronal spheroids for a toxicokinetic characterization of the highly toxic nerve agent VX and the organophosphate pesticide parathion. A major limitation in the suitability of organ-chips for toxicokinetic studies might be the absorption of small molecules by PDMS (Toepke and Beebe, 2006; van Meer et al., 2017; Gökaltun et al., 2019). Previous cell culture studies indicated that PDMS might for example absorb the antihypertensive drug nifedipine to an extent of approximately 40%

(van Meer et al., 2017). Another PDMS-based OoC platform which was assessed for a regulatory toxicology program showed varying results concerning absorption depending on the compound and the respective assay (Eckstrum et al., 2020; Eckstrum et al., 2022). Some authors suggest the use of lipophilic coatings to counteract this absorption (van Meer et al., 2017). However, many organ-chips rely on uncoated PDMS to retain their gas permeability and biocompatibility (Low et al., 2021). In spite of these material limitations, organ-chips are considered a versatile tool in pharmacokinetics to model ADME (absorption, distribution, metabolism, and excretion) (Low et al., 2021). In the current PDMS-based OoC, the concentrations of the small molecule organophosphorus compounds VX (MW 267 g/mol) and parathion (MW 291 g/mol) show a rapid decline which require further explanation (Fig. 3 A, B, E, F). Besides, the VX enantiomers were quantified. It is well known that the P(–) variant is more toxic and that some enzymes might preferentially hydrolyze the more toxic P(–) enantiomer (Bigley et al., 2013). So far, this has been shown in mutants of the *Brevundimonas diminuta* phosphotriesterase. In the present study, there was no preference for either enantiomer.

As Fig. 3 highlights, in the chip containing 1000 μ mol/L VX, only 17% of the initial VX dose (spheroids), respectively 14% of the VX dose (control) can be found after 72 h. Since the control did not contain any cells, further explanation seems mandatory. A possible explanation for the low VX concentration in both, the control and in the chip containing spheroids might have been the hydrolysis of VX in water. However, available data suggests that the half-life of VX in water (pH 7) ranges between 17 and 42 days (Munro et al., 1999). At pH values < 6 and > 10 the half-life of VX might be essentially lower (Munro et al., 1999). The current organ-chip is a buffered system. Thus, it might be reasonable to assume a rather high hydrolytic stability of VX. Furthermore, another, at least, theoretically possible explanation for the rapid decline in VX concentrations might have been the metabolism of VX by the liver and neuronal spheroids. However, as Fig. 3 highlights, VX concentrations after 72 h were not different from cell-free controls. A previous study using VX in an organ-on-a-chip system did not address the issue of compound absorption (Goralski et al., 2023).

The organophosphate parathion showed after 2 h a concentration of $87 \mu\text{mol/L} \pm 4 \mu\text{mol/L}$ in the chip containing 1000 μ mol/L, respectively $7 \mu\text{mol/L} \pm 1 \mu\text{mol/L}$ in the chip with 100 μ mol/L parathion. Hence, more than 90% of parathion were unaccounted for after 2 h. Interestingly, parathion - like VX - is described as very stable in buffered aqueous solutions (Agency for Toxic Substances and Disease Registry (US), 2017). Abiotic degradation half-lives of parathion of at least several weeks have been described before (Agency for Toxic Substances and Disease Registry (US), 2017). After 72 h, 99% (1000 μ mol/L parathion), respectively 100% (100 μ mol/L) parathion was unaccounted for. A study by Liu et al. characterized a different, low volume platform to study the effect of OP pesticides on a three-dimensional brain microphysiological system (Liu et al., 2019). The platform, based on glass and a low compound-absorbing polymer indicated a relatively low absorption for parathion (Liu et al., 2019). However, with a total volume of 100 μ L, compared to 1400 μ L in the current system, toxicokinetic studies might be difficult: As previous studies indicated, the typically small chip volumes in organ-chips might be a challenge for multiple sample acquisition (Wu et al., 2020; Danku et al., 2022). Due to this limitation, experimental setup might rely on end point analyses (Leung et al., 2022). In the current toxicokinetic study, these effects were minimized by five small volume samplings of 10 μ L per sample from a total volume of 1.4 mL per chip. In general, the interaction of a compound with chip PDMS depends on molecular weight, polarity and hydrophobicity of the molecule (Eckstrum et al., 2022). Hence, compounds that are hydrophobic and less polar are more likely to be absorbed by PDMS (Eckstrum et al., 2022). Nevertheless, it is not entirely possible to predict the extent of compound absorption prior to the experiment, since other factors e.g., the polar surface area (PSA) also contribute to the absorption (Schaffenaar and Vlieg, 2012; van Meer et al., 2017). To counteract the

problem of absorption of these small molecule compounds, it might be reasonable to assess alternative polymers e.g., polyolefins such as cyclic olefin polymers (COP) and cyclic olefin copolymers (Galateanu et al., 2022). In conclusion, the current study of the highly toxic nerve agent VX and the OP pesticide parathion showed that the investigated PDMS-based OoC system will not be suitable for the toxicokinetic study of organophosphorus compounds. Alternative materials or the coating of PDMS surfaces with lipophilic compounds should be investigated.

Declaration of Competing Interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: Prof. Dr. Franz Worek is a member of the Editorial Board of Toxicology Letters Dr. Niko Amend is Executive Guest Editor of the Special Issue in Toxicology Letters.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

The authors are grateful to Jochen Rehm, Susanne Hänel, Christian Nützl and Svea Lewerenz for expert technical assistance.

References

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (US), 2017. Toxicological Profile for Parathion, Atlanta (GA).
- Akarapipad, P., Kaarij, K., Liang, Y., Yoon, J.-Y., 2021. Environmental toxicology assays using organ-on-chip. *Annu. Rev. Anal. Chem.* 14 (1), 155–183. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-091620-091335>.
- Amend, N., Niessen, K.V., Seeger, T., Wille, T., Worek, F., Thiermann, H., 2020. Diagnostics and treatment of nerve agent poisoning-current status and future developments. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1479 (1), 13–28. <https://doi.org/10.1111/nyas.14336>.
- Baptista, L.S., Porcini, C., Kronemberger, G.S., Kelly, D.J., Perrault, C.M., 2022. 3D organ-on-a-chip: the convergence of microphysiological systems and organoids. *Front. Cell Dev. Biol.* 10, 1043117. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.1043117>.
- Bigley, A.N., Xu, C., Henderson, T.J., Harvey, S.P., Raushel, F.M., 2013. Enzymatic neutralization of the chemical warfare agent VX: evolution of phosphotriesterase for phosphorothiolate hydrolysis. *J. Am. Chem. Soc.* 135 (28), 10426–10432. <https://doi.org/10.1021/ja402832z>.
- Campbell, S.B., Wu, Q., Yazbeck, J., Liu, C., Okhovatani, S., Radisic, M., 2021. Beyond polydimethylsiloxane: alternative materials for fabrication of organ-on-a-chip devices and microphysiological systems. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 7 (7), 2880–2899. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.0c00640>.
- Cannard, K., 2006. The acute treatment of nerve agent exposure. *J. Neurol. Sci.* 249 (1), 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2006.06.008>.
- Ching, T., Toh, Y.-C., Hashimoto, M., Zhang, Y.S., 2021. Bridging the academia-to-industry gap: organ-on-a-chip platforms for safety and toxicology assessment. *Trends Pharmacol. Sci.* 42 (9), 715–728. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2021.05.007>.
- Danku, A.E., Dulf, E.-H., Braicu, C., Jurj, A., Berindan-Neagoe, I., 2022. Organ-on-a-chip: a survey of technical results and problems. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 10, 840674. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.840674>.
- Eckstrum, K., Striz, A., Ferguson, M., Zhao, Y., Welch, B., Solomotis, N., Olejnik, N., Sprando, R., 2020. Utilization of a model hepatotoxic compound, diglycolic acid, to evaluate liver organ-chip performance and in vitro to in vivo concordance. *Food Chem. Toxicol.: Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 146, 111850. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111850>.
- Eckstrum, K., Striz, A., Ferguson, M., Zhao, Y., Sprando, R., 2022. Evaluation of the utility of the Beta human liver emulsion system (BHLES) for CFSAN's regulatory toxicology program. *Food Chem. Toxicol.: Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 161, 112828. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.112828>.
- Galateanu, B., Hudita, A., Biru, E.I., Iovu, H., Zaharia, C., Simsensohn, E., Costache, M., Petca, R.-C., Jinga, V., 2022. Applications of polymers for organ-on-chip technology in urology. *Polymers* 14 (9). <https://doi.org/10.3390/polym14091668>.
- Gökaltun, A., Kang, Y.B.A., Yarmush, M.L., Usta, O.B., Asatekin, A., 2019. Simple surface modification of poly(dimethylsiloxane) via surface segregating smart polymers for biomicrofluidics. *Sci. Rep.* 1 (5). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43625-1>.
- Goral, T.D.P., Jenkins, C.C., Angelini, D.J., Horsmon, J.R., Dhummakupt, E.S., Rizzo, G.M., Simmons, B.L., Liem, A.T., Roth, P.A., Karavis, M.A., Hill, J.M., Sekowski, J.W., Glover, K.P., 2023. A novel approach to interrogating the effects of chemical warfare agent exposure using organ-on-a-chip technology and multiomic analysis. *PLoS One* 18 (2), e0280883. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0280883>.
- Grant, J., Özkan, A., Oh, C., Mahajan, G., Prantil-Baun, R., Ingber, D.E., 2021. Simulating drug concentrations in PDMS microfluidic organ chips. *Lab a chip* 21 (18), 3509–3519. <https://doi.org/10.1039/d1lc00348h>.
- Herkert, N.M., Aurbek, N., Eyer, P., Thiermann, H., Worek, F., 2010. Comparative study of oxime-induced reactivation of erythrocyte and muscle AChE from different animal species following inhibition by sarin or paraoxon. *Toxicol. Lett.* 194 (3), 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.02.007>.
- Hetland, A., Maoz, B.M., Das, D., Somayaji, M.R., Prantil-Baun, R., Novak, R., Counce, M., Huffstater, T., Jeanty, S.S.F., Ingram, M., Chalkiadaki, A., Benson Chou, D., Marquez, S., Delahanty, A., Jalili-Firoozinezhad, S., Milton, Y., Sontheimer-Phelps, A., Swenor, B., Levy, O., Parker, K.K., Przekwas, A., Ingber, D.E., 2020. Quantitative prediction of human pharmacokinetic responses to drugs via fluidically coupled vascularized organ chips. *Nat. Biomed. Eng.* 4 (4), 421–436. <https://doi.org/10.1038/s41551-019-0498-9>.
- Horn, G., Kranawetvogl, T., John, H., Weigel, C., Rauen, U., Worek, F., Wille, T., 2023. Human HepaRG liver spheroids: cold storage protocol and study on pyridinium oxime-induced hepatotoxicity in vitro. *Chem. Biol. Interact.* 369, 110285. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.110285>.
- Hulse, E.J., Haslam, J.D., Emmett, S.R., Woolley, T., 2019. Organophosphorus nerve agent poisoning: managing the poisoned patient. *Br. J. Anaesth.* 123 (4), 457–463. <https://doi.org/10.1016/j.bja.2019.04.061>.
- Ingber, D.E., 2022. Human organs-on-chips for disease modelling drug development and personalized medicine. *Nat. Rev. Genet.* 23 (8), 467–491. <https://doi.org/10.1038/s41576-022-00466-9>.
- John, H., van der Schans, M.J., Köller, M., Spruit, H.E.T., Worek, F., Thiermann, H., Noort, D., 2018. Fatal sarin poisoning in Syria 2013: forensic verification within an international laboratory network. *Forensic Toxicol.* 36 (1), 61–71. <https://doi.org/10.1007/s11419-017-0376-7>.
- L. Koenig U. Marx Prod. Hum. Induc. pluripotent stem Cell-Deriv. cortical neurospheres DASbox® mini Bioreact. Syst.: Eppendorf Appl. Note 364 2018.
- Leenaars, C.H.C., Kouwenaar, C., Stafleu, F.R., Bleich, A., Ritskes-Hoitinga, M., Vries, R. B.M., de Meijboom, F.L.B., 2019. Animal to human translation: a systematic scoping review of reported concordance rates. *J. Transl. Med.* 17 (1), 223. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-1976-2>.
- Leung, C.M., Haan, P., de, Ronaldson-Bouchard, K., Kim, G.-A., Ko, J., Rho, H.S., Chen, Z., Habibovic, P., Jeon, N.L., Takayama, S., Shuler, M.L., Vunjak-Novakovic, G., Frey, O., Verpoorte, E., Toh, Y.-C., 2022. A guide to the organ-on-a-chip. *Nat. Rev. Methods Prim.* 2 (1), 1–29. <https://doi.org/10.1038/s43586-022-00118-6>.
- Liu, L., Koo, Y., Akwitti, C., Russell, T., Gay, E., Laskowitz, D.T., Yun, Y., 2019. Three-dimensional (3D) brain microphysiological system for organophosphates and neurochemical agent toxicity screening. *PLoS One* 14 (11), e0224657. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224657>.
- Low, L.A., Mummery, C., Berridge, B.R., Austin, C.P., Tagle, D.A., 2021. Organs-on-chips: into the next decade. *Nat. Rev. Drug Discov.* 20 (5), 345–361. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0079-3>.
- Maxwell, D.M., Brecht, K.M., O'Neill, B.L., 1987. The effect of carboxylesterase inhibition on interspecies differences in soman toxicity. *Toxicol. Lett.* 39 (1), 35–42. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(87\)90254-2](https://doi.org/10.1016/0378-4274(87)90254-2).
- Munro, N.B., Talmage, S.S., Griffin, G.D., Waters, L.C., Watson, A.P., King, J.F., Hauschild, V., 1999. The sources fate and toxicity of chemical warfare agent degradation products. *Environ. Health Perspect.* 107 (12), 933–974. <https://doi.org/10.1289/ehp.99107933>.
- Nitsche, K.S., Müller, I., Malcomber, S., Carnichael, P.L., Bouwmeester, H., 2022. Implementing organ-on-chip in a next-generation risk assessment of chemicals: a review. *Arch. Toxicol.* 96 (3), 711–741. <https://doi.org/10.1007/s00204-022-03234-0>.
- Russel, Burch, 1959. The principles of humane experimental technique.
- Schaftenaar, G., Vlieg, J. de, 2012. Quantum mechanical polar surface area. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 26 (3), 311–318. <https://doi.org/10.1007/s10822-012-9557-y>.
- Steindl, D., Boehmerle, W., Körner, R., Praeger, D., Haug, M., Nee, J., Schreiber, A., Scheibe, F., Demin, K., Jacoby, P., Tauber, R., Hartwig, S., Endres, M., Eckardt, K.-U., 2021. Novichok nerve agent poisoning. *Lancet* 397 (10270), 249–252. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32644-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32644-1).
- Tao, T.-P., Maschmeyer, I., LeQuay, E.L., Rogers, E., Brandmair, K., Gerlach, S., Przibilla, J., Kern, F., Genies, C., Jacques, C., Najjar, A., Schepky, A., Marx, U., Kühnl, J., Hewitt, N.J., 2023. Development of a microphysiological skin-liver-thyroid Chip3 model and its application to evaluate the effects on thyroid hormones of topically applied cosmetic ingredients under consumer-relevant conditions. *Front. Pharmacol.* 14, 1076254. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1076254>.
- Thiermann, H., Worek, F., Kehe, K., 2013. Limitations and challenges in treatment of acute chemical warfare agent poisoning. *Chem. Biol. Interact.* 206 (3), 435–443. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2013.09.015>.
- Tigges, J., Eggerbauer, F., Worek, F., Thiermann, H., Rauen, U., Wille, T., 2021. Optimization of long-term cold storage of rat precision-cut lung slices with a tissue preservation solution. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 321 (6), L1023–L1035. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00076.2021>.
- Toepke, M.W., Beebe, D.J., 2006. PDMS absorption of small molecules and consequences in microfluidic applications. *Lab a chip* 6 (12), 1484–1486. <https://doi.org/10.1039/b612140c>.
- Törnqvist, E., Annas, A., Granath, B., Jäkelsten, E., Cotgreave, I., Öberg, M., 2014. Strategic focus on 3R principles reveals major reductions in the use of animals in pharmaceutical toxicity testing. *PLoS One* 9 (7), e101638. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101638>.

N. Amend et al.

Toxicology Letters 388 (2023) 24–29

- Vale, J.A., Marrs, T.C., Maynard, R.L., 2018. Novichok: a murderous nerve agent attack in the UK. *Clin. toxicol.* 56 (11), 1093–1097. <https://doi.org/10.1080/15563650.2018.1469759>.
- van Meer, B.J., Vries, H., de Firth, K.S.A., van Weerd, J., Tertoolen, L.G.J., Karperien, H. B.J., Jonkhøj, P., Denning, C., IJzerman, A.P., Mummery, C.L., 2017. Small molecule absorption by PDMS in the context of drug response bioassays. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 482 (2), 323–328. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.11.062>.
- Wadman, M., 2023. FDA no longer has to require animal testing for new drugs. *Science* 379 (6628), 127–128. <https://doi.org/10.1126/science.adg6276>.
- Worek, F., Thiermann, H., Wille, T., 2016. Oximes in organophosphate poisoning: 60 years of hope and despair. *Chem. Biol. Interact.* 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.04.032>.
- Wu, Q., Liu, J., Wang, X., Feng, L., Wu, J., Zhu, X., Wen, W., Gong, X., 2020. Organ-on-a-chip: recent breakthroughs and future prospects. *Biomed. Eng. Online* 19 (1), 9. <https://doi.org/10.1186/s12938-020-0752-0>.
- Yang, J.-W., Shen, Y.-C., Lin, K.-C., Cheng, S.-J., Chen, S.-L., Chen, C.-Y., Kumar, P.V., Lin, S.-F., Lu, H.-E., Chen, G.-Y., 2020. Organ-on-a-Chip: opportunities for assessing the toxicity of particulate matter. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8, 519. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00519>.

3.3 Dritte Veröffentlichung

Toxicokinetic analysis of the highly toxic nerve agent VX in commercially available multi-organ-chips – Ways to overcome compound absorption

N. Amend, M. Koller, C. Schmitt, F. Worek. *Toxicology Letters*, 393:78-83, 2024

DOI: 10.1016/j.toxlet.2024.01.013

3.3.1 Zusammenfassung

Die Organ-on-a-Chip-Technologie (OoC) gilt als Plattform der nächsten Generation in der Pharmakologie und Toxikologie. Dennoch steht diese neuartige Technologie noch immer vor einigen Herausforderungen, was z.B. die jeweiligen Materialien des Organ-Chips betrifft. Die derzeit erhältlichen Organ-Chips basieren meist auf Polydimethylsiloxan (PDMS), jedoch weist dieses Material starke Einschränkungen, hinsichtlich der Absorption der zu untersuchenden Substanzen auf. In der vorherigen Veröffentlichung wurde bereits gezeigt, dass ein auf PDMS basierendes System deshalb nicht für toxikokinetische Studien von phosphororganischen Verbindungen wie VX und Parathion geeignet ist. In der dritten Veröffentlichung dieser Dissertation wurden deshalb alternative Materialien bzw. Beschichtungen zur Verringerung der Absorption des Nervenkampfstoffes VX in einem kommerziell erhältlichen Organchip untersucht. Zusätzlich wurden die Abbauprodukte von VX, EMPA und das ebenfalls toxische EA-2192 sowie mögliche Oberflächeneffekte der Chipmaterialien auf die Bildung dieser Metabolite untersucht.

Die Messung von VX, EMPA und EA-2192 wurde erneut mittels LC-ESI-MS/MS Technik durchgeführt. Diese speziell für Gewebe-Matrizes entwickelten Messmethoden für EMPA und EA-2192 wurden in diesem Projekt erfolgreich angewendet, um erneut eine mögliche Nutzbarkeit auch für andere Matrizes zu demonstrieren. Die Messmethode für VX kam bereits in der ersten Veröffentlichung erfolgreich zum Einsatz. Als alternatives Chipmaterial wurde cyclisches Olefin-Copolymer (CoC) verwendet. Zusätzlich wurde als Material zur Beschichtung der auf CoC und PDMS basierenden Chips Polyethylenimin (PEI) in verschiedenen Konzentrationen (0,5 % und 0,1 %) untersucht. Diese Materialien wurden verwendet, da sie kommerziell verfügbar und mit menschlichen Zelllinien biokompatibel sind.

Durch die Verwendung von unbeschichtetem CoC als Chipmaterial konnte gezeigt werden, dass die Konzentration von VX deutlich höher liegt als bei einem reinen PDMS basierten Chip. Die Konzentrationen von VX betrugen nach 72h $360 \pm 1 \mu\text{mol/l}$ (CoC) bzw. $141 \pm 10 \mu\text{mol/l}$ (PDMS), bei einer Ausgangskonzentration von $1000 \mu\text{mol/l}$ VX. Die Beschichtung der CoC-Chips mit 0,5 % PEI und 0,1% PEI führte nochmals zu einer deutlichen Erhöhung der VX-Konzentration im Vergleich zu dem unbeschichteten CoC-Chip ($442 \mu\text{mol/l}$ vs. $427 \mu\text{mol/l}$). Auch eine Beschichtung der PDMS-Chips zeigte eine deutlich erhöhte VX-Konzentration im Vergleich zum reinen PDMS-Chip, welche aber immer noch deutlich niedriger lag, als bei den PEI beschichteten CoC-Chips. Durch die zusätzliche Messung der molaren Konzentrationen der VX Metabolite EMPA und EA-2192 konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung von CoC als Chipmaterial mit Beschichtung von 0,5 % und 0,1 % PEI über 90 % der ursprünglich

zugesetzten Menge an VX (1000 mmol/l) nachweisbar waren. Weiterhin zeigt diese Studie, dass eine Beschichtung mit PEI nicht nur die Absorption der untersuchten Substanz beeinflussen kann, sondern auch die Bildung der jeweiligen Abbauprodukte. Der unbeschichtete PDMS-Chip zeigte eine VX-Konzentration nach 72h von $141 \pm 10 \mu\text{mol/l}$ und eine EA-2192-Konzentration von $203 \pm 7 \mu\text{mol/l}$. Sobald aber der PDMS-Chip mit 0,5 % PEI beschichtet wurde, steigt die VX-Konzentration nur minimal auf $214 \mu\text{mol/l}$, während die Konzentration von EA-2192 auf $76 \pm 8 \mu\text{mol/l}$ sinkt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Absorption von Organophosphaten durch Verwendung alternativer Materialien wie CoC deutlich verringert werden kann. Durch eine zusätzliche Beschichtung mit PEI kann die Absorption sogar noch weiter verringert werden. Hier zeigte sich aber eine veränderte Bildung der Abbauprodukte, wodurch angenommen werden kann, dass es durch eine Oberflächenmodifizierung zu unvorhersehbaren Veränderungen der biologisch aktiven Abbauprodukte kommt. Hier sind weitere Untersuchungen erforderlich, um allgemein akzeptierte Beschichtungsprotokolle oder ein Standardpolymer für die Untersuchungen zu bestimmen.

3.3.2 Erklärung zum Eigenanteil

Die toxikokinetischen Untersuchungen von VX und seiner Metabolite EMPA und EA-2192 mittels neuer OoC-Materialien, sowie die Entnahme der Proben wurden von Niko Amend durchgeführt. Dieser zeigte sich ebenfalls hauptverantwortlich für das komplette Projekt. Die Durchführung, Aufarbeitung, massenspektrometrische Vermessung und die grafische Darstellung, der aus dem Organchip entnommenen VX-, EMPA- und EA-2192-Proben, wurde von mir durchgeführt. Weiterhin war ich zusammen mit Niko Amend, Marianne Koller und Franz Worek an der Diskussion der Ergebnisse beteiligt. Der Hauptteil des Manuskripts wurde von Niko Amend verfasst, während ich den Material- und Methodenteil für VX, EMPA und EA-2192 beigesteuert habe. An der Korrektur des Manuskripts waren maßgeblich Marianne Koller und Franz Worek beteiligt.



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology Letters

journal homepage: www.journals.elsevier.com/toxicology-letters

Toxicokinetic analysis of the highly toxic nerve agent VX in commercially available multi-organ-chips – Ways to overcome compound absorption

Niko Amend^{a,b,*}, Marianne Koller^a, Christian Schmitt^a, Franz Worek^a^a Bundeswehr Institute of Pharmacology and Toxicology, Neuherbergstrasse 11, 80937 Munich, Germany^b Walther-Straub Institute of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität München, Goethestr. 33, 80336 Munich, Germany

ARTICLE INFO

Editor: Dr. Angela Mally

Keywords:

Organ-on-a-chip
Nerve agent
VX
Toxicokinetics
Cyclic olefin copolymers

ABSTRACT

Organ-on-a-chip technology is considered a next-generation platform in pharmacology and toxicology. Nevertheless, this novel technology still faces several challenges concerning the respective materials which are used for these microfluidic devices. Currently available organ-chips are most often based on polydimethylsiloxane (PDMS). However, this material has strong limitations regarding compound binding. The current study investigated options to reduce compound absorption of the highly toxic nerve agent VX (1000 µmol/L) in a commercially available organ-chip. In addition, surface effects on degradation products of VX were investigated. The alternative polymer cyclic olefin copolymers (CoC) showed significantly less compound absorption compared to PDMS. Furthermore, a coating of PDMS- and CoC-based chips was investigated. The biocompatible polymer polyethyleneimine (PEI) successfully modified PDMS and CoC surfaces and further reduced compound absorption. A previously examined VX concentration after 72 h of 141 ± 10 µmol/L VX could be increased to 442 ± 54 µmol/L. Finally, the respective concentrations of VX and degradation products accounted for > 90% of the initial concentration of 1000 µmol/L VX. The currently described surface modification might be a first step towards the optimization of organ-on-a-chip surfaces, facilitating a better comparability of different studies and results.

1. Introduction

The highly toxic organophosphorus nerve agent VX has recently been used for the assassination attempt on Kim Jong-nam (Nepovimova and Kuca, 2019). Despite the continuous efforts by the Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons (OPCW), nerve agents remain a persistent threat (Castelvecchi, 2019). In the last decades, research on antidotes for nerve agent poisoning has used various in vitro, ex vivo and in vivo models which produced highly variable results depending on species, model or the respective research facility (Worek et al., 2016). In Pharmacology and Toxicology, it seems generally quite difficult to predict human responses to a certain treatment using animal experiments (Leenaars et al., 2019). In 2022, the U.S. Food and Drug Administration (FDA) has recognized these difficulties and decided that drug candidates no longer require animal testing before approval (Wadman, 2023). Organ-on-a-chip (OoC) is considered a possible innovative technology that might provide crucial data on safety and efficacy before FDA approval (Keuper-Navis et al., 2023; Khanna et al., 2023; Teli et al., 2023; Wadman, 2023). These microfluidic systems are

deemed a versatile tool to assess drug toxicity, providing a correlation to clinical human data (Cong et al., 2020). Furthermore, complex diseases and the respective therapeutic strategies might be modeled in OoC (Ingber, 2022; Li et al., 2022). Some authors even consider OoC technology as a revolution in drug development (Sunildutt et al., 2023). Nevertheless, this novel technology has still certain limitations (e.g., concerning the cells and the quantification of effects) that need to be overcome (Danku et al., 2022). A previous toxicokinetic study on the nerve agent VX in a commercially available microfluidic system showed that polydimethylsiloxane-based (PDMS) OoC might not be suitable for investigation of these highly toxic substances (Amend et al., 2023). After 72 h, in this model, over 80% of the respective VX concentration were unaccounted for, most likely due to absorption by PDMS (Amend et al., 2023). PDMS is used for OoC technology due to high biocompatibility, optical transparency, low-costs and high gas permeability (Shin et al., 2020). One possible option to meet the challenge of high compound absorption by PDMS and keep the original PDMS-based OoC, was the investigation of a chip coating with a polymer, namely polyethyleneimine (PEI). Surface coating with PEI is already used in drug

* Correspondence to: Bundeswehr Institute of Pharmacology and Toxicology, Neuherbergstr. 11, 80937 Munich, Germany.
E-mail address: nikoamend@bundeswehr.org (N. Amend).

<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2024.01.013>

Received 28 November 2023; Received in revised form 4 January 2024; Accepted 29 January 2024
Available online 3 February 2024
0378-4274/© 2024 Elsevier B.V. All rights reserved.

development and in development for drug-delivery-applications, indicating human biocompatibility (Li et al., 2022; Parker and Senel, 2022; Li et al., 2023a; Li et al., 2023b). Interestingly, PEI has already been used as a coating for OoC. However, it was applied for an improved cell adherence to a microfluidic system – and not to facilitate lower compound absorption (Shin et al., 2020). A further option to modify the absorption of VX in the current study was the use of an alternative OoC material. Since a commercially available solution was desired, newly available chips, based on cyclic olefin copolymers (CoC) were investigated. CoC are amorphous, transparent thermoplastics which are considered a possible alternative for PDMS-based OoC (Agha et al., 2022). In addition, they comprise a high biocompatibility and gas permeability (Bernard et al., 2019). Consequently CoC-based OoC were investigated in regards to VX absorption. The current study shows that surface modification and alternative materials might facilitate the previously not possible study of highly toxic organophosphorus compounds, namely VX, in the investigated microfluidic system.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Potassium acetate ($\geq 99.0\%$, Ph.Eur. BP) and hydrochloric acid (37%, fuming) were procured from Carl Roth (Karlsruhe Germany). Acetonitrile, methanol, and water (LiChrosolv hypergrade for LC-MS), ammonia solution (25%, LiChropur for LC-MS) were from Merck (Darmstadt, Germany). Perchloric acid (1 mol/L in aqueous solution) and formic acid ($\geq 99.0\%$) were from VWR Chemicals (Darmstadt, Germany). VX, VR, EA-2192 ($\geq 98.0\%$ by 1 H and 31 P NMR) and EtVX-OH ($\geq 99.0\%$ by 1 H and 31 P NMR) were supplied by the German Ministry of Defence. EMPA ($\geq 99.0\%$ by 1 H and 31 P NMR) was obtained from Sigma-Aldrich and n-BPA ($\geq 95.0\%$ by 1 H and 31 P NMR) from Lancaster (Newgate, UK). In Table 1, the respective analytes and the internal standards are illustrated.

2.2. Organ-on-a-chip

The HUMIMIC Chip2 96-well co-culture model (either PDMS or CoC) was obtained from TissUse (Berlin, Germany) (Fig. 1).

Each compartment of the HUMIMIC Chip2 contained 350 μ L of co-culture medium (TissUse), totaling a volume of 0.7 mL in both

Table 1

Illustration of the analytes and their respective internal standards and purity that have been characterized in the current study.

Analyte	Internal standard	Purity
VX (O-ethyl S-(diisopropylaminoethyl) phosphonothioate)	VR (O-isobutyl S-(diethylaminoethyl) phosphonothioate)	VX > 98% by 1 H and 31 P NMR VR > 98% by 1 H and 31 P NMR EMPA > 99.0% by 1 H and 31 P NMR
EMPA (O-ethyl methylphosphonic acid)	n-BPA (n-Butylphosphonic acid)	n-BPA > 95.0% by 1 H and 31 P NMR EA-2192 > 98.0% by 1 H and 31 P NMR
EA-2192 (S-[2 (diisopropylamino)ethyl] methylphosphonothioic acid)	Et-VX-OH (S-[2 (diisopropylamino)ethyl] ethylphosphonothioic acid)	Et-VX-OH > 99.0% by 1 H and 31 P NMR



Fig. 1. The HUMIMIC Chip2 96-well co-culture model from TissUse (Berlin, Germany). On the left side, the polydimethylsiloxane-based (PDMS) chips and on the right side, the cyclic olefin copolymers-based (CoC) chips are illustrated.

compartments. The chips were connected to the HUMIMIC starter platform (TissUse) providing a pulsatile flow at 0.5 Hz and 500 mBar. For the coating, polyethyleneimine (PEI) was obtained from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany) and diluted in double-distilled water to 0.5% and 0.1%. The organ-chips were incubated for 12 h with the respective solution. Subsequently, the PEI solution was removed and the chips were dried at 50 °C. Afterwards, the chips were considered “read-to-use”. VX stock solutions of 100 mmol/L were prepared in acetonitrile (Sigma-Aldrich). A working solution of 1000 μ mol/L was prepared in co-culture medium (TissUse). For analytics, the respective sample amount of 10 μ L was removed at 2, 8, 24, 48 and 72 h. All experiments were executed with n = 3.

2.3. Analytics

2.3.1. Columns

For the analysis of EMPA, an Atlantis T3 column (150 mm $\times$ 2.1 mm, particle size 5 μ m) was obtained from Waters (Milford, MA, USA), for EA-2192 a Hypercarb column (100 mm $\times$ 2.1 mm, particle size 5 μ m) from Thermo Scientific (Rockwood, TN, USA) and for VX a Chiralpak AGP column (150 mm $\times$ 2.1 mm, particle size 5 μ m) from Chiral Technologies Europe (Illkirch-Graffenstaden, France).

2.3.2. Materials

For sample preparation (VX), Strata-X 33 μ m Polymeric Reversed Phase (30 mg, 1 mL) SPE cartridges were obtained from Phenomenex (Aschaffenburg, Germany). For EMPA, Isolute ENV+ (25 mg, 1 mL) SPE cartridges were purchased from Biotage (Uppsala, Sweden), and for EA-2192 HyperCarb HyperSep (50 mg, 1 mL) SPE cartridges from Thermo Scientific were used. EpT.P.S. reloads (0.1 – 10 μ L, 2 – 200 μ L and 50 – 1000 μ L) and Safe-Lock Tubes 2.0 mL were obtained from Eppendorf (Hamburg, Germany). Vials (0.3 mL and 1.5 mL) and their closure caps and were from Chromatografie Handel Müller (Fridolfing, Germany).

2.3.3. Instruments

All analytes were determined by an LC-ESI-MS/MS system, consisting of a 1260 Infinity II liquid chromatography system from Agilent (Waldbronn, Germany) and a Sciex 6500 + Triple Quad mass spectrometer from Sciex (Darmstadt, Germany). For liquid chromatography, 10 μ L of the sample were injected and the oven temperature was kept at 30 °C. For VX and EA-2192 the ESI source was used in the positive ionisation mode at 5500 V and for EMPA at – 4500 V in the negative

mode. For evaporation of the organic solvents, a centrifugal evaporator RVC 2–18 CD plus, performing at 1300 rpm, 21 °C and 7.0 mbar, from Christ (Osterode, Germany) was used.

2.3.4. Analytical methods

2.3.4.1. VX. The volume for processing samples of all analytes was 10 µL each. VX was quantified by LC-ESI-MS/MS as described before (Amend et al. 2023). In short, the 10 µL samples were diluted with purified water to 0.25 mL. After addition of 37.5 µL perchloric acid (1 mol/L) and 7.5 µL potassium acetate (1 mol/L), the pH was raised by addition of 50 µL ammonia hydroxide (0.5%). Subsequently, after spiking the sample with 10 µL of the internal standard solution (VR, 1 ng/µL in acetonitrile), the samples were introduced to preconditioned Strata-X 33 µm SPE cartridges and drawn through by moderate vacuum. The cartridges were then washed with water and dried under vacuum. Elution was achieved with 0.5 mL acetonitrile which was collected in a cup containing 50 µL of purified water as keeper. After evaporation of acetonitrile, the samples were filled up to 0.2 mL with purified water and placed in the autosampler of the LC system for analysis. Detection of the compounds was achieved by the following transitions: m/z 268.1 → 128.1, 268.1 → 86.0 (VX) and m/z 268.1 → 100.1, 268.1 → 72.2 (VR).

2.3.4.2. EMPA. For the measurement of the VX metabolite EMPA, 10 µL samples were diluted to 0.25 mL with purified water. The samples were then mixed with 10 µL of the internal standard solution (n-BPA, 1 ng/µL in methanol) and acidified with 75 µL of concentrated hydrochloric acid. In the next step, the samples were added to preconditioned (1 mL methanol, 1 mL purified water) ENV+ cartridges. After they were passed through, the cartridges were washed with 0.25 mL purified water and then dried by vacuum for 5 min. For elution, 1 mL of a solution, consisting of 49.5% purified water, 50% methanol and 0.5% ammonia solution, was added to the cartridges and drawn into 2 mL Safe-Lock Tubes by vacuum. For the evaporation, the cups were placed in a centrifugal evaporator for 90 min. After this procedure, the volume had decreased by half and was refilled to 1 mL with formic acid (2.0%). The liquid chromatography was performed by gradient elution applying the following gradient program: 90% A (0.5% formic acid) and 10% B (20% formic acid (1.0%) and 80% methanol) at a flow rate of 0.2 mL/min was held for 1 min. Between 1 and 6 min the mobile phase changed to 50% A which was held for 1 min. After that, the mobile phase returned to 90% A between 7 and 8 min and was held for 6 min. The mass spectrometer parameters were set automatically during the MS tune procedure for the following transitions: m/z 123.0 → 94.8, 78.9 (EMPA) and m/z 137.0 → 62.9, 78.9 (n-BPA).

2.3.4.3. EA-2192. For determination of the toxic VX metabolite EA-2192, 10 µL samples were diluted to 0.25 mL with purified water. The samples were mixed with 37.5 µL perchloric acid (1 mol/L) followed by 7.5 µL potassium acetate (1 mol/L). Then, 0.2 mL of formate buffer (25 mmol/L, pH 8.5) and 10 µL of the internal standard solution (EtVX-OH, 1 ng/µL in 2-propanol) were added to the samples. In the next step, the samples were added to preconditioned (1 mL methanol, 2 × 1 mL ammonium formate buffer, 25 mmol/L, pH 8.5) HyperCarb cartridges. After the samples were passed through, the cartridges were washed with 1 mL of purified water and then dried by vacuum for 5 min. For elution, 1.0 mL methanol was filled into the cartridge, drawn through by vacuum and was collected in 2 mL cups containing 50 µL of ammonium formate buffer (25 mmol/L, pH 8.5) as keeper. For evaporation, the cups were placed in a centrifugal evaporator for 90 min. After this procedure, the samples were filled up to 1 mL with purified water. The liquid chromatography was performed by gradient elution applying the following gradient program: 50% A (purified water) and 50% B (100% methanol) at a flow rate of 0.175 mL/min was held for 2 min. Between 2 and 3 min the mobile phase changed to 0% A which was held for 5 min.

After that, the mobile phase returned to 50% A between 8 and 10 min which was held for 5 min. The mass spectrometer parameters were set automatically during the MS tune procedure for the following transitions: m/z 240.2 → 128.2, 86.1 (EA-2192) and 254.3 → 162.0, 153.0, 128.2 (EtVX-OH).

2.4. Data analysis

Data processing was performed using GraphPad Prism Version 9.51 (GraphPad Software, San Diego, CA) and Microsoft Excel 2010 (Microsoft, Redmond, WA, USA). Data are presented as means ± SD. Statistics were determined by two-way ANOVA with Bonferroni multiple comparison test. $P < 0.05$ was considered to be statistically significant.

3. Results

In the current model, the toxicokinetics of the nerve agent VX (1000 µmol/L) and its respective degradation products EMPA and EA-2192 were determined in a two compartment OoC system (Fig. 2).

The uncoated PDMS-based OoC showed a concentration of 141 ± 10 µmol/L VX, respectively 226 ± 10 µmol/L EMPA and 203 ± 7 µmol/L EA-2192. A coating with 0.1% PEI increased the VX concentration to 284 ± 31 µmol/L and EMPA to 311 ± 21 µmol/L and decreased the concentration of EA-2192 to 81 ± 1 µmol/L. The highest VX concentration was obtained using the alternative polymer CoC and a coating with 0.5% PEI. Here 442 ± 54 µmol/L VX and 381 ± 22 µmol/L EMPA and 121 ± 5 µmol/L EA-2192 were obtained. Even though the coating with PEI of CoC-based chips vs. the plain CoC-based OoC was not significantly different, there was a clear tendency to further reduce VX absorption. Table 2 illustrates the respective effects of materials and coatings on compound concentrations.

4. Discussion

The current study examined ways to overcome the absorption of the highly toxic nerve agent VX in a commercially available organ-on-a-chip model. Previously, it was shown that a PDMS-based microfluidic system was not suitable for the toxicokinetic analysis of VX since only 17% of the initial VX dose were accounted for after 72 h (Amend et al., 2023). A similar fate can be expected for other organophosphorus compounds in PDMS-based applications (Miller et al., 2021). Since the FDA decision in 2022 that new drugs no longer require animal experiments to receive FDA approval (Wadman, 2023), OoC technology is deemed a promising approach to fundamentally change the regulatory requirements for the licensing of new drugs (Wadman, 2023). Hence, the previously described limitations concerning organophosphate absorption by PDMS-based OoC (Amend et al., 2023) needed to be addressed. CoC-based OoC were investigated due to commercial availability and due to previously shown biocompatibility and suitability for human cell line studies (Bernard et al., 2019; Agha et al., 2022). The VX concentration in the uncoated CoC chip was, after 72 h, 360 ± 1 µmol/L vs. 141 ± 10 µmol/L in the PDMS chip. To further optimize compound absorption, a coating with PEI was investigated. Previously, PEI has been used for OoC to facilitate cell adherence (Shin et al., 2020) and might even be beneficial for cell culture in microfluidic systems (Maheshwari et al., 2010). Hence, possible biocompatibility issues seemed of minor concern in the current study. Interestingly, a coating of the PDMS-based chips with 0.5% PEI significantly decreased VX absorption to the level of the CoC based chip (Table 2). Even though the coating with PEI of CoC-based chips vs. the plain CoC-based OoC was not significantly different, there was a clear tendency to further reduce VX absorption.

The highly toxic nerve agent VX is usually degraded into EMPA and the toxic metabolite EA-2192 (Reiter et al., 2011) (Fig. 3).

EA-2192 is the very toxic degradation product of VX with an intravenous LD₅₀ of 18.3 µg/kg in rat compared to 10.8 µg/kg for VX (Reiter et al., 2011). A major issue of the previous study (Amend et al., 2023)

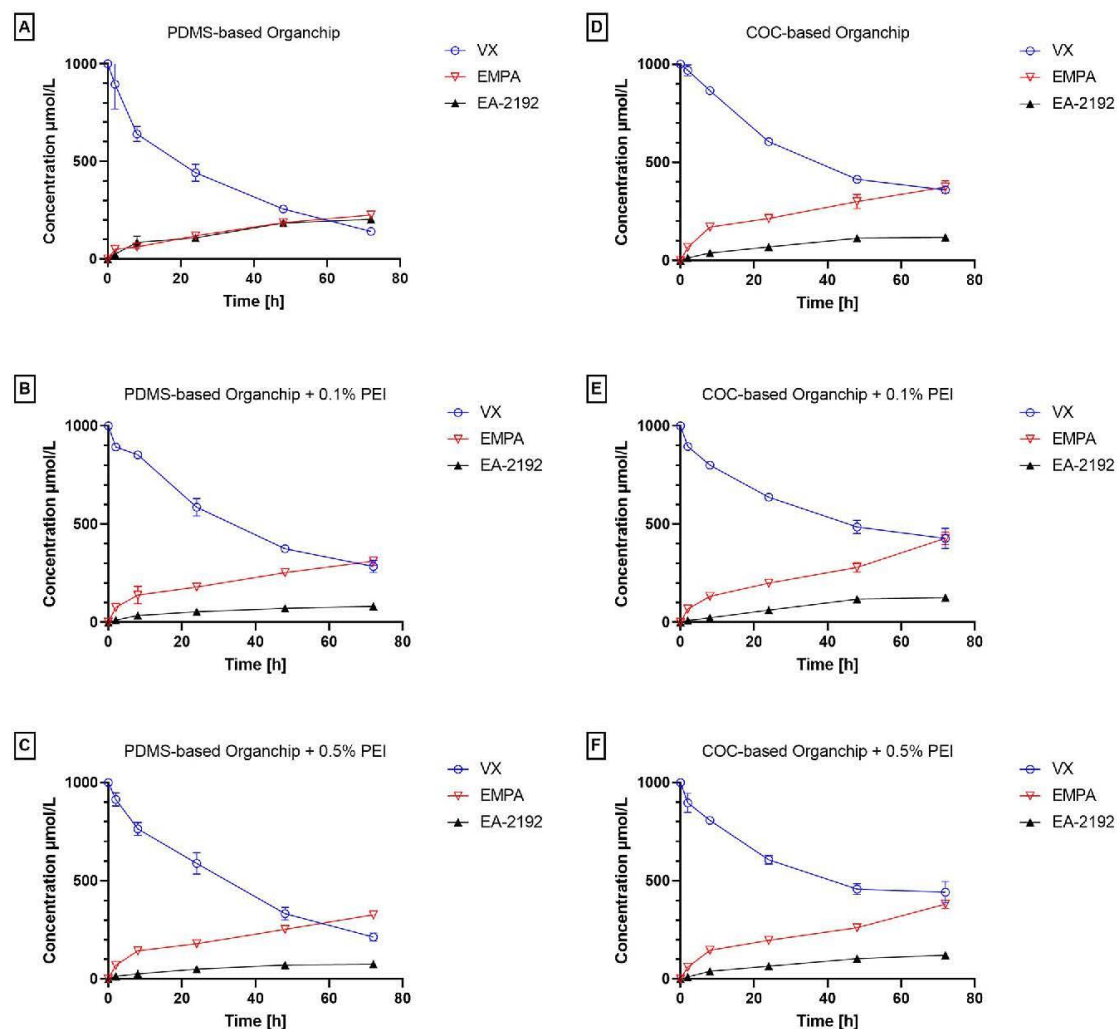


Fig. 2. The toxicokinetics of the nerve agent VX (1000 $\mu\text{mol/L}$) and its respective degradation products EMPA and EA-2192 in a two-compartment organ-on-a-chip model. A–C illustrate the toxicokinetics of PDMS-based organ-chips with different modifications of the surface. D–E highlight the respective toxicokinetics of a cyclic olefin copolymers-based (CoC) chip. The modification of the surface was performed by coating with polyethyleneimine (PEI) in a concentration of 0.5% or 0.1%. All results are presented as means $\pm$ SD and all results were obtained in three chips.

was that the sum of the respective concentrations of VX, EMPA and EA-2192, only accounted for slightly over 50% of the initial compound concentration. Consequently, the PDMS-based OoC were not deemed suitable for the toxicokinetic analysis of VX. In Table 2, the means of the respective VX concentration and its degradation products were balanced indicating that a coating of the CoC based OoC made it possible to account for over 90% the initial concentration. In a study from Eckstrum et al. it was shown that PDMS in general might lead to significant compound absorption (Eckstrum et al., 2022). The current study indicated that it is not only the absorption of the respective compound, that might change possible results. Moreover, the degradation products might also vary to a great extent (Fig. 1). The PDMS-based chip showed a VX concentration of $141 \pm 10 \mu\text{mol/L}$ and a concentration of EA-2192 of $203 \pm 7 \mu\text{mol/L}$. A coating of the PDMS-based OoC with 0.5% PEI led to a moderate increase of the VX concentration to $214 \pm 8 \mu\text{mol/L}$, but to a drastic decrease of the concentration of EA-2192 to $76 \pm 8 \mu\text{mol/L}$. Since EA-2192 is a highly toxic degradation product of VX (Reiter et al.,

2011), it is reasonable to assume that the surface modification of OoC devices might also alter biological effects. The previously described absorption of the respective compound (Miller et al., 2021; Amend et al., 2023) might therefore not only result in a reduced concentration, but also in unpredictable changes of biologically active degradation products.

5. Conclusion

The current study demonstrated that the previously described absorption of organophosphorus compounds by OoC systems might be overcome using alternative materials, as for example CoC. Besides, it was shown that a coating with PEI might additionally inhibit compound binding. Nevertheless, it was also highlighted that the polymer of microfluidic devices and a respective coating might directly influence the concentration of biologically active degradation products. Additional studies are necessary to determine generally accepted coating

Table 2
Illustration of the respective VX, EMPA and EA-2192 concentrations in a two-compartment organ-on-a-chip system. The initial VX concentration in the chips was 1000 µmol/L. The effects of different organ-chip materials and coatings on the compound concentrations are shown. The following conditions were investigated: A polydimethylsiloxane-based (PDMS) chip, a cyclic olefin copolymers-based (COC) chip and the respective coatings with polyethyleneimine (PEI) in a concentration of 0.1% and 0.5%. The results are depicted as means and all results were obtained from n = 3 conditions. “Sum” means a balance of the respective concentrations.

t (h)	PDMS	PDMS + 0.5% PEI	PDMS + 0.1% PEI	COC	COC + 0.1% PEI	COC + 0.5% PEI	Compound
0	1000	1000	1000	1000	1000	1000	VX (mmol/L)
2	896	915	893	969	895	897	
8	641	765	853	866	800	808	
24	442	589	586	605	637	607	
48	257	333	375	414	4856	458	
72	141	214	284	360	427	442	
0	0	0	0	0	0	0	EMPA (mmol/L)
2	50	70	76	67	68	60	
8	62	144	139	171	132	146	
24	119	180	180	214	200	197	
48	187	253	253	300	280	261	
72	226	327	311	374	428	381	
0	0	0	0	0	0	0	EA 2192 (mmol/L)
2	24	14	11	14	10	11	
8	85	27	34	39	23	40	
24	108	50	51	69	62	65	
48	185	71	72	114	121	114	
72	203	76	81	119	127	121	
0	1000	1000	1000	1000	1000	1000	Sum (mmol/L)
2	970	999	980	1050	972	968	
8	787	936	1026	1075	955	994	
24	668	819	817	889	899	870	
48	628	657	700	828	886	832	
72	570	617	676	853	982	944	

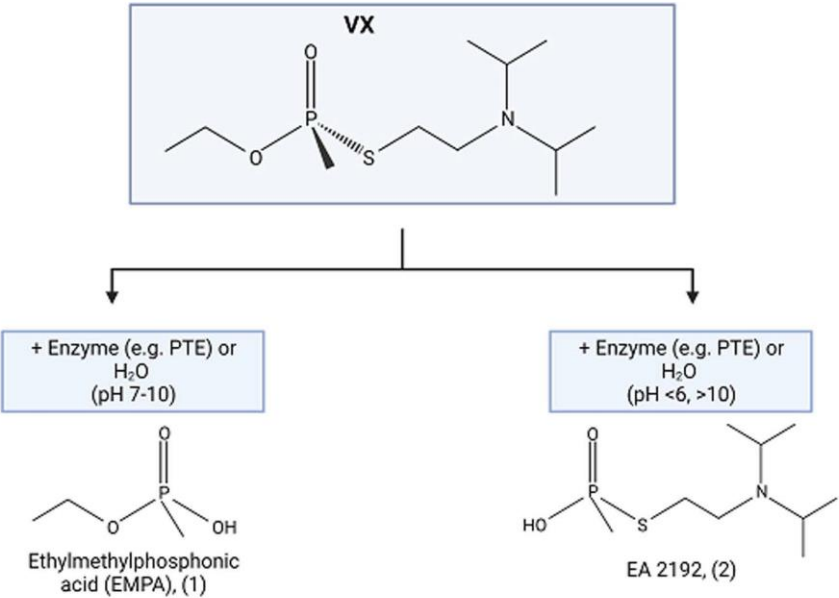


Fig. 3. Illustration of the main degradation products EMPA and EA-2192 of the highly toxic nerve agent VX. Modified according to Reiter et al. (Reiter et al., 2011).

protocols, or a standard polymer for compound testing.

CRediT authorship contribution statement

Koller Marianne: Methodology. **Schmitt Christian:** Methodology. **Worek Franz:** Writing – review & editing, Supervision. **Amend Niko:** Writing – original draft, Investigation, Conceptualization.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data Availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

The authors are grateful to Katharina Kettner and Jasmin Rauch for expert technical assistance.

References

- Agha, A., Waheed, W., Alamoodi, N., Mathew, B., Alnaimat, F., Abu-Nada, E., Abderrahmane, A., Alazzam, A., 2022. A review of cyclic olefin copolymer applications in microfluidics and microdevices. *Macro Mater. Eng.* 307 (8) <https://doi.org/10.1002/mame.202200053>.
- Amend, N., Koller, M., Schmitt, C., Worek, F., Wille, T., 2023. The suitability of a polydimethylsiloxane-based (PDMS) microfluidic two compartment system for the toxicokinetic analysis of organophosphorus compounds. *Toxicol. Lett.* 388, 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2023.10.007>.
- Bernard, M., Jubedi, E., Bakar, J., Saunier, J., Yagoubi, N., 2019. Impact of simulated biological aging on physicochemical and biocompatibility properties of cyclic olefin copolymers. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* 97, 377–387. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.12.032>.
- Castelvecchi, D., 2019. Novichok nerve agents banned by chemical-weapons treaty. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/d41586-019-03686-y>.
- Cong, Y., Han, X., Wang, Y., Chen, Z., Lu, Y., Liu, T., Wu, Z., Jin, Y., Luo, Y., Zhang, X., 2020. Drug toxicity evaluation based on organ-on-a-chip technology: a review. *Micromachines* 11 (4). <https://doi.org/10.3390/mi11040381>.
- Danku, A.E., Dulf, E.-H., Braicu, C., Jurj, A., Berindan-Neagoe, I., 2022. Organ-On-A-Chip: a survey of technical results and problems. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 10, 840674 <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.840674>.
- Eckstrum, K., Striz, A., Ferguson, M., Zhao, Y., Sprando, R., 2022. Evaluation of the utility of the beta human liver emulsion system (BHLES) for CFSAN's regulatory toxicology program. *Food Chem. Toxicol.: Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 161, 112828 <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.112828>.
- Ingber, D.E., 2022. Human organs-on-chips for disease modelling, drug development and personalized medicine. *Nat. Rev. Genet.* 23 (8), 467–491. <https://doi.org/10.1038/s41576-022-00466-9>.
- Keuper-Navis, M., Waller, M., Poller, B., Myszczyzyn, A., van der Made, T.K., Donkers, J., Eslami Amirabadi, H., Wilmer, M.J., Aan, S., Spee, B., Masereeuw, R., van de Steeg, E., 2023. The application of organ-on-chip models for the prediction of human pharmacokinetic profiles during drug development. *Pharmacol. Res.* 195, 106853 <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2023.106853>.
- Khanna, A., Oropeza, B.P., Huang, N.F., 2023. Cardiovascular human organ-on-a-chip platform for disease modeling, drug development, and personalized therapy. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37602>.
- Leenaars, C.H.C., Kouwenaar, C., Stafleu, F.R., Bleich, A., Ritskes-Hoitinga, M., Vries, R. B.M., de, Meijboom, F.L.B., 2019. Animal to human translation: a systematic scoping review of reported concordance rates. *J. Transl. Med.* 17 (1), 223. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-1976-2>.
- Li, N., Zhang, T., Wang, R., Sun, Y., Chu, L., Lu, X., Sun, K., 2023a. Homotypic targeted nanoplateform enable efficient chemioimmunotherapy and reduced DOX cardiotoxicity in chemoresistant cancer via TGF- β 1 blockade. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 361, 147–160. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2023.07.063>.
- Li, Q., Tong, Z., Mao, H., 2023b. Microfluidic based organ-on-chips and biomedical application. *Biosensors* 13 (4). <https://doi.org/10.3390/bios13040436>.
- Li, Z., Hui, J., Yang, P., Mao, H., 2022. Microfluidic organ-on-a-chip system for disease modeling and drug development. *Biosensors* 12 (6). <https://doi.org/10.3390/bios12060370>.
- Maheshwari, N., Kottantharayil, A., Kumar, M., Mukherji, S., 2010. Long term hydrophilic coating on poly(dimethylsiloxane) substrates for microfluidic applications. *Appl. Surf. Sci.* 257 (2), 451–457. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2010.07.010>.
- Miller, D.R., McClain, E.S., Dodds, J.N., Balinski, A., May, J.C., McLean, J.A., Cliffl, D. E., 2021. Chlorpyrifos disrupts acetylcholine metabolism across model blood-brain barrier. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9, 622175 <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.622175>.
- Nepovimova, E., Kuca, K., 2019. The history of poisoning: from ancient times until modern ERA. *Arch. Toxicol.* 93 (1), 11–24.
- Paker, E.S., Send, M., 2022. Polyelectrolyte multilayers composed of polyethyleneimine-grafted chitosan and polyacrylic acid for controlled drug-delivery applications. *J. Funct. Biomater.* 13 (3) <https://doi.org/10.3390/jfb13030131>.
- Reiter, G., Milder, J., Hill, I., Weatherby, K., Thiermann, H., Worek, F., 2011. Simultaneous quantification of VX and its toxic metabolite in blood and plasma samples and its application for in vivo and in vitro toxicological studies. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 879 (26), 2704–2713. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.07.031>.
- Shin, W., Ambrosini, Y.M., Shin, Y.C., Wu, A., Min, S., Koh, D., Park, S., Kim, S., Koh, H., Kim, H.J., 2020. Robust formation of an epithelial layer of human intestinal organoids in a polydimethylsiloxane-based gut-on-a-chip microdevice. *Front. Med. Technol.* 2 <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.00002>.
- Sunildutt, N., Parihar, P., Chethikkattuvelil Salih, A.R., Lee, S.H., Choi, K.H., 2023. Revolutionizing drug development: harnessing the potential of organ-on-chip technology for disease modeling and drug discovery. *Front. Pharmacol.* 14, 1139229 <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1139229>.
- Teli, P., Kale, V., Vaidya, A., 2023. Beyond animal models: revolutionizing neurodegenerative disease modeling using 3D in vitro organoids, microfluidic chips, and bioprinting. *Cell Tissue Res.* 394 (1), 75–91. <https://doi.org/10.1007/s00441-023-03821-2>.
- Wadman, M., 2023. FDA no longer has to require animal testing for new drugs. *Science* 379 (6628), 127–128. <https://doi.org/10.1126/science.adg6276>.
- Worek, F., Thiermann, H., Wille, T., 2016. Oximes in organophosphate poisoning: 60 years of hope and despair. *Chem. Biol. Interact.* 259 (Pt B), 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.04.032>.

4 Zusammenfassung

Phosphororganische Verbindungen sind seit ihrer Erforschung in einem Pestizid-Entwicklungsprogramm in den 1930er Jahren, auf Grund ihrer toxischen Wirkung mehrfach als chemische Waffe missbraucht worden. In den letzten Jahrzehnten kam es zu zahlreichen Anschlägen und Attentaten, welche viele Menschenleben forderten. OP-Nervenkampfstoffe erzeugen ihre toxische Wirkung beim Menschen durch die Hemmung des Enzyms Acetylcholinesterase. Dieses ist für den Abbau von Acetylcholin im synaptischen Spalt oder der neuromuskulären Endplatte verantwortlich. Durch eine Hemmung kommt es zur Akkumulierung von ACh und somit zu einer Dauererregung der Reizweiterleitung im cholinergen System. Unbehandelt kann so eine cholinerge Krise entstehen, die nach kurzer Zeit zum Tod durch Atemlähmung führt. Die Standard-Behandlung mit Oximen und Anticholinergika wie Atropin birgt leider einige Einschränkungen. Oxime müssen in einem gewissen, substanzabhängigen Zeitfenster gegeben werden, bevor es zur Alterung des OP-Enzym-Komplexes kommt. Tritt diese Alterung ein ist eine Behandlung mit Oximen nicht mehr möglich. Weiterhin gibt es keine Breitbandoxime, welche für alle OP-Nervenkampfstoffe gleich effektiv wirken. Atropin wirkt nur am mAChR und nicht am nAChR, wodurch es keine Auswirkung auf die nikotinergen Symptome hat. Auf Grund dieser Limitationen wird intensiv an neuen Therapiemöglichkeiten geforscht. Bioscavenger stellen einen solchen neuen Ansatz dar. Bioscavenger sind Enzyme wie die AChE oder BChE, die dem Patienten exogen zugeführt werden. So werden dem Nervenkampfstoff zusätzliche Bindungspartner zur Verfügung gestellt und durch diese abgefangen, bevor die körpereigenen Enzyme gehemmt werden. Leider wirken diese nur stöchiometrisch, sodass hohe Dosen gegeben werden müssen. Ein neuer Ansatz sind deshalb Phosphotriesterasen, welche katalytisch wirken und Nervenkampfstoffe hydrolytisch spalten.

Aus diesem Grund ist am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr ein Tierversuch mit Ratten zur Testung neuer, modifizierter PTE-Mutanten durchgeführt worden. Nach erfolgreicher Durchführung und Bestätigung der Wirksamkeit auf einen beschleunigten VX-Abbau, durch Vermessung von Vollblut-Proben, sollte nun die Wirksamkeit auch anhand von Gewebeproben gezeigt werden. Auch deshalb, da bisher nicht bekannt war, wie sich eine PTE-Behandlung auf die Konzentration von VX und dessen Verteilung im Gewebe auswirkt.

Zu diesem Zweck wurden LC-ESI-MS/MS Methoden von VX und seinen Metaboliten auf die Anwendung von Gewebematrizes erfolgreich angepasst und anschließend das Gewebe (Leber, Niere, Milz, Muskel, Herz, Haut) der Tiere vermessen. Die Ergebnisse zeigten hier eine deutliche Abnahme der VX-Konzentration in allen Gewebetypen nach Behandlung mit zwei neuen, modifizierten PTE-Mutanten. Im Herz- und Lebergewebe der Tiere war kein VX mehr nachweisbar. Bei Betrachtung des toxischen VX-Metaboliten EA-2192 zeigt sich auch hier nach der Behandlung eine deutlich verringerte Konzentration in allen Gewebetypen. In den Konzentrationen von EMPA zeigten sich hingegen nur sehr geringe Konzentrationsunterschiede zwischen den Therapiegruppen. Hier sind weitere Untersuchungen von VX und seinen Metaboliten durch z.B. gleichzeitige Bestimmung von Gewebe- und Blutproben notwendig. Weiterhin sollte bei künftigen Projekten zusätzlich noch der Urin untersucht werden, da EMPA sehr hydrophil ist und nicht bekannt ist, wie viel EMPA

während des Tierversuchs über den Urin ausgeschieden wurde. Weiterhin war es möglich durch die VX-Methode die zwei VX-Enantiomere getrennt zu analysieren. Durch die Auftrennung wurde deutlich, dass (-)-VX durch die Behandlung verstärkt abgebaut wurde. In der Leber, Milz und im Herz war kein (-)-VX mehr nachweisbar und im Nierengewebe nur noch sehr geringe Mengen. Ebenfalls konnte eine Depot-Bildung in der Haut gezeigt werden (VX wurde s.c. appliziert). Hier zeigte sich eine >1000 fache niedrigere VX-Konzentration nach der Behandlung mit wirksamen PTE Mutanten im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Neben der Anwendung der Methoden auf die Tierversuchspuren, wurden diese auch erfolgreich für zwei weitere Projekte verwendet. Im ersten sollte die Nutzbarkeit von OoC auf PDMS-Basis für toxikokinetische Untersuchungen von OP (VX und Parathion) untersucht werden. Nachdem sich herausstellte, dass PDMS als Chipmaterial, auf Grund von Absorptions-Effekten, hierfür nicht geeignet ist, wurden im zweiten Projekt neue Materialien erfolgreich getestet. CoC in Kombination mit PEI als Beschichtung zeigte, dass die Absorption deutlich zurückgegangen ist. Aber es zeigte sich auch, dass eine Beschichtung mit PEI auch Auswirkungen auf die Bildung der Metabolite von VX hatte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass auf Grund der erfolgreichen Anwendung der LC-ESI-MS/MS Methoden für VX und seine Metaboliten EMPA und EA-2192 in verschiedenen Forschungsprojekten ein wichtiges analytisches Werkzeug für künftige Forschungsprojekte, wie weitere Gewebeuntersuchungen oder Kinetikstudien, geschaffen wurde.

5 Abstract

Since in the start of a pesticide development program in the 1930s, organophosphorus compounds have been misused several times as chemical weapons due to their toxic effects. In recent decades, there have been numerous attacks and assassinations that have claimed many lives. OP nerve agents produce their toxic effect in humans by inhibiting the enzyme acetylcholinesterase. This is responsible for the breakdown of acetylcholine in the synaptic cleft or the neuromuscular end plate. Inhibition leads to the accumulation of ACh and thus to a permanent excitation of stimulus transmission in the cholinergic system. If left untreated, this can lead to a cholinergic crisis, which can result in death from respiratory paralysis after a short time. The standard treatment with oximes and anticholinergics such as atropine unfortunately has some limitations. Oximes must be given within a certain, substance-dependent, time frame before the OP enzyme complex ages. If this ageing occurs, treatment with oximes is no longer possible. Furthermore, there are no broad-spectrum oximes that are equally effective against all OP nerve agents. Atropine only acts on the mAChR and not on the nAChR, which means that it has no effect on nicotinic symptoms. Due to these limitations, intensive research is being conducted into new therapeutic options. Bioscavengers represent one such new approach. Bioscavengers are enzymes such as AChE or BChE, which are administered to the patient thus providing additional binding partners to the nerve agent. Binding of nerve agents by such bioscavengers in the blood stream may prevent AChE inhibition in target tissues. Unfortunately, these only work stoichiometrically and high doses have to be administered. A new approach are therefore phosphotriesterases (PTE), which have a catalytic effect and hydrolyse nerve agents.

For this reason, an animal experiment with rats was performed at the Bundeswehr Institute of Pharmacology and Toxicology to test new, modified PTE mutants. After successful implementation and confirmation of the effectiveness of accelerated VX degradation by measuring whole blood samples, the effectiveness should now also be demonstrated using tissue samples. Up to now no data on the effect PTE treatment on VX concentration in tissue is available.

For this purpose, LC-ESI-MS/MS methods for VX and its metabolites were successfully adapted for use of different tissues (liver, kidney, spleen, muscle, heart, skin). The results showed a significant decrease in VX concentration in all tissue samples after treatment with two new, modified PTE mutants. VX was no longer detectable in heart and liver tissue. The toxic VX metabolite EA-2192 was also found to be significantly reduced in all tissue samples after treatment. In contrast, there were only very slight differences in the concentrations of EMPA between the treatment groups. Further investigations of VX and its metabolites are necessary, e.g. by simultaneous determination of tissue and blood samples. Furthermore, urine should also be examined in future projects, as EMPA is very hydrophilic and it is not known how much EMPA was excreted in the urine during the animal experiment. Furthermore, it was possible to analyze the two VX enantiomers separately. The analysis clearly showed that (-)-VX was hydrolysed preferentially by the treatment with modified PTE mutants. No more (-)-VX was detectable in the liver, spleen and heart and only very

small amounts were found in the kidney tissue. Depot formation was also shown in the skin (VX was applied s.c.). Here, a >1000-fold lower VX concentration was found after treatment.

In addition to the application of the methods to the animal test samples, they were also successfully used for two other projects. The first was to investigate the suitability of PDMS-based OoC for toxicokinetic studies of OP (VX and parathion). After it turned out that PDMS was not suitable as a chip material due to absorption effects, new materials were successfully tested in the second project. CoC in combination with PEI as a coating showed that absorption was significantly reduced. However, it was also shown that coating with PEI also had an effect on the formation of metabolites of VX.

In summary, the successful application of LC-ESI-MS/MS methods for VX and its metabolites EMPA and EA-2192 in various research projects has created an important analytical tool for future projects, such as further tissue investigations or kinetics studies.

6 Literaturverzeichnis

- [1] L. Szinicz. History of chemical and biological warfare agents. *Toxicology*, 214:167–181, 2005.
- [2] G. Schrader. Die insektiziden Phosphorsäureester. *Angewandte Chemie*, 69:86–90, 1957.
- [3] B. Holmstedt. Structure–activity relationships of the organophosphorus anticholinesterase agents. In: G. B. Koelle (Hrsg.), *Handbuch Experimenteller Pharmakologie, Ergänzungswerk XV, Cholinesterases and Anticholinesterase Agents*, Springer Verlag, Berlin, 1963
- [4] J. P. Robinson, M. Leitenberg. The rise in CB weapons. In: *The Problem of Chemical and Biological Warfare*, Almquist & Wiksells, Stockholm, 1971
- [5] P. R. Chai, B. D. Erickson, E. W. Boyer. Novichok agents: a historical, current, and toxicological perspective. *Toxicological Communications*, 2(1):45-48
- [6] S. Costanzi, J. H. Machado, M. Mitchell. Nerve Agents: What They Are, How They Work, How to Counter them. *ACS Chemical Neuroscience Journal*, 9(5):873-885, 2018
- [7] J. Newmark. The birth of nerve agent warfare; Lessons from Syed Abbas Foroutan. *Neurology*, 62:1590-1596, 2004
- [8] A. T. Tu. Basic information on nerve gas and the use of sarin by Aum Shinrikyo. *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan*, 44:293-320, 1996
- [9] Z. Brunka, J. Ryl, P. Brushtulli, D. Gromala, G. Walczak, S. Zieba, D. Piesniak, J. S. Anand, M. Wierowski. Selected Political Criminal Poisonings in the Years 1978-2020: Detection and Treatment. *Toxics*, 10(8):468, 2022
- [10] D. Steindl, W. Boehmerle, R. Körner, D. Praeger, M. Haug, J. Nee, A. Schreiber, F. Scheibe, K. Demin, P. Jacoby, R. Tauber, S. Hartwig, M. Endres, K. U. Eckardt. Novichok nerve agent poisoning. *Lancet*, 397:249–252, 2021
- [11] N. B. Munro, S. S. Talmage, G. D. Griffin, L. C. Waters, A. P. Watson, J. F. King, V. Hauschild. The sources, fate, and toxicity of chemical warfare agent degradation products. *Environmental Health Perspectives*, 107:933–974, 1999
- [12] W. N. Aldridge, E. Reiner. *Enzyme inhibitors as substrates: Interactions of esterases with esters of organophosphorus and carbamic acids (Frontiers of biology)*, North-Holland Publishing Company, 1972
- [13] S. Böhm. Cholinerge Systeme. In: M. Freissmuth, S. Offermanns, S. Böhm (Hrsg.), *Pharmakologie und Toxikologie*, S. 112-115, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2012
- [14] K. Starke. Pharmakologie cholinерger Systeme. In: K. Aktories, U. Förstermann, F. Hofmann, K. Starke (Hrsg.), *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 127-151, Elsevier Germany, München, 2013

- [15] D. E. Golan, E. J. Armstrong, A. W. Armstrong (Hrsg.). *Principles of pharmacology: The pathophysiologic basis of drug therapy: Fourth Edition*, Wolters Kluwer, 2016
- [16] M. Lotti. Clinical Toxicology of Acetylcholinesterase Agents in Humans. In: R. Krieger (Hrsg.), *Hayes Handbook of Pesticide Toxicology*, S. 1543-1589, Elsevier Inc., 2010
- [17] J. Newmark. Therapy for nerve agent poisoning. *Archives of Neurology*, 61(5):649-52, 2004
- [18] B. Holmstedt. Pharmacology of Organophosphorus Cholinesterase Inhibitors. *Pharmakological Reviews*, 11(3):567, 1959
- [19] E. J. Hulse, J. O. Davies, A. J. Simpson, A. M. Scuito, M. Eddleston. Respiratory complications of organophosphorus nerve agent and insecticide poisoning. Implications for respiratory and critical care. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 190(12):1342-54
- [20] O. Soukup, G. Tobin, U.K. Kumar, J. Binder, J. Proska, D. Jun, J. Fusek, K. Kuca. Interaction of nerve agent antidotes with cholinergic systems. *Current Medicinal Chemistry*, 17(16):1708-18, 2010
- [21] M. J. Field, T. W. Wymore. Multiscale modeling of nerve agent hydrolysis mechanisms: a tale of two Nobel Prizes. *Physica Scripta*, 89(10), 2014
- [22] M. B. Colovic, D. Z. Krstic, T. D. Lazarevic-Pasti, A. M. Bondzic, V. M. Vasic. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Current Neuropharmacology*, 11(3):315-35, 2013
- [23] C. Dellas. Arzneimittel im vegetativen Nervensystem. In: C. Dellas (Hrsg.), *Kurzlehrbuch Pharmakologie*, S. 19-49, Urban & Fischer, 2022
- [24] P. Eyer, L. Szinicz, H. Thiermann, F. Worek, T. Zilker. Testing of antidotes for organophosphorus compounds: experimental procedures and clinical reality. *Toxicology*, 233(1-3):108-19, 2007
- [25] F. Worek, H. Thiermann, T. Wille. Oximes in organophosphate poisoning: 60 years of hope and despair. *Chemico-Biological Interactions*, 259(Pt B):93-98, 2016
- [26] H. Thiermann, F. Worek. Pro: Oximes should be used routinely in organophosphate poisoning. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 88(12):5064-5069, 2022
- [27] S. Aman, S. Paul, F. R. Chowdhury. Management of Organophosphorus Poisoning: Standard Treatment and Beyond. *Critical Care Clinics*, 37(3):673-686, 2021
- [28] R. D. Sheridan. Nicotinic antagonists in the treatment of nerve agent intoxication. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 98(3):114-115, 2012
- [29] F. Worek, P. Eyer, N. Aurbek, F. Worek. Treatment of Nerve Agent Poisoning. In: *Chemical Warfare Toxicology - Volume 2: Management of Poisoning*, 2016
- [30] P. Mason, F. Nachon, O. Lockridge. Structural approach to the aging of phosphorylated cholinesterases. *Chemico-Biological Interactions*, 187(1-3):157-62, 2010

- [31] H. Thiermann, L. Szinicz, P. Eyer, N. Felgenhauer, T. Zilker, F. Worek. Lessons to be learnt from organophosphorus pesticide poisoning for the treatment of nerve agent poisoning. *Toxicology*, 233(1-3):145-54, 2007
- [32] F. Worek, H. Thiermann, T. Wille. Organophosphorus compounds and oximes: a critical review. *Archives of Toxicology*, 94(7):2275-2292, 2020
- [33] P. W. Elsinghorst, F. Worek, H. Thiermann, T. Wille. Drug development for the management of organophosphorus poisoning. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 8:1467–1477, 2013
- [34] F. Worek, H. Thiermann, L. Szinicz, P. Eyer. Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. *Biochemical Pharmacology*, 68:2237-2248. 2004
- [35] P. Masson, F. Nachon. Cholinesterase reactivators and bioscavengers for pre- and post-exposure treatments of organophosphorus poisoning. *Journal of neurochemistry*, 142(Suppl 2):26-40, 2017
- [36] F. Nachon, X. Brazzolotto, M. Trovaslet, P. Masson. Progress in the development of enzyme-based nerve agent bioscavengers. *Chemico-Biological Interactions*, 206(3):536-544, 2013
- [37] P. Masson, F. Nachon, C. A. Broomfield, D. E. Lenz, L. Verdier, L. M. Schopfer, O. Lockridge. A collaborative endeavor to design cholinesterase-based catalytic scavengers against toxic organophosphorus esters. *Chemico-Biological Interactions*, 175(1-3):273-280, 2008
- [38] A. N. Bigley, C. Xu, T. J. Henderson, S. P. Harvey, F. M. Raushel. Enzymatic neutralization of the chemical warfare agent VX: evolution of phosphotriesterase for phosphorothiolate hydrolysis. *Journal of the American Chemical Society*, 135(28):10426-32, 2013
- [39] I. Cherny, P. Greisen Jr, Y Ashani, S. D. Khare, G. Oberdorfer, H. Leader, D. Baker, D. S. Tawfik. Engineering V-type nerve agents detoxifying enzymes using computationally focused libraries. *ACS chemical biology*, 8(11):2394-2403, 2013
- [40] L. Stigler, A. Köhler, M. Koller, L. Job, B. Escher, H. Potschka, H. Thiermann, A. Serra, F. Worek, T. Wille. Post-VX Expo Sure treatment of rats with engineered phosphotriesterases. *Archives of Toxicology*, 93:571-583, 2022
- [41] A. Köhler, B. Escher, L. Job, M. Koller, H. Thiermann, A. Skerra, F. Worek. Catalytic activity and stereoselectivity of engineered phosphotriesterases towards structurally different nerve agents in vitro. *Archives of Toxicology*, 95(8):2815-2823, 2021
- [42] M. Neugebauer. Chromatographische Analysemethoden. In: G. Rücker, M. Neugebauer, G. G. Willems (Hrsg.), *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*, S. 391-445, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, Stuttgart, 2013
- [43] 11.1/2.02.29.00 Flüssigchromatographie, Europäisches Arzneibuch (Ph. Eur.)

- [44] Shimadzu. Overview of HPLC: What is HPLC?
https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/liquid-chromatography/overview/overview_of_lc.html
(Abgerufen im Juli 2024)
- [45] 11.0/2.02.43.00 Massenspektrometrie, Europäisches Arzneibuch (Ph. Eur.)
- [46] O. Schmitz. Stand der Technik in der LC-MS-Kopplung. In: S. Kromidas (Hrsg.), *Das HPLC-MS-Buch für Anwender*, S. 3-20, Wiley-VCH, Weinheim, 2017
- [47] M. M. Martin. Technische Aspekte und Fallstricke der LC-MS-Kopplung. In: S. Kromidas (Hrsg.), *Das HPLC-MS-Buch für Anwender*, S. 21-74, Wiley-VCH, Weinheim, 2017
- [48] Wageningen University & Research. UPLC-triple quad mass spectrometer; for targeted quantitative LC-MS detection.
<https://www.wur.nl/en/product/uplc-triple-quad-mass-spectrometer-for-targeted-quantitative-lc-ms-detection.htm>
(Abgerufen im Juli 2024)
- [49] B. Voelkl, N. S. Altmann, A. Forsmann, W. Forstmeier, J. Gurevitch, I. Jaric, N. A. Karp, M. J. Kas, H. Schielzeth, T. van de Castele, H. Würbel. Reproducibility of animal research in light of biological variation. *Nature Reviews Neuroscience*. 21:384-393, 2020