

*На правах рукописи*

**Черноносков Александр Анатольевич**

**Развитие масс-спектрометрических подходов для решения  
задач целевой и нецелевой метаболомики**

1.5.4 – биохимия

Диссертация в виде научного доклада  
на соискание учёной степени  
доктора химических наук

Новосибирск – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

**Научный консультант:** Коваль Владимир Васильевич, кандидат химических наук, доцент

**Официальные оппоненты:**

**Центалович Юрий Павлович**, доктор химических наук, профессор, ФГБУН Институт «Международный томографический центр» Сибирского отделения Российской академии наук, главный научный сотрудник, руководитель ЦКП «Масс-спектрометрические исследования» Сибирского отделения Российской академии наук

**Дмитренко Павел Сергеевич**, доктор химических наук, ФГБУН Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук, директор института

**Сильников Владимир Николаевич**, доктор химических наук, ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией органического синтеза

Защита состоится «15» сентября 2023 г. в 12 часов на заседании диссертационного совета ИХБФМ.02 при Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: Новосибирск 630090, пр-т акад. Лаврентьева, 8

С диссертацией в виде научного доклада можно ознакомиться в библиотеке Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и на сайте [www.niboch.nsc.ru](http://www.niboch.nsc.ru)

Диссертация в виде научного доклада разослана « \_\_ » \_\_\_\_\_ 2023 г.

Учёный секретарь диссертационного совета  
к.х.н. Пестряков П. Е.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы.

На постгеномном этапе развития знания стали интенсивно разрабатываться методы, используемые в области так называемых «-omics» или «омиксных» технологий: геномики, протеомики, транскриптомики, метаболомики (Ideker T. *et.al.*, Annual review of genomics and human genetics, 2001; Misra B.B. *et.al.*, Journal of Molecular Endocrinology, 2018; Ritchie M.E. *et.al.*, Nucleic Acids Research, 2015; Costa-Silva J. *et.al.*, PloS One, 2017; Aebersold R. & Mann M. Nature, 2016). С одной стороны, эти технологии позволяют целостно взглянуть на объекты своего исследования: геномика работает с генами, транскриптомика с мРНК, протеомика с белками, а метаболомика с метаболитами. С другой стороны, их объединение позволяет разносторонне изучить живые организмы, и является подходом системной биологии. Метаболомика является наиболее молодой наукой, получившей значительное развитие после начала использования масс-спектрометрических методов анализа.

Существует несколько определений термина метаболомика (Fiehn O., International Journal of Genomics, 2001; Turnbaugh P.J. & Gordon J.I., Cell, 2008; Deda O. *et.al.*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2015), но все они сводятся к тому, что это область науки, изучающая метаболом, представляющий собой всю совокупность соединений массой до 1,5 кДа. В организме только человека уже обнаружено около 200 000 различных метаболитов (Bongiovanni T. *et.al.*, Proteomes, 2022; Khoramipour K. *et.al.*, Sports Medicine, 2022). Всего же в 10 модельных организмах (*Homo sapiens*, *Bos taurus*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*) к настоящему моменту описано более 100 000 сигнальных путей для различных метаболитов ([www.pathbank.org](http://www.pathbank.org)). К объектам исследования метаболомики кроме этого относят и экзогенные вещества, попадающие в живой организм с пищей, под воздействием окружающей среды или при лекарственной терапии. В результате количество потенциальных объектов для исследования значительно увеличивается.

Несмотря на то, что исследование определённых классов веществ уже выделяют в отдельные подразделы, например, липидомика занимается всесторонним анализом всех липидов, гликомика – сахаров, а фудомика – продуктов питания, в целом метаболомику можно классифицировать как «целевую» и «нецелевую».

Целевая метаболомика решает задачи определения конкретного, известного и заранее выбранного набора веществ (от одного соединения до нескольких десятков) и, обычно, метаболомные подходы применяются в доклинических и клинических исследованиях лекарственных препаратов, либо при изучении определенных метаболитов в качестве биомаркеров (Griffiths W.J. *et.al.*, *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 2010). Создание новых лекарственных препаратов и улучшение фармакологических свойств и безопасности уже используемых в фармации действующих веществ, как правило, на стадии доклинических исследований проводится на животных небольшого размера (Perrin S., *Nature*, 2014; Mukherjee P. *et.al.*, *Laboratory Animal Research*, 2022). Использование мышей и крыс в качестве модельных животных налагает ограничения на максимально возможный объем крови или плазмы крови, отбираемый для исследования, особенно если в ходе персонализированного анализа требуется осуществлять многократный отбор проб за относительно небольшой промежуток времени. В клинических исследованиях и для мониторинга лекарственных препаратов в современной практике стараются использовать малоинвазивные способы отбора, что также приводит к уменьшению объема проб (Gaspar V.P. *et.al.*, *Journal of Mass Spectrometry*, 2021). Для анализа проб малого объема необходимо использовать методы, позволяющие определять нанограммовые и пикограммовые количества вещества, что в настоящее время достигается за счет использования масс-анализаторов и разработки новых или улучшения эффективности существующих методов экстракции веществ из биологических жидкостей.

Чем ниже количество определяемого аналита, тем сильнее становится вклад примесей в регистрируемый масс-спектр (Nicolescu T.O., *Interpretation of Mass Spectra, in Mass Spectrometry*, 2017), что увеличивает погрешность количественного измерения. Масс-спектрометрия высокого разрешения позволяет измерить массу аналита с точностью до  $10^{-4}$  –  $10^{-5}$  атомной единицы массы, в отличие от масс-спектрометрии низкого разрешения с разрешающей способностью до 0,1 атомной единицы массы, однако несколько проигрывает ей по чувствительности. Разработка чувствительных и селективных методов анализа с использованием жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии высокого разрешения становится все более актуальной задачей, поскольку позволяет значительно повысить селективность анализа и уменьшить вклад потенциальных загрязнений (Joye T. *et.al.*, *Analytica Chimica Acta*, 2019). Более того, масс-спектрометрия высокого разрешения позволяет определять по точной массе, не только брутто-формулу соединения, но и, с учетом фрагментов молекулы, его структуру. Такой метод можно использовать для

многокомпонентного скрининга сложных образцов (Kosma C.I. *et.al.*, Food Chemistry, 2021) и идентификации большого количества аналитов без использования стандартов сравнения (Kumari T. *et.al.*, Plant Growth Regulation. 2015). Например, подходы целевой и нецелевой метаболомики используются для поиска потенциальных биомаркеров различных заболеваний (Griffiths W.J. *et.al.*, Angewandte Chemie (International ed. in English), 2010; Tkalec Ž. *et.al.*, Chemosphere, 2022; Qiu S. *et.al.*, Signal Transduction and Targeted Therapy, 2023), биоактивных компонентов в пище (Hu S. *et.al.*, Foods, 2022), в скрининговых сельскохозяйственных исследованиях (Liu Z. *et.al.*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022) и т.д.

Выявление и определение максимально возможного числа метаболитов относится к области нецелевой метаболомики, и служит основой для генерации новых гипотез и получения ранее неизвестных знаний (Grissa D. *et.al.*, Frontiers in Molecular Biosciences, 2016). Получаемый при этом огромный объем данных требует значительных затрат времени и усилий для их обработки и интерпретации. Методы получения и обработки данных взаимосвязаны: изменения, вносимые в масс-спектрометрические методы, влекут за собой и изменения по обработке получаемых с их помощью данных, что непосредственно влияет на конечный результат исследования. Поэтому методы обработки и интерпретации данных в нецелевой метаболомике являются важной частью исследования.

Универсальность масс-спектрометрии как метода анализа позволяет применять ее для решения разнообразных задач в различных областях целевой и нецелевой метаболомики, однако всё возрастающие требования к чувствительности и селективности количественного и качественного определения аналитов требуют разработки подходов, которые удовлетворяют выдвигаемым требованиям. Разработка методов и подходов, которые позволяют, как количественно анализировать образцы малого объема с высокой чувствительностью и селективностью, так и с высокой точностью детектировать и идентифицировать большое количество аналитов в ходе одного анализа, является крайне актуальной задачей.

### **Цель и задачи исследования.**

Основной целью настоящей работы являлась разработка новых и оптимизация существующих масс-спектрометрических подходов для количественного и/или качественного определения низкомолекулярных соединений.

В ходе исследования решались следующие задачи:

1. Создание масс-спектрометрических подходов по определению лекарственных препаратов в плазме крови для проведения доклинических и

клинических исследований на примере варфарина, нифедипина и тековиримата.

2. Разработка масс-спектрометрических подходов с использованием методов мониторинга множественных и параллельных реакций по определению лекарственных препаратов в сухих пятнах плазмы крови на примере варфарина, атенолола и аписабана.

3. Разработка методов масс-спектрометрии высокого разрешения для количественного определения лекарственных препаратов в плазме крови и сухих пятнах плазмы крови на примере тековиримата, атенолола и аписабана.

4. Разработка масс-спектрометрических подходов по количественному определению аминокислот и ацилкарнитинов в образцах различной природы.

5. Выявление панели потенциальных биомаркеров психических заболеваний подходами целевой и нецелевой метаболомики.

6. Определение состава экстрактов растений методами масс-спектрометрии высокого и низкого разрешения.

### **Научная новизна.**

Разработаны масс-спектрометрические подходы, позволившие повысить селективность и чувствительность анализа, уменьшить объем анализируемых проб и расширить спектр разнообразных по природе и составу объектов исследования целевой метаболомики; а также провести детальное изучение сложных по составу объектов исследования нецелевой метаболомики и осуществить их сравнительный анализ.

Впервые были разработаны и валидированы методы определения противовирусного препарата тековиримат в плазме крови человека с использованием тандемной масс-спектрометрии низкого и высокого разрешения. Показана применимость данных методов для доклинических и клинических исследований препаратов НИОХ-14 и тековиримат.

Разработан и валидирован метод определения варфарина в сухих пятнах плазмы крови с помощью тандемной масс-спектрометрии низкого разрешения. Методы определения варфарина и нифедипина впервые применены для оценки фармакокинетических параметров при исследовании нового способа доставки лекарственных препаратов.

Впервые разработаны и валидированы методы определения препаратов атенолол и аписабан в сухих пятнах плазмы крови с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения. Продемонстрирована возможность применения предложенных методов для количественного анализа и расчета фармакокинетических параметров при проведении клинических исследований.

Разработаны масс-спектрометрические методы количественного определения свободных аминокислот и ацилкарнитинов с использованием изотоп-меченных стандартов в сухих пятнах плазмы крови, в пищевых полуфабрикатах и продуктах, а также в экстрактах агрохимикатов.

Проведен поиск различий в метаболомных профилях больных шизофренией с помощью количественного масс-спектрометрического анализа аминокислот и ацилкарнитинов.

Метод тандемной масс-спектрометрии низкого разрешения был использован для определения профиля флавоноидов в экстрактах листьев растения *Myricaria bracteata*. Было идентифицировано семнадцать соединений, в основном метиловые эфиры кверцетина (изорамнетин, рамназин), кемпферол (кемпферид, рамноцитрин) и эллаговая кислота, а также кверцетин, кверцетин-3-глюкозид, кемпферол, лютеолин, хризозеиол, лимонная кислота, галловая кислота, метилгаллат, этил галлат и феруловая кислота.

С использованием масс-спектрометрии высокого разрешения в листьях *E. Longistipitata*. было обнаружено более 160 соединений, из которых 72 идентифицированы на уровне класса и 58 – на уровне отдельных соединений. В листьях *Rhododendron species* выявлено 132 соединения, идентифицированные как изопреноиды, фенольные соединения, азотсодержащие соединения, производные жирных кислот и другие органические соединения.

### **Теоретическая и практическая значимость исследования.**

Представленные в работе масс-спектрометрические подходы позволяют проводить как фундаментальные, так и прикладные исследования в областях целевой и нецелевой метаболомики. Разработанные и валидированные методы тандемной масс-спектрометрии низкого и высокого разрешения по определению тековиримата в плазме крови позволяют проводить доклинические и клинические исследования как самого тековиримата, так и его пролекарства – российского препарата НИОХ-14. Предложенный вариант повышения чувствительности методов масс-спектрометрии высокого разрешения за счет применения мониторинга параллельных реакций может быть применен для количественного определения различных лекарственных препаратов, что было продемонстрировано на примерах тековиримата, атенолола и аликсабана.

Разработанные методы масс-спектрометрического анализа позволяют уменьшить объем исследуемого образца плазмы крови до 1,6 мкл, в том числе за счет использования метода сухих пятен плазмы крови. Применимость сухих пятен плазмы крови была продемонстрирована на примере выявления

различий в профилях аминокислот и ацилкарнитинов при психических заболеваниях.

Предложенные подходы с использованием масс-спектрометрии высокого разрешения позволяют определять панели потенциальных биомаркеров заболеваний, на примере депрессии, даже без идентификации всех отобранных в панель соединений. В случае растительного сырья такие подходы позволяют определять возможную биологическую активность, используя полученный метаболомный профиль растения.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Применение тандемной масс-спектрометрии низкого и высокого разрешения позволяет использовать тековиримат в качестве первичного метаболита для определения фармакокинетических параметров российского противоопухолевого препарата НИОХ-14.
2. Использование мониторинга параллельных реакций при разработке методов масс-спектрометрии высокого разрешения по количественному определению лекарственных препаратов в сухих пятнах плазмы крови, позволяет повысить аналитическую чувствительность методики в 10 и более раз по сравнению с существующими методами масс-спектрометрии высокого разрешения, что показано на примере сердечно-сосудистых препаратов - аписабана и атенолола.
3. Разработанные масс-спектрометрические подходы позволяют использовать сухие пятна плазмы крови, эквивалентные объему плазмы крови 2 мкл, для мониторинга сердечно-сосудистых препаратов при проведении доклинических и клинических исследований.
4. Одновременное определение аминокислот аланина, аргинина, аспарагиновой кислоты, цитруллина, глутаминовой кислоты, глицина, метионина, орнитина, фенилаланина, тирозина, валина, изолейцина и пролина и 30-ти ацилкарнитинов методом тандемной масс-спектрометрии в сухих пятнах плазмы крови позволяет выявить отклонения в биохимических процессах, вызванные психическими расстройствами.
5. Использование масс-спектрометрии высокого разрешения позволяет определять метаболомные профили в образцах плазмы крови при психических заболеваниях даже без идентификации структуры всех метаболитов отобранных в панель потенциальных биомаркеров.
6. С использованием разработанных методов масс-спектрометрии высокого разрешения определен метаболомный профиль ряда растений, что позволило выявить видоспецифические различия в содержании биологически активных соединений и зависимость профиля от региона произрастания.



## **Публикации и апробация работы**

Основные результаты исследования опубликованы в 28 научных работах в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, и получен 1 патент на изобретение РФ. Основные результаты работы были представлены на международных и российских конференциях, в том числе в виде устных докладов: V Российская конференция с международным участием «Современные проблемы биологической психиатрии и наркологии» (Томск, 2023); IMSC 2022 (Маастрихт, Нидерланды, 2022); Всероссийская мультиконференция с международным участием «Биотехнология – медицине будущего» (Новосибирск, 2019); II Объединенный научный форум “VI съезд физиологов СНГ и VI съезд биохимиков России” (Дагомыс, 2019); V Международная конференция «Фундаментальные основы механохимических технологий» (Новосибирск, 2018); XI съезд Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (Москва, 2017); III Международная конференция молодых ученых вирусологов, молекулярных биологов и биотехнологов (Кольцово, 2016); Российская конференция с международным участием «Биомаркеры в психиатрии: поиск и перспективы» (Томск, 2016); VI Российско-Корейская конференция «Актуальные вопросы химии и биотехнологии биологически активных соединений» (Новосибирск, 2015); VII Российский симпозиум «БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ» (Новосибирск, 2015); 15th Tetrahedron Symposium Asian Edition (Сингапур, 2014); Юбилейный XX Российский национальный конгресс «Человек и лекарство» (Москва, 2013); V Международная конференция-школа «Фундаментальные вопросы масс-спектрометрии и ее аналитические применения» (Санкт-Петербург, 2013); 38th FEBS Congress (Санкт-Петербург, 2013); Научная конференция «Фундаментальные науки - медицине» (Новосибирск, 2013); International conference on Postgenomic technology for biomedicine (Новосибирск, 2012); Научная конференция «Фундаментальные науки - медицине» (Новосибирск, 2012); IV съезд фармакологов России «Инновации в современной фармакологии». (Казань, 2012).

## **Личный вклад автора**

Представленные в работе экспериментальные данные получены лично автором либо при его непосредственном участии и руководстве на всех этапах исследования, в том числе в рамках выполнения дипломных работ. Имена соавторов указаны в соответствующих публикациях. В совместных работах автору принадлежит ключевая роль по планированию и проведению масс-

спектрометрического анализа, обработке, оформлению и публикации соответствующих результатов.

Сбор образцов плазмы крови или образцов сыворотки крови, содержащих варфарин, был проведен при участии д.м.н. Лифшиц Г.И. (ИХБФМ СО РАН), д.х.н. Хвостова М.В., д.х.н. Толстиковой Т.Г. (НИОХ СО РАН); содержащих тековиримат был проведен при участии д.б.н. Шишкиной Л.Н., к.б.н. Бормотова Н.И. (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора). Соединение тековиримат было синтезировано и любезно предоставлено к.х.н. Селивановым Б.А. и д.х.н. Тихоновым А.Я. (НИОХ СО РАН). Образцы пищевых продуктов для анализа были предоставлены д.т.н. Бычковой Е.С. (НГТУ). Сбор образцов сыворотки крови здоровых доноров и больных психическими расстройствами был проведен при участии д.м.н. Ивановой С.А. и к.м.н. Медновой И.А. (Томский НИМЦ). Экстракты растений были получены при участии к.б.н. Карповой Е.А., к.б.н. Костиковой В.А., к.б.н. Амброс Е.В., к.б.н. Эрста А.С. (ЦСБС СО РАН).

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### ВВЕДЕНИЕ

Методы масс-спектрометрии, сочетающие в себе чувствительность и селективность, на сегодняшний день являются самыми востребованными при выявлении и идентификации как эндогенных, так и экзогенных метаболитов (Alseekh S. *et.al.*, *Nature Methods*, 2021). Анализируемые метаболиты могут очень сильно различаться как по своим физическим свойствам, например, по гидрофобности или массе, так и по химическим свойствам, обусловленным их строением. Аналитические подходы по определению метаболитов должны отвечать широкому ряду требований (Fernie A.R. *et.al.*, *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2004; Lu W. *et.al.*, *Annual Review of Biochemistry*, 2017). Другой существенной проблемой в анализе метаболитов является их широкий диапазон концентраций в тканях и биологических жидкостях. Во-первых, разница в концентрации отдельных метаболитов может варьировать от наномолярного до миллимолярного диапазона (Pignitter M. *et.al.*, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2016). Во-вторых, концентрация одного и того же метаболита может отличаться в различных тканях или биологических жидкостях. Например, концентрация аминокислот в крови составляет от 50 до 500 мкМ, а в спинномозговой жидкости в 100 раз меньше. Такой разброс концентрации аналитов приводит к тому, что в метаболомике востребованы методы, работающие в достаточно широком диапазоне.

Несмотря на некоторые сложности с количественным определением веществ, необходимость в изучении метаболитов возникает все чаще в различных

областях исследований: в медицине и токсикологии, в науках, изучающих питание, растения, работу отдельных клеток или органов (German J.B. *et.al.*, *Metabolomics: Official Journal of the Metabolomic Society*, 2005). Метаболомика изучает не только продукты сложных взаимодействий, происходящих внутри клетки (генома, транскриптома и протеома) или организма, но и за их пределами – в окружающей среде (Rinschen M.M. *et.al.*, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2019). Исследуемые соединения представляют собой широкий спектр полярных и неполярных метаболитов, выявлять и анализировать которые наиболее рационально с помощью масс-спектрометрии, сопряженной с жидкостной хроматографией (Li B. *et.al.*, *Molecules* (Basel, Switzerland), 2017).

### **1. Использование масс-спектрометрии для решения задач целевой метаболомики**

По своей сути метаболомика, как раздел науки, существовала и до повсеместного внедрения масс-спектрометрии как аналитической технологии (Alseekh S. & Fernie A.R. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2018). Детекция веществ при этом проводилась преимущественно по оптическому поглощению в видимой или ультрафиолетовой области спектра. Такой подход требовал получения индивидуальных пиков веществ в ходе хроматографического разделения, поскольку низкомолекулярные органические вещества зачастую имеют перекрывающиеся спектры поглощения, что при недостаточном разделении может вносить значительную погрешность в измерение. Соответственно, и основные акценты при разработке и совершенствовании аналитических методов смещались в сторону хроматографического разделения с целью получения индивидуальных пиков веществ. В связи с этим, на начальном этапе внедрения масс-спектрометрических подходов требовалось не только адаптировать существующие методы анализа, а по сути, создавать новые. С одной стороны, использование масс-анализаторов давало некоторые послабления к разделению веществ за счет одновременного определения всех масс выбранного диапазона в хроматографическом пике. С другой стороны, растворители и элюенты для масс-спектрометрии обладали рядом ограничений, что зачастую делало невозможным использование существующих методов хроматографического разделения. Подобные ограничения частично предъявлялись и к завершающим этапам пробоподготовки образцов, по крайней мере, аналиты должны были быть растворены в растворителях, подходящих для последующего масс-спектрометрического анализа.

## **1.1. Количественное определение лекарственных препаратов при проведении доклинических и клинических исследований**

Рост возможностей химического синтеза и накопление знаний о биохимических процессах, происходящих в организме в норме и патологии, привели к созданию или разработке большого количества новых лекарственных препаратов. Для каждого препарата требовалось проведение ряда доклинических, клинических, фармакокинетических, токсикологических и других исследований, которые невозможно проводить без разработанного и валидированного метода количественного анализа. На данный момент масс-спектрометрия является “золотым стандартом” для количественного анализа низкомолекулярных соединений в фундаментальных и прикладных исследованиях (Harper L. *et.al.*, Harm Reduction Journal, 2017).

### **1.1.1. Развитие подходов к анализу лекарственных препаратов в плазме крови**

#### **1.1.1.1. Разработка количественных методов анализа для определения фармакокинетического профиля метаболизма варфарина**

Варфарин - антикоагулянт непрямого действия, который длительное время используется для профилактики тромботических осложнений (Wadhwa R.K. *et.al.*, Circulation, 2014). Варфарин метаболизируется в печени, и в зависимости от генотипа пациента, выводится из организма с разной скоростью, что приводит к необходимости постоянного контроля его концентрации. Поэтому изучение влияния генотипа пациентов на метаболизм варфарина является одной из важных задач, требующей разработки масс-спектрометрических методов анализа. Для оценки влияния мутаций генов CYP2C9 и C+1173T VKORC1 на фармакокинетические параметры метаболизма варфарина у пациентов была разработана методика, основанная на ранее опубликованном методе (Osman A.A. Journal of Chromatography B, 2005). Для анализа использовали 1 мл плазмы крови, а осаждение белков осуществляли с помощью 1 М серной кислоты (Рисунок 1). Экстракцию варфарина проводили с помощью диэтилового эфира с последующим упариванием досуха на водяной бане при 30 °С. Образец перерастворяли путем поэтапного добавления к сухому остатку 150 мкл 100% и 50% ацетонитрила. Определение варфарина производилось методом прямого ввода, без хроматографического разделения. Было показано, что наилучшие результаты в искомом диапазоне концентраций достигались при последующем разбавлении образца в 6 раз раствором 50% ацетонитрила, и использовании аликвоты объемом 50 мкл для масс-спектрометрического анализа.

Анализ проводили на масс-спектрометре Agilent 6410 QQQ («Agilent Technologies», США) в режиме мониторинга выбранного иона (selected reaction monitoring, SRM) регистрируя молекулярный ион  $m/z$  307, соответствующий варфарину. Линейный диапазон концентраций составил 10-2000 нг/мл, с нижним пределом количественного определения (НПКО) 10 нг/мл. Аналитическая чувствительность метода (рассчитанное количество вещества, которое анализировалось при определении НПКО) при этом составила 0,28 нг. С помощью описанного метода были проанализированы образцы плазмы крови пациентов ( $n = 18$ ), которую отбирали через 1, 2, 3, 8, 24, 36 и 48 ч после приема 5 мг варфарина перорально. Для каждого пациента была построена зависимость изменения концентрации варфарина от времени и рассчитаны фармакокинетические параметры: клиренс (Cl), среднее время удерживания (MRT), кажущийся объем распределения ( $V_{ss}$ ), время полувыведения ( $T_{1/2}$ ), константа выведения (K), максимальная концентрация ( $C_{max}$ ) и время достижения максимальной концентрации ( $T_{max}$ ).

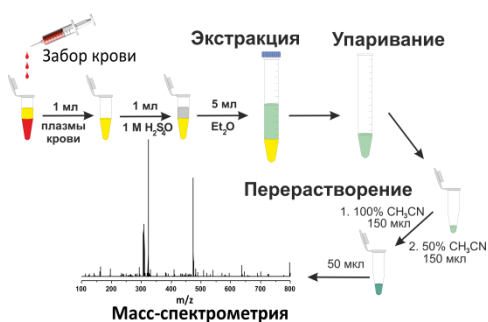


Рисунок 1. Схема пробоподготовки образцов плазмы крови, содержащих варфарин для проведения масс-спектрометрического анализа.

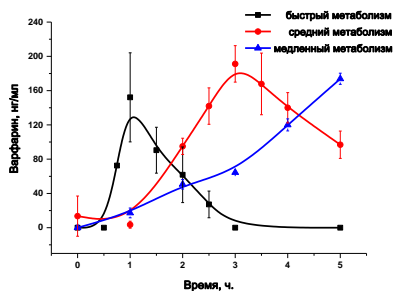


Рисунок 2. Примеры профилей зависимости средней концентрации варфарина в плазме крови от времени для быстрого, среднего и медленного метаболизма варфарина.

Генотип пациентов был соотнесен с быстрым, средним и медленным метаболизмом варфарина (Рисунок 2). Для каждой группы пациентов с разными аллелями *VKORC1* C+1173 были получены средние значения фармакокинетических параметров метаболизма варфарина (Таблица 1). Показано, что среди изученных генетических маркеров, полиморфизмы гена *VKORC1* вносят наибольший вклад в изменение таких фармакокинетических параметров, как среднее время удерживания, константа выведения, время полувыведения, максимальная концентрация. Такой же подход первоначально использовался и для изучения новых способов доставки варфарина в виде его комплексов с арабиногалактаном. В этом случае исследование проводилось на крысах, и для

сбора 1 мл плазмы крови требовался весь объем крови животного, что не позволяло проводить эксперименты с повторным приемом препарата.

Таблица 1. Фармакокинетические параметры метаболизма варфарина у пациентов с разными генами CYP2C9\*2, VKORC1.

	CYP2C9*2 – C/C, VKORC1 – T/T (4)	CYP2C9*2 – C/C, VKORC1 – C/C (6)	CYP2C9*2 – C/C, VKORC1 – C/T (4)	CYP2C9*2, VKORC1
Cl, мл/ч	1,3±1,1	1,5±1,4	0,5±0,5	3±6
MRT, ч	41±32	33±11	33±5	31±20
V <sub>ss</sub> , мл/кг	48±55	51±57	13±13	35±46
Terminal K, ч <sup>-1</sup>	(2,0±1,0)×10 <sup>-2</sup>	(2,7±0,6)×10 <sup>-2</sup>	(3,4±0,6)×10 <sup>-2</sup>	(3,7±1,6)×10 <sup>-2</sup>
Terminal T <sub>1/2</sub> , ч	38±16	25±5	18±6	23±12
T <sub>max</sub> , ч	6,4±7,7	1,3±0,7	7±11	3±6
C <sub>max</sub> , нг/мл	(2,9±3,1)×10 <sup>2</sup>	(5,1±4,0)×10 <sup>2</sup>	(8,3±7)×10 <sup>2</sup>	(4,8±4,0)×10 <sup>2</sup>

Для решения этой проблемы были изменены как процедура подготовки проб, так и сам метод масс-спектрометрического анализа. Объем образцов плазмы крови был снижен в 10 раз до 100 мкл, а осаждение белков плазмы крови осуществляли ацетонитрилом. Пробоподготовка включала в себя стадии упаривания и перерастворения в 200 мкл 50% водного раствора ацетонитрила с добавлением 0,01% муравьиной кислоты. Масс-спектрометрический анализ проводили в режиме мониторинга множественных реакций (multiple reaction monitoring, MRM), в котором анализируется не только ион целой молекулы, но ее фрагмент. Для снижения ошибки измерения концентрации аналита в качестве внутреннего стандарта использовался хлорварфарин. Внутренний стандарт это соединение, обладающее схожей структурой, но отличающиеся массой из-за некоторой модификации молекулы без значимых изменений ее физико-химических свойств.

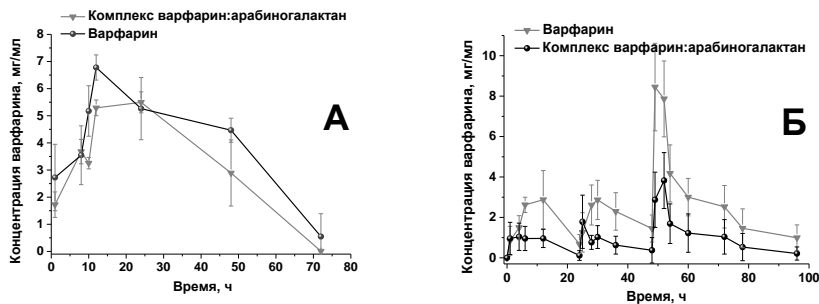


Рисунок 3. Профиль зависимости средней концентрации варфарина в плазме крови от времени для комплекса варфарин:арабиногалактан (соотношение 1:10) и варфарина после однократного перорального введения в дозе 20 мг/кг (доза варфарина равна 2 мг/кг) и 2 мг/кг, соответственно (А), и многократного перорального введения в дозе 5 мг/кг (доза варфарина равна 0,5 мг/кг) и 0,5 мг/кг, соответственно (Б).

Анализ проводили с использованием масс-спектрометра Agilent 6410 QQQ («Agilent Technologies», США), регистрируя в отрицательном MRM режиме переходы  $m/z$  307 → 161 (варфарин) и  $m/z$  341 → 161 (хлороварфарин). Учитывая разницу в концентрации препаратов, используемую при работе с животными и в клинических исследованиях на людях, метод анализа разрабатывался для диапазона концентраций 200 нг/мл – 167 мкг/мл, в пределах которого отклик вещества был линеен с  $R^2 > 0,99$ . Несмотря на то, что повышение НПКО до 200 нг/мл ухудшило аналитическую чувствительность метода (47,75 нг), с учетом более высоких доз препаратов, введенных животным, данный метод был успешно использован при определении концентраций варфарина, как после приема чистого препарата, так и его комплекса с арабиногалактом. Концентрация варфарина определялась в образцах плазмы крови животных ( $n=6$  в каждой группе), отобранных через 1, 2, 3, 8, 24, 36 и 48 ч после однократного перорального приема препаратов в дозировке варфарина 2 мг/кг или отобранных через 1, 4, 6, 12, 24, 25, 28, 30, 36, 48, 49, 52, 54, 60, 72, 78 и 96 ч после последовательного трехкратного перорального приема препаратов в дозировке варфарина 0,5 мг/кг (Рисунок 3). Дополнительно к клиренсу, среднему времени удерживания, времени полувыведения, максимальной концентрации и времени достижения максимальной концентрации, рассчитывалась и анализировалась площадь под кривой (AUC), которая значимо различалась как при однократном, так и при последовательном трехкратном введении варфарина и его комплекса (Таблицы 2 и 3). Было определено, что рост концентрации анализируемых соединений происходит схожим образом, однако  $C_{max}$  для чистого варфарина достигается на 8 часов быстрее ( $T_{max}$ ), чем для варфарина, введенного в комплексе с арабиногалактом (Таблица 2). При элиминации же наблюдается обратная зависимость, т.е. свободный варфарин выводится медленнее, чем варфарин в

Таблица 2. Фармакокинетические параметры метаболизма варфарина и варфарина в комплексе с арабиногалактом при однократном введении препаратов.

	Варфарин	Комплекс варфарин:арабиногалактан 1:10
Cl, мл/ч	<b>1,52±0,03</b>	<b>1,93±0,18*</b>
MRT, ч	<b>31,39±1,82</b>	<b>21,81±2,38*</b>
$T_{1/2}$ , ч	5,11±0,24	6,38±2,55
$T_{max}$ , ч	11,00±1,41	18,00±8,49
$C_{max}$ , мкг/мл	6,47±0,91	5,64±0,19
AUC, мкг ч/мл	<b>263,01±0,02</b>	<b>208,34±20,03*</b>
* $p < 0,05$ при сравнении с варфарином		

комплексе. Таким образом, было показано, что концентрация варфарина в комплексе с арабиногалактом возрастает более плавно, чем в случае свободного варфарина (Рисунок 3а), что может способствовать уменьшению риска развития кровотечений, связанных с резким подъемом концентрации варфарина и, как

Таблица 3. Фармакокинетические параметры метаболизма варфарина и варфарина в комплексе с арабиногалактаном после трехкратного введения препаратов.

	Варфарин	Комплекс варфарин:арабиногалактан 1:10
Cl, мл/ч	<b>0,84±0,10</b>	<b>2,98±1,25*</b>
MRT, ч	16,55±0,58	12,45±3,08
T <sub>1/2</sub> , ч	<b>23,41±1,40</b>	<b>11,64±4,85*</b>
T <sub>max</sub> , ч	50,5±1,7	51,4±1,3
C <sub>max</sub> , мкг/мл	<b>9,12±1,4</b>	<b>3,85±1,4*</b>
AUC, мкг ч/мл	<b>130,25±45,25</b>	<b>30,95±9,19*</b>
*p<0,05 при сравнении с варфарином		

варфарина в плазме (C<sub>max</sub>) после его перорального введения в составе комплекса оказалась ниже на 60%, чем после аналогичного введения чистого варфарина, а элиминация происходит быстрее, что отражается в сниженном на 12 часов периоде полувыведения и увеличенном на 70% клиренсе (Таблица 3). Однако, несмотря на разницу в фармакокинетических параметрах, эффективность обеих форм препарата различалась лишь на 15% (протромбиновое время меньше у комплекса варфарин:арабиногалактан). Таким образом, был сделан вывод, что введение варфарина в виде комплекса с арабиногалактаном является более безопасным с точки зрения снижения риска развития кровотечений и накопления варфарина в организме.

### 1.1.1.2. Определение фармакокинетического профиля нифедипина при образовании его комплекса с арабиногалактаном

Аналогичная задача по разработке количественного масс-спектрометрического метода анализа для сравнения фармакокинетических профилей препарата и его комплекса с арабиногалактаном решалась и для нифедипина. Нифедипин является гипотензивным лекарственным средством, антагонистом ионов кальция и широко используется в медицинской практике для снижения повышенного артериального давления при лечении артериальной гипертензии, в том числе гипертонического криза, профилактики инфарктов. Однако нифедипин плохо растворим в воде, и имеет низкую биодоступность при пероральном приеме. Соответственно, требовалось определить как повышается водорастворимость и увеличивается биодоступность нифедипина за счет образования комплексов с арабиногалактаном.

В отличие от варфарина, атенолол выводится из организма намного быстрее, что потребовало уменьшить интервал отбора проб у модельных животных до 0,5 часа для построения фармакокинетических профилей. Для уменьшения

следствие, резкому увеличению протромбинового времени в период подбора дозы препарата. Аналогичное различие в метаболизме варфарина наблюдалось при последовательном трехкратном введении свободного варфарина и его комплекса (Таблица 3). Фармакокинетические кривые в обоих случаях схожи (Рисунок 3б), однако концентрация



кропотери, объем образца плазмы крови был уменьшен до 50 мкл, что в свою очередь вызвало необходимость улучшения и упрощения процедуры пробоподготовки для достижения необходимой чувствительности метода. Главным отличием в пробоподготовке являлось добавление на первом этапе к образцам плазмы крови эквивалентного объема (50 мкл) метанола для получения мелкодисперсной взвеси осадка белков, и только потом проводилась экстракция ацетонитрилом (300 мкл). Такой способ экстракции хорошо зарекомендовал себя и использовался в дальнейшей работе с другими соединениями. Анализ проводили в режиме MRM: регистрировали переходы отрицательно заряженных ионов с  $m/z$  345,1→222 для нифедипина и  $m/z$  387,1→263,9 для нисолдипина, используемого в качестве внутреннего стандарта. Аналогично варфарину, определение нифедипина производилось методом прямого вкола, без хроматографического разделения с общим временем анализа 3,5 минуты.

Линейная зависимость отклика сигнала наблюдалась в диапазоне концентрации 100–10000 нг/мл с,  $R^2 = 0,999$ , что позволило построить профили метаболизма нифедипина и его комплекса с арабиногалактаном и рассчитать фармакокинетические параметры. Аналитическая чувствительность метода при этом составила 11,1 нг, что объясняется достаточно высоким НПКО (100 нг/мл), обусловленным дозами препаратов, вводимыми животным.

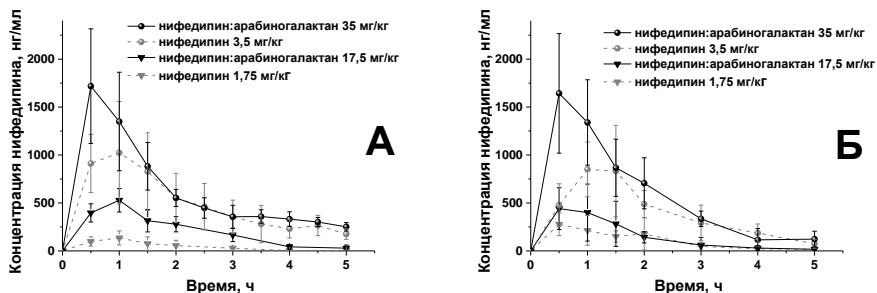


Рисунок 4. Профили зависимости средней концентрации нифедипина в плазме от времени после перорального приема комплекса нифедипина:арабиногалактана (соотношение 1:10) в дозах 35 и 17,5 мг/кг (доза нифедипина равна 3,5 и 1,75 мг/кг) и нифедипина в дозах 3,5 и 1,75 мг/кг, полученные для крыс линии Вистар (А) и НИСАГ (Б).

Возможность количественного определения препарата при многократном заборе крови в течение 5 часов у одного и того же животного позволило проводить персонализированный мониторинг его концентрации. Для этого были проанализированы образцы плазмы крови линий крыс Вистар и НИСАГ (n=5), отобранные через 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 и 5 ч после однократного

перорального приема препаратов в дозировках нифедипина 1,75 и 3,5 мг/кг. Полученные концентрации использовались для построения профилей зависимости средней концентрации нифедипина в плазме от времени (Рисунок 4), по которым с помощью программного обеспечения PKSolver были рассчитаны фармакокинетические параметры.

Основные фармакокинетические различия между свободным нифедипином и комплексом нифедипин:арабиногалактан обнаружены на временном интервале 60 мин. Наибольшее отклонение концентрации (почти в два раза) нифедипина в крови между группами свободного нифедипина и его комплекса в дозах 3,5 и 35 мг/кг, соответственно, отмечено в момент времени, соответствующий 30 мин (Рисунок 4).

В группах с меньшей дозой нифедипина наибольшая разница наблюдалась через 60 минут после введения. Элиминация нифедипина зависела от его формы введения и от дозы. Полученные результаты фармакокинетического исследования (Таблица 4) подтверждают разницу в гипотензивном действии свободного нифедипина и его комплекса с арабиногалактаном на линиях крыс НИСАГ (моделирующей состояние гипертонической болезни) и Вистар.

Таблица 4. Фармакокинетические параметры метаболизма нифедипина (НФ) и нифедипина в комплексе с арабиногалактаном в соотношении 1:10 (НФ:АГ).

	Линия крыс Вистар				Линия крыс НИСАГ			
	1,75 мг/кг		3,5 мг/кг		1,75 мг/кг		3,5 мг/кг	
	НФ	НФ:АГ	НФ	НФ:АГ	НФ	НФ:АГ	НФ	НФ:АГ
$T_{1/2}$ , ч	0,50 ± 0,03	0,91 ± 0,11*	0,64 ± 0,07	0,72 ± 0,05	1,20 ± 0,20	0,86 ± 0,12	1,15 ± 0,05	2,16 ± 0,29#
$T_{max}$ , ч	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,3 ± 0,2	0,9 ± 0,2	1,3 ± 0,3	0,7 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,5 ± 0,0#
$C_{max}$ , нг/мл	124 ± 31	540 ± 56*	400 ± 83	516 ± 87	980 ± 127	1808 ± 266*	1150 ± 130	1748 ± 343
$AUC_{0-inf}$ , нг/(мл × ч)	216 ± 72	1130 ± 90*	525 ± 134	661 ± 132	2150 ± 352	3102 ± 211	1982 ± 221	3834 ± 262#
$MRT$ , ч	1,57 ± 0,07	2,02 ± 0,22	1,50 ± 0,12	1,58 ± 0,08	2,4 ± 0,23	1,68 ± 0,03*	2,04 ± 0,13	3,00 ± 0,42#
$V_z$ , мл	1,76 ± 0,39	0,41 ± 0,06*	1,18 ± 0,41	0,97 ± 0,19	1,00 ± 0,23	0,53 ± 0,03*	0,69 ± 0,11	0,50 ± 0,10
$Cl$ , мл/ч	2,17 ± 0,46	0,31 ± 0,02*	1,18 ± 0,29	0,90 ± 0,13	0,73 ± 0,14	0,45 ± 0,06	0,42 ± 0,06	0,18 ± 0,01#

\*  $p \leq 0,05$  по сравнению с НФ 1,75 мг/кг, #  $p \leq 0,05$  по сравнению с НФ 3,5 мг/кг; НФ - нифедипин, АГ - арабиногалактан

Было показано, что концентрация нифедипина в крови после перорального введения комплекса выше, чем концентрация после введения свободного нифедипина вследствие повышения биодоступности лекарственного препарата (Таблица 4). Следовательно, доза нифедипина, необходимая для снижения артериального давления, может быть минимизирована при использовании его комплекса с арабиногалактаном.

### 1.1.1.3. Применение масс-спектрометрического метода для анализа препарата тековиримат при проведении доклинических и клинических исследований его пролекарства НИОХ-14

Более показательным примером изменения масс-спектрометрических подходов при анализе одного и того же анализа является развитие подхода к

анализу соединения НИОХ-14. НИОХ-14 является аналогом тековиримата, первого зарегистрированного препарата в мире (в США), предназначенного для лечения натуральной оспы, и обладает сравнимой с ним активностью в отношении ортопоксвирусов. НИОХ-14 был разработан российскими исследователями из Новосибирского института органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН и ГНЦ ВБ «Вектор» ввиду патентных ограничений по синтезу тековиримата. НИОХ-14 является пролекарством относительно тековиримата и при попадании в организм полностью в него превращается. Однако отсутствие данных о метаболизме НИОХ-14 в организме привело к необходимости разработать методы анализа данного препарата как в сыворотке или плазме крови, так и в гомогенатах ряда органов для проведения различных доклинических и клинических исследований.

В результате экспериментов обнаружено, что в концентрациях, необходимых для построения калибровочных кривых, НИОХ-14 растворяется в 10% ДМСО в ацетонитриле. В масс-спектре препарату НИОХ-14 соответствует пик с  $m/z$  393, тековиримату –  $m/z$  375, внутреннему стандарту с условным обозначением N-98 –  $m/z$  337 (Рисунок 5а).

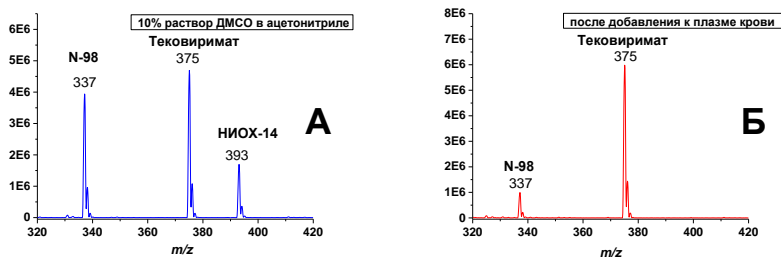


Рисунок 5. Масс-спектры смеси НИОХ-14, тековиримата, N-98 в 10% растворе ДМСО в ацетонитриле (А), и при добавлении к плазме крови (Б). Пик с  $m/z$  393 соответствует НИОХ-14,  $m/z$  375 – тековиримату,  $m/z$  337 – N-98.

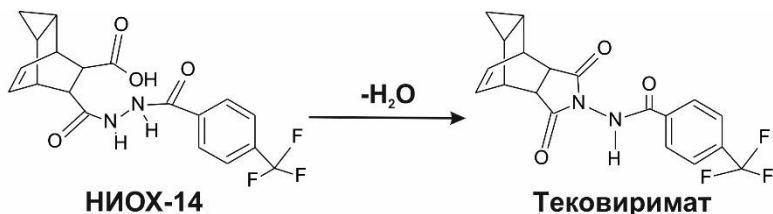


Рисунок 6. Схема превращения НИОХ-14 в тековиримат в организме.

При добавлении к плазме крови НИОХ-14 полностью превращается в тековиримат (Рисунок 6), и в исследуемом образце не удастся зарегистрировать пик с  $m/z$  393, соответствующий НИОХ-14 (Рисунок 5б).

Решением данной проблемы является проведение анализа НИОХ-14 по его первичному метаболиту – тековиримату. Первоначально, в случае гомогенатов органов и сыворотки крови для анализа брали 100 мкл образца, затем объем для сыворотки крови был уменьшен до 80 мкл. Анализ образцов проводили в отрицательном режиме на масс-спектрометре Agilent 6410 QQQ («Agilent Technologies», США), используя метод SRM с регистрацией ионов  $m/z$  375 (тековиримат) и  $m/z$  337 (N-98). Для увеличения селективности метода и подтверждения структуры аналитов в дальнейшем стали использовать метод MRM, с регистрацией переходов  $m/z$  375→283 (тековиримат),  $m/z$  337→245 (N-98), причем линейный диапазон концентрации в обоих случаях был 50-40000 нг/мл. Высокие значения нижнего и верхнего пределов концентрации были обусловлены большой дозой препарата введенной животным. Тем не менее, комбинация изменений процесса пробоподготовки, и самого метода масс-спектрометрического анализа привели к улучшению аналитической чувствительности с 5 нг до 0,47 нг.

Исследование биодоступности НИОХ-14 проводили на самцах и самках мышей (n=228), которым вводили, как перорально НИОХ-14 в дозе 10 мг/г, НИОХ-14 и тековиримат в дозе 50 мг/г, так и внутривенно НИОХ-14 и тековиримат в дозе 2 мг/г. При пероральном введении определяли концентрацию тековиримата через 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24 и 48 ч, в случае внутривенного введения добавлялась временная точка 0,25 ч.

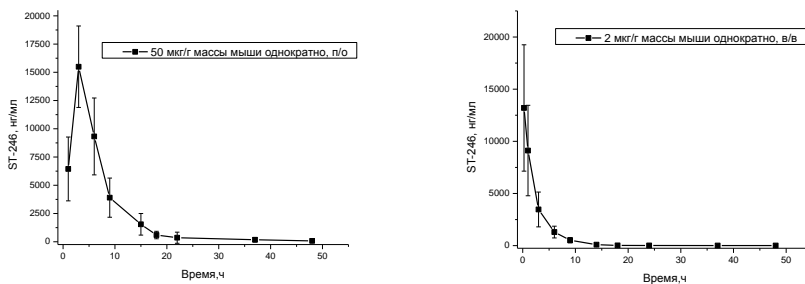


Рисунок 7. Примеры профилей зависимости средней концентрации тековиримата в сыворотке крови от времени после перорального приема (А) и внутривенного введения (Б) препарата НИОХ-14.

Сравнение фармакокинетики НИОХ-14 и тековиримата показало, что фармакокинетические профили при приеме субстанции НИОХ-14 соответствовали профилям самого тековирима (Рисунок 7), а рассчитанные фармакокинетические параметры (Таблица 5) отличались незначительно. На основании фармакокинетических показателей тековиримата в сыворотке крови мышей была рассчитана абсолютная биодоступность препаратов. Для тековиримата

Таблица 5. Фармакокинетические параметры метаболизма субстанции НИОХ-14 и тековиримата в сыворотке крови, однократно вводимых мышам внутривенно (в/в) в дозе 2 мкг/г массы тела и перорально (п/о) в дозе 50 мкг/г массы тела.

Параметры	НИОХ-14			Тековиримат	
	(в/в)	(п/о)	(п/о)	(в/в)	(п/о)
	доза на массу тела				
	2 мкг/г	10 мкг/г	50 мкг/г	2 мкг/г	50 мкг/г
$T_{1/2}$ , ч	2,32	4,70	5,65	1,97	3,40
$T_{max}$ , ч	0,25	3	6	0,25	3
$C_{max}$ , мкг/мл	9,5±3,9	5,4±1,4	15,4±3,4	13,2±4,3	15,5±3,2
$AUC_{0-t}$ , (мкг/мл)×ч	24,9	48,9	141,9	34,5	103,7
Fabs, %	—	39,2	22,8	—	12,1

$C_{max}$  представлена в виде  $M \pm SD$  при  $n=6$ .

биодоступность составила 12,1% при пероральном введении в дозе 50 мкг/г относительно внутривенного введения в дозе 2 мкг/г (Таблица 5), а для субстанции НИОХ-14 – 22,8% при пероральном введении в дозе 50 мкг/г и 39,2% при пероральном введении в дозе 10 мкг/г

относительно внутривенного введения в дозе 2 мкг/г (Таблица 5). Дополнительно, были определены фармакокинетические параметры активного метаболита субстанции НИОХ-14 в сыворотке крови и тканях органов мыши после однократного перорального введения субстанции НИОХ-14 в дозировке 50 мкг/г массы тела (Таблица 6), позволившие оценить распределение препарата в организме.

Для этого НИОХ-14 вводили мышам ( $n=102$ ) перорально в дозе 50 мкг/г однократно и в дозах 50 и 5 мкг/г в течение 10 суток. Через 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24, 48 и 72 ч после прекращения введения НИОХ-14 производили забор крови для получения сыворотки крови, а также легких, селезенки, почек, печени и

Таблица 6. Фармакокинетические параметры активного метаболита тековиримата в сыворотке крови и органах мышей при однократном пероральном введении НИОХ-14 (50 мкг/г).

Параметры	Сыворока	Легкие	Печень	Селезенка	Мозг	Почки
$T_{1/2}$ , ч	4,2	12,5	5,6	8,5	13,2	5,5
$T_{max}$ , ч	6	9	6	9	9	6
$C_{max}$ , нг/мл	2058 ± 641	2009 ± 1746	1043 ± 514	286 ± 158	252 ± 38	1072 ± 453
$AUC_{0-t}$ , (мкг/мл)×ч	22666	21880	15026	3989	4277	13813
$f_T$ (%)	-	100	69,6	20,3	26,8	63,3

$C_{max}$  представлена в виде  $M \pm SD$  при  $n=6$ .

мозга для получения гомогенатов органов. Затем в образцах сыворотки крови и гомогенатах органов мышей определяли концентрацию активного вещества. По построенным профилям зависимости средней концентрации тековиримата в сыворотке крови и гомогенатах органов рассчитывали фармакокинетические параметры для каждого вида биологического образца (Таблица 6, пример однократного НИОХ-14 в дозировке 50 мкг/г). Было выявлено, что НИОХ-14 проявляет тканевую доступность для основных органов (легкие, сердце, селезенка, головной мозг и почки), которые являются органами-мишенями для вируса экстремелии, как было показано ранее (Mazurkov O.Yu. *et.al.*, The

Journal of General Virology, 2016). Таким образом, наряду с продемонстрированной ранее эффективностью в отношении ортопоксвирусов (в том числе вируса натуральной оспы) была показана безопасность и биодоступность субстанции НИОХ-14 в экспериментах на лабораторных животных.

Переход в стадию клинических исследований потребовал переработку метода анализа для снижения диапазона анализируемых концентраций, а так же его полную валидацию. По аналогии с нифедипином, объем образца был уменьшен до 50 мкл плазмы крови, а пробоподготовка упрощена до одной стадии. К образцам плазмы крови для получения мелкодисперсной суспензии добавляли 50 мкл метанола, затем добавляли 200 мкл рабочего раствора внутреннего стандарта и проводили экстракцию при 40 °С в течение 60 мин. Для каждого анализируемого вещества количество детектируемых переходов в режиме MRM было увеличено до трех. Переходы с наиболее сильным сигналом использовались для количественного определения:  $m/z$  375,1 → 283,1 (тековиримат) и  $m/z$  337,2 → 245,2 (N-98). А переходы  $m/z$  375,1 → 188,2 и  $m/z$  375,1 → 96,1, и  $m/z$  337,2 → 188,1 и  $m/z$  337,2 → 111,0 использовались для подтверждения структуры тековиримата и внутреннего стандарта, соответственно.

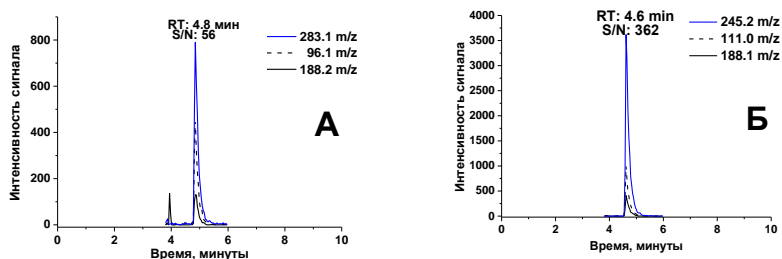


Рисунок 8. Репрезентативные хроматограммы для нижнего предела количественного определения тековиримата (10 нг/мл) по переходам  $m/z$  375,1→283,1, 375,1→188,2 и 375,1→96,1 (А) и для 30 нг/мл внутреннего стандарта по переходам  $m/z$  337,2→245,2, 337,2→188,1 и 337,2→111,0 (Б) с соответствующим временем удерживания (RT) и отношением сигнал/шум (S/N).

Для увеличения чувствительности метода проводили хроматографическое разделение с общим временем анализа 10 минут. Регистрацию сигналов проводили в период с 4,2 по 5,8 мин, т. е. в пределах времен удерживания тековиримата и внутреннего стандарта; в остальное время поток элюента был направлен в слив для уменьшения загрязнения прибора (Рисунок 8). Метод был полностью валидирован в соответствии с рекомендациями Европейского агентства по лекарственным средствам для валидации биоаналитических методов по следующим показателям: внутрисуточная и междусуточная точность и

прецизионность, матричный эффект, эффект переноса, процент экстракции, кратковременная и долговременная стабильность, стабильность после трех циклов заморозки-разморозки. Каждый эксперимент проводили как минимум

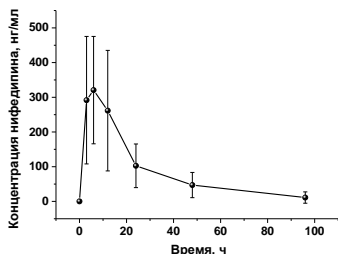


Рисунок 9. График зависимости средней концентрации тековиримата в плазме крови от времени как основного непосредственного метаболита НИОХ-14 после однократного перорального приема 600 мг НИОХ-14 здоровыми добровольцами (n = 4).

в 4 повторах. Линейный отклик сигнала был в диапазоне 10–2500 нг/мл с коэффициентом детерминации  $R^2 > 0,99$ . При этом аналитическая чувствительность метода была значительно повышена и составила уже 17 пг. К сожалению, в литературе отсутствует полное описание существующих методов, которое бы позволило провести сопоставление аналитической чувствительности разработанного метода с ранее предложенными. Было показано, что образцы плазмы с тековириматом были стабильны при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 90 дней, а после экстракции тековиримат в растворе был стабилен в течение 48 часов при  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Разработанный метод подходит для анализа как тековиримата, так и НИОХ-14 при проведении доклинических, клинических, фармакокинетических исследований и исследований токсичности.

Таблица 7. Фармакокинетические параметры НИОХ-14, рассчитанные по его основному непосредственному метаболиту, тековиримату.

Параметр	Значение
$\lambda_{z, 1/ч}$	$0,05 \pm 0,03$
$T_{1/2}, ч$	$17,2 \pm 8,3$
$T_{max}, ч$	$5,25 \pm 4,5$
$C_{max}, нг/мл$	$415 \pm 80$
$AUC_{0-inf}, нг/(мл \times ч)$	$8864 \pm 4117$
$MRT_{0-inf}, h$	$25 \pm 12$
$V_{ss}, л$	$1798 \pm 804$
$Cl, л/ч$	$80 \pm 37$

Разработанный метод был впервые успешно применен для терапевтического лекарственного мониторинга нового противовирусного препарата НИОХ-14 в клиническом исследовании и показал возможность анализа НИОХ-14 путем обнаружения его основного метаболита - тековиримата (Рисунок 9). При этом фармакокинетические параметры НИОХ-14 (Таблица 7), рассчитанные по концентрации тековиримата, характеризуются более низкой максимальной концентрацией в плазме крови человека, но более длительным периодом полувыведения. По площади под кривой было установлено, что доза 600 мг НИОХ-14 приблизительно эквивалентна 250 мг тековиримата.

В настоящее время tandemные масс-спектрометры с тройным квадруполом являются признанными лидерами среди масс-анализаторов, используемых для количественного определения низкомолекулярных веществ, вследствие высокой чувствительности и приемлемой селективности. Однако, даже в MRM

режиме (на примере Agilent 6410 QQQ) минимальное разрешение составляет  $m/z$  0,7 полной ширины на уровне половины высоты пика (full width at half maximum, FWHM). Это может приводить к контаминации сигнала схожими по массе молекулами из раствора. Как правило, это становится заметно при низких концентрациях аналита, когда даже минимальное загрязнение может вносить значимый вклад в регистрируемый сигнал. Одним из путей решения этой проблемы является использование масс-спектрометров высокого разрешения, где точность определяемой  $m/z$  составляет не десятые доли атомной единицы массы как в случае тройного квадруполя, а десяти- или даже стотысячную долю. Однако платой за такую высокую селективность является снижение чувствительности приборов относительно масс-спектрометров с тройным квадруполем из-за того, что на каждом цикле сканирования больше времени затрачивается для достижения высокого разрешения, а не на накопление сигналов. Поэтому разработка методов анализа с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения, как минимум, с такой же чувствительностью, которая достигается на масс-спектрометрах типа тройной квадруполь, в настоящее время является актуальной задачей.

Среди режимов анализа у масс-спектрометров высокого разрешения типа орбитальной ловушки есть режим мониторинга параллельных реакций (parallel reaction monitoring, PRM), в котором производится одновременная детекция как молекулярного иона, так и всех фрагментов молекулы. Метод PRM можно рассматривать как аналог метода MRM, одновременно позволяющий идентифицировать несколько фрагментов молекулы с высоким разрешением. Как правило, чем выше точность определяемой массы, тем меньше примесей регистрируется одновременно с аналитом. С одной стороны, такой подход

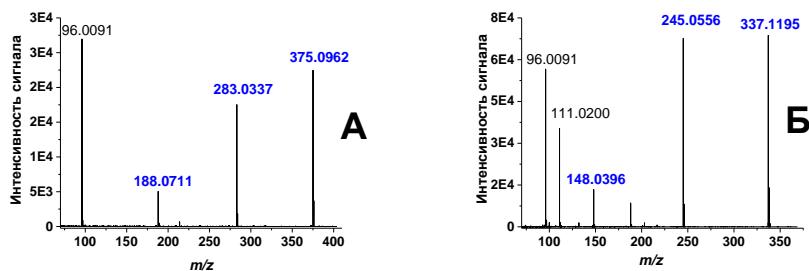


Рисунок 10. Масс-спектры высокого разрешения тековиримата (А) и внутреннего стандарта (Б) зарегистрированные методом PRM. Ионы фрагментов, выбранные для количественного анализа, выделены синим цветом.

повышает избирательность; с другой стороны, это снижает чувствительность анализа, поскольку наилучшая селективность обеспечивается массовым допуском в 1 часть на миллион (ppm) или менее. Использование PRM



позволяет увеличить допуск по массе примерно до 10 ppm без ущерба для селективности. Это достигается одновременным определением  $m/z$  как всей молекулы, так и фрагментарных ионов, как в методе MRM. При этом сигналы от разных фрагментов можно суммировать для усиления общего отклика. Поэтому с целью улучшения метода анализа препаратов НИОХ-14 и тековиримат был разработан метод PRM для тековиримата и внутреннего стандарта N-98. Проведя инструментальную настройку параметров процесса фрагментации тековиримата и внутреннего стандарта, были получены характерные наборы фрагментов (Рисунок 10).

По точной массе были определены структуры фрагментов тековиримата и внутреннего стандарта (Рисунок 11). Для количественного определения тековиримата были выбраны ионы целой молекулы с  $m/z$  375,0962 и двух фрагментов с  $m/z$  188,0711 и 283,0337. Некоторые фрагменты тековиримата

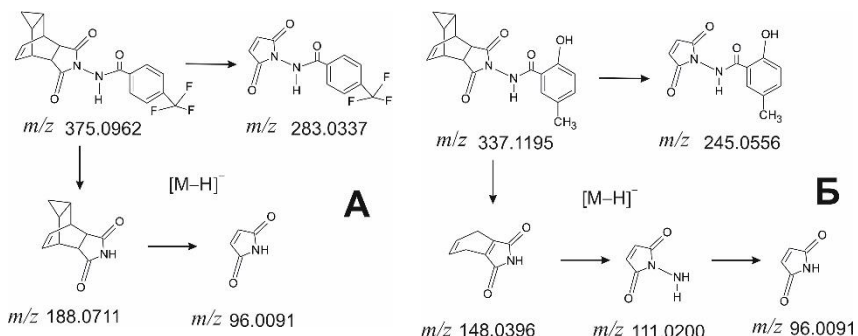


Рисунок 11. Структуры фрагментов ионов тековиримата (А) и внутреннего стандарта (Б), образующихся при разрушении молекулы во время проведения масс-спектрометрического анализа.

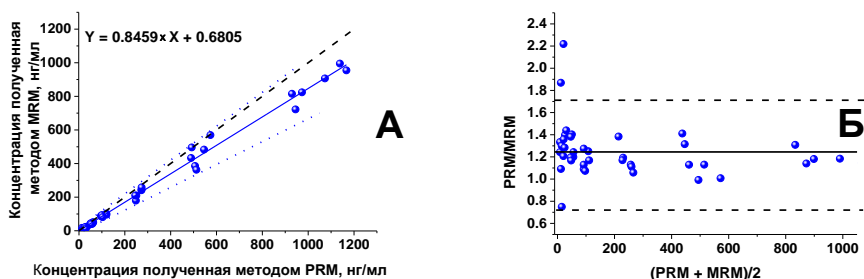


Рисунок 12. Сравнительный анализ методов MRM и PRM.

(А). График корреляции Пассинга-Баблока. Корреляция между концентрациями тековиримата в плазме крови, определенная методом PRM (ось X) и методом MRM (ось Y).

(Б). График отношения концентрации, определенной методом PRM, к концентрации, определенной методом MRM, в сравнении со средней концентрацией пробы, выявленными двумя методами. Сплошная черная линия обозначает среднее отношение 1,24, а пунктирные линии представляют 95% доверительный интервал.

и N-98 были идентичны из-за сходства структур. Чтобы избежать интерференции сигналов между тековириматом и внутренним стандартом, для последнего наряду с ионом целой молекулы  $m/z$  337,1195, были выбраны фрагменты с  $m/z$  148,0396 и 245,0556, отличающиеся от фрагментов тековиримата.

Усиление конечного сигнала путем суммирования сигналов нескольких значений  $m/z$  позволило добиться сопоставимой эффективности предлагаемого метода по сравнению с методами MRM по показателям точности, воспроизводимости и стабильности во время валидации. При этом линейный диапазон метода PRM составил 10–5000 нг/мл, тогда как в методах MRM этот диапазон составляет либо 50–4000 нг/мл (Jordan R. *et.al.*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2010; Chinsangaram J. *et.al.*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2012; Leeds J.M. *et.al.*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2013) либо 10–2500 нг/мл (Oleinik G.A. *et.al.*, Molecules, 2022). Аналитическая чувствительности метода (17 пг) была эквивалентна чувствительности для разработанного ранее MRM метода.

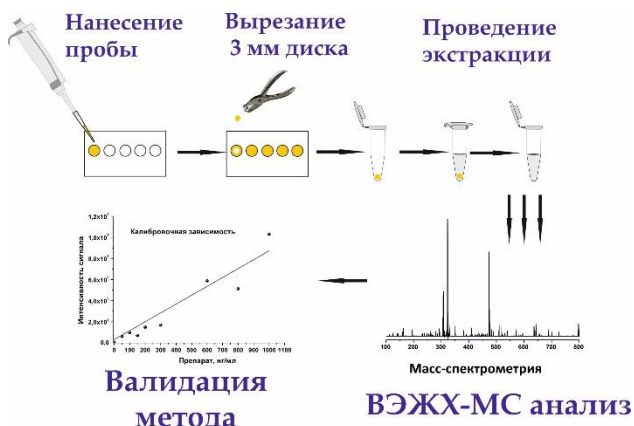
Сравнение методов MRM и PRM, примененных к одним и тем же образцам, показывает, что концентрация, определенная методом PRM, примерно на 24% выше и ближе к фактической (Рисунок 12). Поскольку эта разница наблюдается во всем диапазоне концентраций, она может быть вызвана использованием разных методов масс-спектрометрии и должна учитываться при выборе метода определения тековиримата.

### **1.1.2. Разработка методов масс-спектрометрического анализа лекарственных препаратов в сухих пятнах плазмы крови**

К отдельному классу матрицы для сбора и хранения образцов можно отнести сухие пятна крови или сухие пятна плазмы крови. Сухие пятна представляют собой высушенную кровь или плазму крови, нанесенную на специальную целлюлозную бумагу. Данная технология подготовки образцов обладает следующими преимуществами: требуется небольшой объем крови для приготовления одного сухого пятна; полученные образцы обладают повышенной стабильностью и менее требовательны к условиям транспортировки по сравнению с биологическими жидкостями. К недостаткам сухих пятен крови можно отнести эффект гематокрита, который существенно влияет на количественные измерения аналитов. Следует отметить, что сухие пятна плазмы крови лишены данного недостатка.

### 1.1.2.1. Разработка и валидация метода определения варфарина в сухих пятнах плазмы крови

Переход от анализа варфарина в плазме крови к определению варфарина в сухих пятнах плазмы крови привел к необходимости разработки соответствующего метода количественного определения. Для стандартизации измерений из сухого пятна плазмы крови вырезали диск диаметром 3,2 мм, что соответствует 1,6 мкл плазмы крови, тогда как ранее для анализа использовали 100 мкл плазмы крови. Снижение объема образца более чем в 50 раз потребовало значимой переработки метода для достижения диагностической чувствительности, продемонстрированной в случае плазмы крови. Итоговая схема подготовки образцов представлена на рисунке 13. Вкратце: плазму крови объемом 30 мкл наносили на специальную бумагу Whatman 903 Protein Saver Card и высушивали в течение как минимум 3 часов. Из середины пятна вырезался диск диаметром 3,2 мм. Экстракция варфарина из вырезанного диска проводилась раствором 50% ацетонитрила, содержащего 10 мМ  $\text{NH}_4\text{COOH}$  (pH 4,0) и 2,5 нг/мл внутреннего стандарта в течение часа при 25°. Проводили хроматографическое разделение с общим временем анализа 5 минут. Анализ, как и ранее, проводили на масс-спектрометре Agilent 6410 QQQ («Agilent Technologies», США), регистрируя в отрицательном MRM режиме переходы  $m/z$  307 → 161 (варфарин) и  $m/z$  341 → 161 (внутренний стандарт).



В результате было показано, что линейный диапазон концентраций составляет 10-10000 нг/мл, что делает данный метод подходящим как для анализа концентрации варфарина в сухих пятнах крови человека, так и применим для доклинических исследований на небольших животных.

Рисунок 13. Схема пробоподготовки и определения концентрации при анализе лекарственных препаратов на примере варфарина.

Разработанный метод также был валидирован согласно рекомендациям Европейского агентства по лекарственным средствам для валидации биоаналитических методов. В диапазоне концентрации препарата 10-10000 нг/мл внутри- и межсуточная точность и прецизионность были <13%, процент

экстракции составил 82-99%, и образцы были стабильны как минимум в течение трех недель при 4°C и 25°C. Данный метод позволяет оперировать небольшими объемами плазмы крови, а аналитическая чувствительность метода составила 5 пг вещества, что делает данный метод более чувствительным, чем вышеописанные методы по определению варфарина в плазме крови.

### **1.1.2.2. Комбинация методов тандемной масс-спектрометрии высокого и низкого разрешения при разработке и валидации методов анализа на примере препаратов атенолол и аписабан**

Характерным примером разработки количественных методов анализа является комбинация масс-спектрометрии низкого и высокого разрешения при определении концентрации атенолола и аписабана в сухих пятнах плазмы крови. Атенолол является кардиоселективным  $\beta$ 1-адреноблокатором и используется при гипертонии, а аписабан относится к пероральным антикоагулянтам нового поколения. Поскольку гипертония и тромбообразование являются одними из главных факторов возникновения сердечно-сосудистых катастроф, разработка методов количественного определения препаратов, используемых для их терапии, является актуальной задачей.

В данном случае переход от использования масс-спектрометрии низкого разрешения к высокому разрешению осуществлялся во время разработки методологии анализа. Сначала детально подбирали условия экстракции препаратов из сухих пятен плазмы крови. Для этого тестировали 5 типов растворителей согласно работе (Wong P. *et.al.*, Bioanalysis, 2010), приготовленных с 10% шагом для выявления экстрагирующих растворов, дающих максимальных выход: 50-100% метанол или ацетонитрил как с водой, так и с 0.1% муравьиной кислоты в воде, а также раствор 0-100% метанола в ацетонитриле. Затем отбирали 4 растворителя (60% метанол в воде, 90% ацетонитрил в воде, метанол:раствор 0.1% муравьиной кислоты в воде (80:20, об/об), и ацетонитрил:раствор 0.1% муравьиной кислоты в воде (90:10, об/об)), показавшие наибольшую эффективность, и уже с ними определяли показатели, приводящие к наиболее эффективной экстракции препаратов: время и температуру экстракции, объем растворителя. Наибольшую эффективность экстракции удалось достичь при следующих показателях: время экстракции при перемешивании со скоростью 800 об/мин – 15 минут, температура – 40 °C, объем растворителя – 100 мкл, для атенолола – 60% метанол, для аписабана – 90% ацетонитрил.

При этом количественное определение проводили на масс-спектрометре Agilent 6410 QQQ («Agilent Technologies», США), регистрируя в положительном MRM режиме переходы  $m/z$  267,2→145,1 для количественного определения атенолола и  $m/z$  267,2→190,1, 267,2→225 для подтверждения структуры, а также переходы  $m/z$  460,3→443,3 для количественного определения апиксабана, и  $m/z$  460,3→199,2 для подтверждения его структуры.

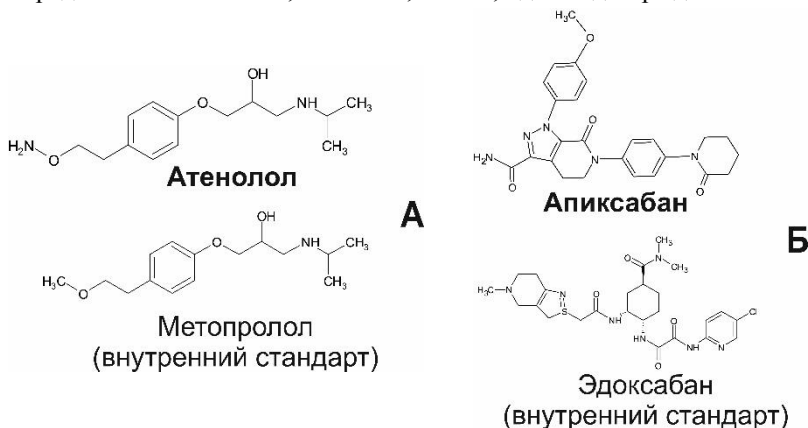


Рисунок 14. Структуры атенолола (А) и апиксабана (Б) и их внутренних стандартов.

Оптимальные условия пробоподготовки и экстракции образцов использовались для последующей разработки и валидации количественного определения препаратов методом масс-спектрометрии высокого разрешения в режиме PRM на масс-спектрометре Q Exactive HF (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA USA). Масс-спектрометрический анализ проводили с предварительным хроматографическим разделением образцов с общим временем анализа 5 минут, подбирая градиент элюентов для каждого

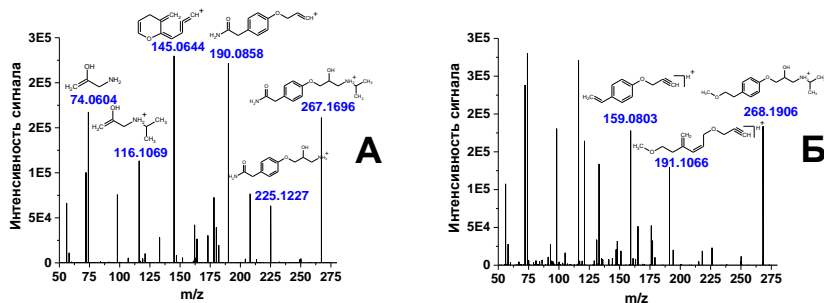


Рисунок 15. Масс-спектры высокого разрешения атенолола (А) и его внутреннего стандарта (Б), зарегистрированные методом PRM. Ионы фрагментов, выбранные для количественного анализа, выделены синим цветом.

препарата. Структуры препаратов и их внутренних стандартов приведены на рисунке 14.

При анализе атенолола для суммирования сигнала были выбраны фрагменты с  $m/z$  74,0604, 116,1069, 145,0644, 190,0858, 225,1227, а также ион целой молекулы (Рисунок 15А). Для внутреннего стандарта (метопролола) – ионы с  $m/z$  159,0803, 191,1066 и 268,1906 (Рисунок 15Б).

В случае аписабана аналогично были выбраны фрагменты с  $m/z$  199,0856 и 461,1795, а для внутреннего стандарта (эдоксабана) -  $m/z$  152,1063, 276,1150, 349,1669 и 366,1937 (Рисунок 16).

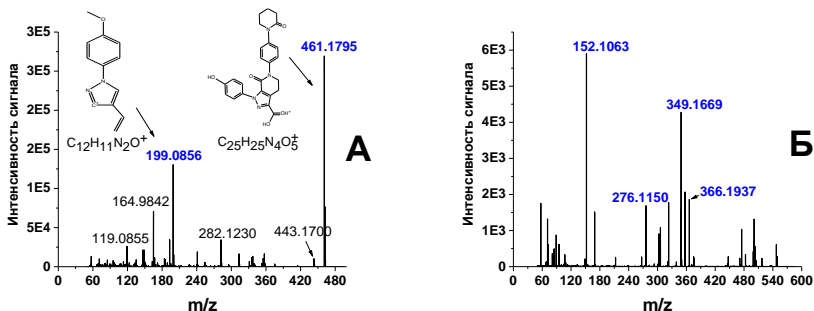


Рисунок 16. Масс-спектры высокого разрешения аписабана (А) и его внутреннего стандарта (Б), зарегистрированные методом PRM. Ионы фрагментов, выбранные для количественного анализа, выделены синим цветом.

Для аписабана наблюдался интересный факт – масса фрагмента ( $m/z$  461.1795) была больше массы целой молекулы ( $m/z$  460.1975). Однако с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения было показано, что это объясняется отрывом  $\text{NH}_3$  группы и присоединением молекулы воды (Рисунок 17).

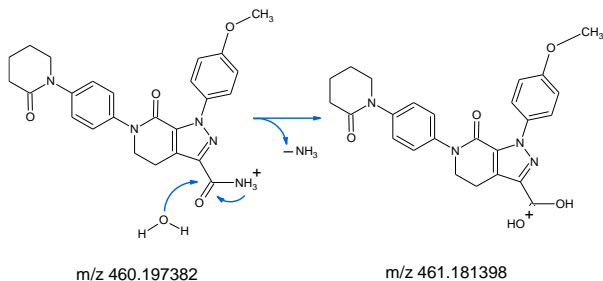


Рисунок 17. Схема фрагментации аписабана, приводящая к увеличению массы молекулы.

Оба метода были валидированы согласно рекомендациям Европейского агентства по лекарственным средствам для валидации биоаналитических методов в диапазоне концентраций 5–1000 нг/мл для атенолола и 10–400 нг/мл для аписабана, что позволяет использовать эти методы в различных

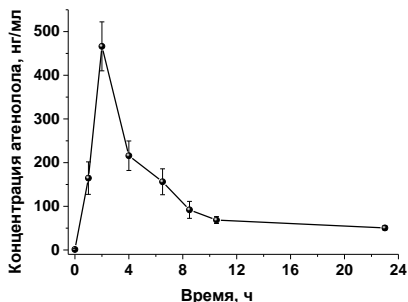


Рисунок 18 График зависимости средней концентрации атенолола в плазме крови от времени после однократного перорального приема 50 мг препарата здоровым добровольцем (n = 1).

Monitoring, 2014), что более чем на порядок хуже разработанного метода.

Для атенолола существуют методы анализа в сухих пятнах крови с использованием масс-спектрометрии высокого разрешения, однако аналитическая чувствительность методов также была хуже и составляла от 5 (Lawson G. *et.al.*, Journal of Chromatography B, 2012) до 30 пг (Bernieh D. *et.al.*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2017; Tanna S. *et.al.*, Clinical Mass Spectrometry, 2018).

## 1.2. Расширение применимости подходов масс-спектрометрического анализа аминокислот и ацилкарнитиннов

Как упоминалось выше, метод сухих пятен в настоящее время используется для количественного определения низкомолекулярных соединений. Однако свое начало данный метод берет в 60х годах прошлого века, когда Роберт Гатри начал использовать сухие пятна крови для скрининга новорожденных на фенилкетонурию, определяя аминокислоту фенилаланин. Впоследствии с развитием методов анализа, в том числе и масс-спектрометрических, количество анализируемых аминокислот росло, увеличивая и число возможных заболеваний, выявляемых в одном анализе. После добавления ацилкарнитиннов различной длины к анализируемым соединениям, был разработан коммерчески доступный набор, позволяющий анализировать одновременно 13 аминокислот и 30 ацилкарнитиннов и выявлять около 40 наследственных заболеваний. При этом проводится полуколичественная оценка, основанная на соотношении площадей пиков аналитов и их изотоп-меченных стандартов, то есть веществ обладающих такими же физико-химическими свойствами, но отличающимися на несколько атомных единиц за

клинических исследованиях (Рисунок 18). При этом удалось достичь аналитической чувствительности методов в 0,43 пг и 0,85 пг для атенолола и апискабана, соответственно.

С помощью масс-спектрометрии высокого разрешения ранее были предложены методы анализа апискабана только в плазме крови, при этом аналитическая чувствительность составляла от 12 пг (Maier V. *et.al.*, Biomedical Chromatography, 2021) до 33 пг (Gous T. *et.al.*, Therapeutic Drug

счет наличия в своей структуре изотопов водорода, углерода или кислорода. Метод определения аминокислот и ацилкарнитинов был первоначально разработан для сухих пятен крови, поэтому изменение объектов исследования требует внесения различных дополнительных стадий при подготовке проб в зависимости от твердого или жидкого состояния образца.

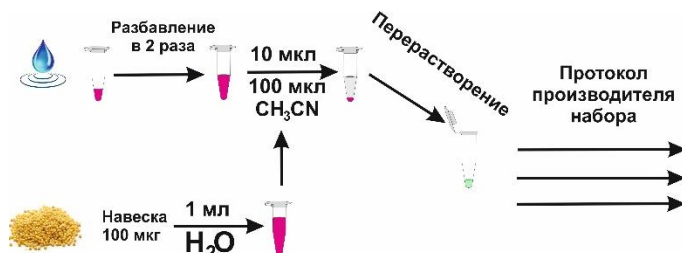


Рисунок 19. Схема метода предварительной подготовки образцов для определения концентрации аминокислот и ацилкарнитинов в жидких и твердых образцах.

Например, возникла необходимость количественной оценки свободных аминокислот в продуктах и готовых блюдах, при разработке лечебно-профилактического питания с питательными веществами в легкоусвояемой форме. Основной проблемой являлось то, что образцы для анализа предоставлялись либо в твердом виде, либо в виде густой жидкости. Требовалось произвести как перерасчет концентрации в зависимости от взятого для анализа объема пробы, так и разработать метод первичной экстракции аминокислот, поскольку в утвержденном для сухих пятен методе, экстракция проводилась раствором внутренних стандартов. И прямое использование такого раствора приводит к выпадению в осадок других соединений, в том числе и белковой структуры, приводя к со-осаждению аминокислот и внутренних стандартов. Был проведен ряд экспериментов, позволивший подобрать условия экстракции аминокислот и ацилкарнитинов из жидких и твердых образцов. Итоговая схема пробоподготовки представлена на рисунке 19. Вкратце, в случае густых жидких образцов сначала их разбавляли водой в 2 раза, затем брали аликвоту 10 мкл и экстрагировали аминокислоты 100 мкл ацетонитрила, затем супернатант упаривали, добавляли раствор внутренних стандартов и дальнейшие манипуляции производили согласно протоколу производителя набора. В случае твердых образцов, первоначально брали навеску 100 мг и растворяли ее в 1 мл воды, затем брали аликвоту 10 мкл и действовали так же, как и в случае жидких образцов. Масс-спектрометрический анализ проводили в MRM режиме на масс-спектрометре Agilent 6410 QQQ («Agilent Technologies», США), регистрируя для каждой аминокислоты и ее внутреннего стандарта свой переход. Аликвоту



10 мкл анализировали методом прямого вкола. Полученные концентрации пересчитывали, учитывая все разбавления и перерастворения.

Таблица 8. Содержание незаменимых аминокислот в гидролизате гороховой муки и контрольном образце (экстракте без ферментов).

Аминокислота	Содержание аминокислоты, мкг/г	
	Гидролизат биомассы гороха	Экстракт биомассы гороха
Xle	10479	515
Met	1320	110
Phe	7681	514
Val	3921	441

В результате исследования процессов фракционирования, механической активации и последующего ферментативного гидролиза белков, содержащихся в растительном сырье – семенах гороха, было установлено, что в ходе гидролиза происходит значительное увеличение количества некоторых незаменимых аминокислот в сравнении с контрольным образцом, полученным в тех же условиях, но без

добавления гидролизующих ферментов (Таблица 8). На основании гидролизата гороховой муки, полученного согласно предложенному технологическому процессу, были разработаны рецепты готовых продуктов лечебно-профилактического питания с питательными веществами в легкоусвояемой форме, например, суп-пюре и хлебобулочные изделия, анализ которых подтвердил существенное увеличение концентрации свободных аминокислот (Рисунок 20).

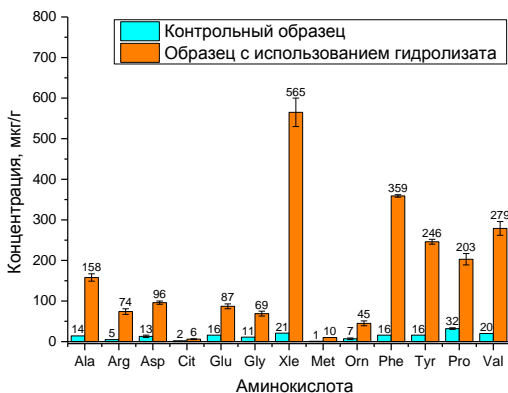


Рисунок 20. Изменение количества свободных аминокислот в хлебобулочных изделиях функционального назначения при использовании горохового гидролизата.

Установлено, что рост концентрации интересующих свободных аминокислот составляет от 1,5 до 20 раз в продуктах, обработанных специальным образом, и в приготовленных из них блюдах. Новые образцы продукции рекомендуется

употреблять людям с аллергической реакцией на белок бобовых, а также в рационе здоровых людей для повышения доли усвоения растительного белка.

Аналогичным способом разрабатывали метод анализа свободных аминокислот в агрохимикатах. Дополнительной сложностью в данном случае являлась либо сильноокислая, либо щелочная среда образца, поэтому пробы предварительно приходилось нейтрализовать до pH 7,0 и далее следовать вышеописанному методу для жидких образцов (Рисунок 19).

Несмотря на то, что анализ аминокислот и ацилкарнитинов в сухих пятнах крови первоначально разрабатывался для определения наследственных заболеваний, данные соединения стали анализироваться и при поиске возможных биомаркеров других заболеваний или патологических состояний. Вследствие того что аминокислоты и ацилкарнитины являются как конечным, так и промежуточным результатом различных биохимических процессов в организме, существенное изменение их концентрации или соотношения может свидетельствовать о нарушении путей их биотрансформации. Конечно, изменение концентрации каждого соединения в отдельности не может дать полной информации о возможных нарушениях вследствие вовлеченности во многие процессы. Поэтому для решения таких задач анализу подвергаются наборы аминокислот и/или ацилкарнитинов и строятся профили аминокислот и/или ацилкарнитинов.

Очень часто анализ отдельных соединений или ряда веществ является фрагментом более масштабного исследования, когда сбор образцов крови производится для проведения нескольких различных параллельных исследований, и, как правило, растянут во времени для набора необходимого размера выборки. Классическим вариантом биологической жидкости, используемой для анализа, является плазма или сыворотка крови, а не сама кровь, что более удобно для хранения и транспортировки. Поэтому возникает необходимость проводить анализ аминокислот и ацилкарнитинов в таких образцах. Наши эксперименты показали, что использование сухих пятен плазмы/сыворотки крови более предпочтительно, чем анализ непосредственно биологической жидкости. Значение уровней сигналов при экстракции из сухих пятен плазмы/сыворотки крови выше, а погрешность измерения – ниже, чем при экстракции из самой плазмы/сыворотки крови. При этом изменение метода относительно сухих пятен крови минимально, необходимо только определить какому объему биологической жидкости соответствует вырезаемый диск диаметром 3,2 мм, поскольку объем может варьировать в зависимости от размера высушенного пятна. Было показано, что при формировании пятна из плазмы/сыворотки объемом 25-30 мкл вырезаемый диск соответствует объему 1,6 мкл.

Предложенный метод был апробирован при поиске биомаркеров психических заболеваний. Были проанализированы сухие пятна плазмы крови 37 пациентов с шизофренией и 36 здоровых добровольцев для определения концентрации 13 аминокислот (аланина, аргинина, аспарагиновой кислоты, цитруллина, глутаминовой кислоты, глицина, метионина, орнитина, фенилаланина, тирозина, валина, изолейцина и пролина) и 30 ацилкарнитинов. Поиск различий между группами проводили с помощью языка программирования R v. 3.6.1 со средой RStudio v. 1.2.5001 с использованием пакетов «dplyr», «caret», «factoextra», «ggplot2» и других. Различия по общим характеристикам между изучаемыми группами проверяли с помощью критерия  $\chi^2$ , t-критерия Стьюдента или U-критерия Манна-Уитни. Различия в уровнях аминокислот и ацилкарнитина между группами проверяли с помощью U-критерия Манна-Уитни. Многофакторный анализ включал иерархический кластерный анализ и PLS-DA. Различия с *p*-значениями менее 0,05 считались статистически значимыми. PLS-DA анализ показал, что наблюдаются значимые различия между группами пациентов и здоровыми добровольцами (Рисунок 21А). Было установлено, что у больных шизофренией снижена концентрация аминокислот валина, аспартата, цитруллина, глицина, аргинина и орнитина, а также ацилкарнитинов C14, C14OH, C16OH, C16:1, C16:1OH, C18, C18OH, C18:1, C18:1OH, C18:2OH и C5:1 и повышена концентрация ацилкарнитина C4DC по сравнению с контрольной группой. Изменение уровня концентрации отдельных ацилкарнитинов может свидетельствовать о нарушениях в специфических метаболических путях, важных для нормального функционирования головного мозга (Jones L.L. *et.al.*, *Progress in Lipid Research*, 2010). Снижение уровня длинноцепочечных ацилкарнитинов при шизофрении может быть обусловлено снижением экспрессии или активности различных транспортеров в плазматической мембране. Используя метод анализа метаболических путей на онлайн-ресурсе metacys.org (Caspi R. *et.al.*, *Nucleic Acids Research*, 2018), была обнаружена связь найденных нарушений с активностью карнитинпальмитоилтрансферазы I. Изменения активности данного фермента наблюдаются при неврологических и психических заболеваниях, в основном связанных с нарушением баланса инсулина в головном мозге, таких как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера и шизофрения (Virmani A. *et.al.*, *Molecular Neurobiology*, 2015).

Недавно было показано, что уровень ацилкарнитинов у больных шизофренией различается в зависимости от наличия или отсутствия метаболического синдрома (Сао В. *et.al.*, *Psychiatry Research*, 2020), поэтому в работе были исследованы группы пациентов с шизофренией, имеющие или не имеющие в

анамнезе метаболический синдром. Были проанализированы образцы сухих пятен плазмы крови пациентов с диагнозом шизофрения (n=73), шизофрения,

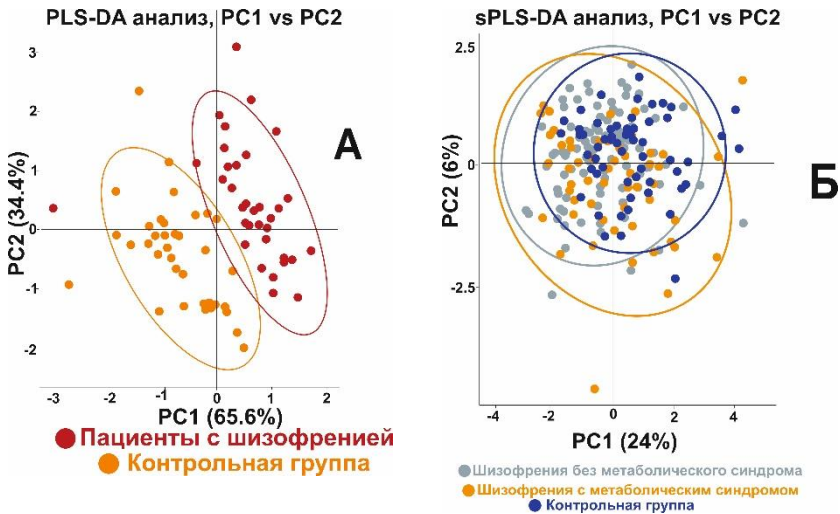


Рисунок 21. График распределения выборки пациентов по координатам первых двух принципиальных компонент, полученных из концентраций аминокислот и ацилкарнитинов с помощью метода PLS-DA для пациентов с шизофренией и контрольной группой (А) и с помощью метода sPLS-DA для пациентов с шизофренией, шизофренией с метаболическим синдромом и контрольной группой (Б).

отягощенная метаболическим синдромом (n=39), и здоровых добровольцев (n=61). Обработка данных методом “разреженного” дискриминантного анализа (sPLS-DA) и визуализация данных проводилась с помощью языка программирования R 3.6.1 в среде RStudio 1.2.5001 с использованием пакета mixOmics (Rohart F. *et.al.*, PLoS Computational Biology, 2017) и других пакетов. Различия в общих характеристиках между изучаемыми группами проверяли с помощью критерия  $\chi^2$  и U-критерия Манна–Уитни. Различия в уровнях аминокислот и ацилкарнитина между группами оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни. Данные с *p*-значениями менее 0,05 считались статистически значимыми.

Однофакторный анализ показал повышение концентрации ацилкарнитина C5, аминокислот с разветвленной цепью (лейцин/изолейцин) и их метаболита аланина у пациентов с шизофренией с метаболическим синдромом по сравнению с пациентами без метаболического синдрома (Таблица 9). Ацилкарнитин C5 является производным лейцина и изолейцина, тогда как C3 является преимущественно продуктом распада валина и изолейцина после обработки дегидрогеназой  $\alpha$ -кетокислот с разветвленной цепью (Newgard C.B. *et.al.*, Cell Metabolism, 2012; Lent-Schochet D. *et.al.*, World Journal of Diabetes,

Таблица 9. Уровни аминокислот и ацилкарнитинов у больных шизофренией и здоровых лиц, включенных в исследование.

Параметр, мкМ	Пациенты с метаболическим синдромом n=73	Пациенты без метаболического синдрома n=39	Здоровые доноры n=61	p-value
C5	0,028 [0,021; 0,038]	0,022 [0,017; 0,029]	0,030 [0,022; 0,038]	p <sub>0-1</sub> = 0,557 p <sub>0-2</sub> = 0,0001* p <sub>1-2</sub> = 0,033*
C5:1	0,0027 [0,0020; 0,0045]	0,0025 [0,0018; 0,0036]	0,0045 [0,0037; 0,0065]	p <sub>0-1</sub> = 0,126 p <sub>0-2</sub> = 0,003* p <sub>1-2</sub> = 0,343
C10	0,027 [0,015; 0,055]	0,031 [0,014; 0,045]	0,045 [0,029; 0,066]	p <sub>0-1</sub> = 0,018* p <sub>0-2</sub> = 0,006* p <sub>1-2</sub> = 0,990
C10:1	0,026 [0,014; 0,043]	0,028 [0,015; 0,037]	0,037 [0,027; 0,053]	p <sub>0-1</sub> = 0,009* p <sub>0-2</sub> = 0,003* p <sub>1-2</sub> = 0,995
C12	0,014 [0,008; 0,017]	0,014 [0,007; 0,018]	0,016 [0,12; 0,24]	p <sub>0-1</sub> = 0,046* p <sub>0-2</sub> = 0,033* p <sub>1-2</sub> = 0,886
C18	0,0124 [0,0098; 0,0143]	0,0112 [0,0107; 0,0134]	0,0159 [0,0130; 0,0182]	p <sub>0-1</sub> = 0,003* p <sub>0-2</sub> = 0,0001* p <sub>1-2</sub> = 0,864
Аланин	158,75 [131,80; 177,80]	138,84 [116,97; 168,80]	142,09 [114,92; 165,82]	p <sub>0-1</sub> = 0,044* p <sub>0-2</sub> = 0,780 p <sub>1-2</sub> = 0,019*
Лейцин/ Изолейцин	49,58 [42,45; 58,58]	44,32 [37,81; 50,23]	44,72 [36,64; 51,67]	p <sub>0-1</sub> = 0,098 p <sub>0-2</sub> = 0,742 p <sub>1-2</sub> = 0,019*

Данные представлены в виде медианы (нижний квартиль, верхний квартиль); p<sub>0-1</sub> - сравнение пациентов с метаболическим синдромом и здоровых добровольцев; p<sub>0-2</sub> - сравнение пациентов без метаболического синдрома и здоровых добровольцев; p<sub>1-2</sub> - сравнение пациентов с метаболическим синдромом и без него.

2019). Повышенные уровни ацилкарнитина C5 и неизменные уровни C3 могут быть обусловлены нарушением функции дегидрогеназы  $\alpha$ -кетокислот с разветвленной цепью у пациентов с шизофренией с метаболическим синдромом (Lent-Schochet D. et al., World Journal of Diabetes, 2019). С другой стороны, с помощью многофакторного анализа группы пациентов с метаболическим синдромом и без него на графике принципиальных компонент разделить не удалось (Рисунок 21Б). Принимая во внимание данные исследования и результаты других научных групп, было высказано предположение, что короткоцепочечные ацилкарнитины могут играть особую роль в регуляции энергетического обмена у больных параноидной шизофренией (Cao B. et al., Psychiatry Research, 2020; Kriisa K. et al., Journal of Proteome Research, 2017).

## **2. Масс-спектрометрические подходы для решения задач нецелевой метаболомики**

В отличие от задач целевой метаболомики по количественному определению заранее известных соединений, нецелевая метаболомика ориентирована на метаболомное профилирование и поиск различий в метаболомных профилях. При этом стоят задачи извлечения, идентификации и последующего качественного или количественного сравнения между группами максимально возможного количества, а в идеале – всех метаболитов в биологическом образце. Выделение и измерение каждого исследуемого метаболита должно быть воспроизводимым, даже в том случае, когда неизвестно что это за соединение и присутствует ли оно вообще в части образцов. Появление и распространение масс-спектрометрии как метода анализа существенно повлияло на развитие нецелевой метаболомики, поскольку стало возможно создание и использование баз данных масс-спектров для определения веществ по характерным  $m/z$  даже без наличия самого вещества у исследователя в качестве стандарта сравнения. Несмотря на общие принципы, в зависимости от конкретной задачи и используемого оборудования различаются и применяемые подходы.

### **2.1. Методика анализа метаболомного профиля растений с помощью тандемной масс-спектрометрии низкого разрешения**

Одной из таких возникших задач являлось выявление и идентификация фенольного состава листьев двух популяций растения *M. Bracteata*, произрастающих на значительном расстоянии друг от друга. Для этой цели был использован комбинированный подход, при котором часть соединений была определена по стандартам сравнения и масс-спектрам, а часть идентифицирована только по масс-спектрам. Первоначально были подобраны условия хроматографического разделения для получения максимального количества индивидуальных пиков на хроматограмме, каждый из которых, тем не менее, мог содержать несколько веществ. Это делалось для того, чтобы повысить концентрацию каждого вещества в определенный момент времени в ходе хроматографического разделения, и, тем самым, увеличить число детектируемых соединений. Такие эксперименты проводились с регистрацией всех  $m/z$  в диапазоне 100-1500 Да в отрицательном режиме сканирования на масс-спектрометре Agilent 6410 QQQ (Agilent Technologies, США). Хроматографическое разделение состава экстрактов в течение 35 минут. Примеры полученных хроматограмм представлены на рисунке 22.

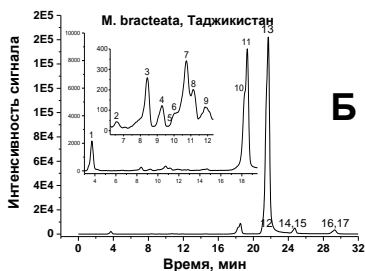
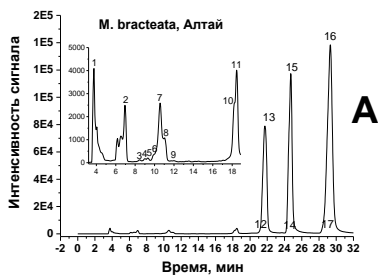


Рисунок 22. Хроматограммы общего ионного тока в режиме сканирование отрицательных ионов для гидролизованных водно-этанольных экстрактов листьев *Muricaria bracteata*, произрастающих на Алтае (А) и в Таджикистане (Б).

Из полученного в режиме сканирования масс-спектра был сформирован список всех  $m/z$ , имеющих оформленные пики. Для полученных масс были предложены возможные соединения, исходя из предполагаемого профиля фенольных соединений в данном виде растения. Кроме этого были предложены структуры на основе критического обзора литературных данных по результатам исследований близких видов растений.

Таблица 10. Соединения, выявленные в листьях *Muricaria bracteata* растений, произрастающих на Алтае и в Таджикистане.

№	RT (мин)	[M-H] <sup>-</sup> , m/z	Ионы-фрагменты, m/z	Идентифицированные соединения
1	3,7	191	111, 87, 67, 57	Лимонная кислота
2	6,8	169	125, 97, 79, 69	Галловая кислота
3	8,4	183	140, 124	Метилгаллат I
4	9,3	183	124	Метилгаллат II
5	9,7	317	179, 151, 137, 107	Мирицетин
6	10	463	301	Кверцетин гексозид /Гексозид эллаговой кислоты
7	10,6	301	284, 257, 229, 185	Эллаговая кислота
8	11,1	197	169, 124	Этилгаллат
9	11,9	193	178, 149, 134	Феруловая кислота
10	18,2	285	151, 133, 121, 107	Лютеолин
11	18,3	301	245, 229, 179, 151, 121, 107	Кверцетин
12	21,2	285	255, 227, 211, 187, 159, 143, 117, 108, 93	Кемпферол
13	21,8	315	300, 283, 271, 255, 243, 227, 164, 151, 148, 136, 107, 83, 63	Изорамнетин
14	24,6	299.2	271, 256, 255, 227, 211, 199, 151	Рамноцитрин
15	24,7	329.2	314, 299, 271, 227	Рамназин
16	29,3	299	284, 255, 227, 164, 163, 132, 107, 83, 63	Кемпферид
17	29,3	299	226, 211, 200, 199, 183, 158, 151, 133, 107	Хризозеиол

Далее для предложенных соединений были найдены возможные переходы «целая молекула → фрагмент». По предложенным переходам были

оформлены новые масс-спектрометрические методы, уже в режиме MRM. Все предложенные MRM переходы были проверены в ходе проведения большого количества экспериментов. Для части предполагаемых соединений в режиме MRM сигнал отсутствовал вследствие несоответствия предложенных переходов реальным структурам. По итоговому набору MRM переходов был создан масс-спектрометрический метод, который использовался для проведения сравнительного анализа двух популяций *Muricaria bracteata*. Соединения, которые удалось детектировать, были отсортированы согласно наличию и отсутствию стандартов сравнения. Стандарты сравнения были проанализированы в тех же условиях, что и образцы, для подтверждения структуры веществ. Для остальных соединений предполагаемая структура проверялась по нескольким MRM переходам (Таблица 10). Таким образом, было найдено и подтверждено 17 соединений. Недостатком такого подхода является большая трудоемкость по идентификации соединений и выявлению относительно небольшого количества компонентов смеси - только соединений, хорошо ионизирующихся и дающих интенсивный сигнал. К несомненным достоинствам следует отнести возможность проводить такую работу практически на всех типах масс-спектрометров, сопряженных с ВЭЖХ.

## **2.2. Исследование метаболомного профиля растений с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения для выявления соединений с потенциальной биологической активностью**

Всесторонний анализ состава образцов с повышением числа определяемых соединений относительно описанного выше метода MRM можно осуществить при помощи методов масс-спектрометрии высокого разрешения. Например, аналогичные задачи по определению состава экстрактов растений видов *Rhododendron*, *Spiraea hypericifolia* (*Rosaceae*), *Eranthis longistipitata* (*Ranunculaceae*) решались с использованием масс-спектрометра высокого разрешения Q Exactive HF (Thermo Fisher Scientific). Следует отметить, что в этом случае масс-спектрометрический подход претерпевает значительные изменения и меняется последовательность действий при идентификации соединений.

Чем выше разрешение, которое может обеспечить масс-спектрометр, тем вероятнее можно определить истинную брутто-формулу соединений. Однако повышение разрешения приводит к снижению скорости сканирования, что в свою очередь может привести к пропуску детекции некоторых соединений. Поэтому необходимо соблюдать баланс между разрешением масс-спектра и частотой сканирования. Оптимальное соотношение этих параметров зависит от ряда факторов, в том числе от выбранного масс-спектрометрического



метода, диапазона сканирования, ширины пиков. Поэтому параметры необходимо подбирать каждый раз в зависимости от условий конкретной задачи. Как правило, выбирают метод полного сканирования с дополнительной тандемной масс-спектрометрией, зависящей от получаемых данных (FS-dd-MS<sup>2</sup>). Последовательно проводится полное сканирование всех масс в выбранном диапазоне, и для 3-5 (в зависимости от настроек метода) самых интенсивных сигналов проводится фрагментация молекул с регистрацией всех фрагментов выбранного иона. В результате при хроматографическом разделении веществ, при каждом сканировании тандемному анализу подвергаются ионы с разными  $m/z$ . Таким образом, собирается пул данных как по ионам целых молекул, так и по их фрагментному паттерну. Получается большой объем данных для одного образца, поскольку для лучшего разделения время хроматографии варьируется от 60 до 90 минут. При этом необходимо проводить анализ одного образца, как минимум, в трехкратном повторе, для получения достоверных данных. Иначе вследствие смены режимов сканирования – полное сканирование, тандемный анализ – может происходить пропуск регистрации некоторых ионов. Сигнал считается достоверным, если регистрируется как минимум в двух повторах из трех.

Высокое разрешение приводит к еще одной проблеме - большое число регистрируемых ионов даже в холостом образце, поэтому для исключения таких ионов, проводится анализ холостого образца также в трех повторах. И ионы, присутствующие в холостом образце, исключаются из рассмотрения при дальнейшем анализе данных.

Для выявления максимально возможного числа соединений масс-спектрометрический анализ проводят в отрицательном и положительном режимах, так как если первоначально неизвестна структура соединения, то и неизвестно какие типы ионов (положительные или отрицательные) оно может формировать. Некоторые вещества могут образовывать как положительные, так и отрицательные ионы, тогда как другие – ионы только одного типа, поэтому и требуется выполнение анализа в обоих режимах.

При таком подходе получается большой массив масс-спектрометрических данных, которые необходимо обработать. И если в подходе с использованием метода MRM, обработка данных с целью идентификации соединений проводилась в середине работы, то в данном случае такая обработка происходит после получения полного набора данных с прибора.

Необходимо отметить, что в этом подходе на стадию обработки масс-спектрометрических данных приходится значимая часть работы, хотя и производится автоматизация с помощью специализированного программного

обеспечения. Каждый производитель оборудования выпускает свои программы обработки, поэтому для работы с данными полученными с масс-спектрометра Q Exactive HF фирмы Thermo Fisher Scientific использовалась программа Compound Discoverer 3.1.

Как правило, в данном подходе при проведении масс-спектрометрического анализа удается детектировать тысячи разных молекул, которые могут присутствовать как в образце, так и в холостой пробе, иметь или не иметь фрагментарный профиль, выходить одним или несколькими пиками при разделении и т.д. Одной брутто-формуле может соответствовать несколько  $m/z$ , отличающихся на несколько тысячных долей атомной единицы массы. Для того чтобы из этого массива данных выделить интересующие нас сигналы, необходимо найти соответствие этих сигналов предполагаемым молекулам. Так же как и для самого масс-спектрометрического анализа существует набор параметров настройки метода поиска, в зависимости от которых выдаваемые результаты будут отличаться. Поскольку поиск соответствий производится по базам данных, выбор этих баз также влияет на полноту поиска. Для растений поиск соответствий осуществлялся по базе данных mzCloud (<https://www.mzCloud.org>) и поисковой системе ChemSpider, включающей в себя базы данных KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>), MassBank (<https://massbank.eu/MassBank/>), PlantCyc (<https://plantcyc.org/>) и Planta Piloto de Quimica Fina Universidad de Alcala (<http://www.cqab.eu/index.php/en/>).

База данных mzCloud содержит данные масс-спектрометрии высокого разрешения как для целых молекул, так и для их фрагментов, поэтому является предпочтительной при идентификации соединений, поскольку в своем роде является базой данных стандартов. В случае отсутствия фрагментарного состава молекулы, дальнейший поиск производится по выбранным базам данных в блоке поиска «ChemSpider» только по точной массе. Кроме этого, независимо от поиска по базам данных, программа производит расчет возможных брутто-формул веществ.

Целью исследователя на данном этапе является критический анализ предложенных программой результатов. Для этого существует ряд фильтров, которые позволяют исключить наиболее сомнительные результаты. Обычно удается из нескольких тысяч найденных  $m/z$  выделить 100-200 наиболее значимых веществ, которые анализируются более тщательно, особенно в случае отсутствия фрагментарного профиля. Одной брутто-формуле могут соответствовать вещества с разной структурой, особенно в случае молекул более 500 Да. Такие вещества могут быть не просто структурными изомерами, но и относиться к разным классам. В этом случае следует быть особо

осторожным с предполагаемыми молекулами, и подтверждать выбранные варианты другими фактами.

Согласно вышеописанным положениям были проанализированы экстракты растений *Rhododendron*, *Spiraea hypericifolia* (*Rosaceae*), *Eranthis longistipitata* (*Ranunculaceae*) в положительном и отрицательном режимах, используя метод FS-dd-MS<sup>2</sup> с разрешением 45000 FWHM при  $m/z$  200 для полного сканирования и с разрешением 15000 FWHM при  $m/z$  200 в последующем тандемном анализе. При этом хроматографическое разделение проводили уже в течение 60 минут с использованием 150 мм колонки, термостатированной при 40 °С. Для исключения фоновых соединений каждый раз проводили анализ и холостой пробы. Все образцы, в том числе и холостые, анализировали трижды.

Для поиска и идентификации соединений в программе в Compound Discoverer 3.1 использовался предустановленный рабочий процесс «Неизвестный идентификатор среды с поиском в онлайн- и локальной базе данных» (Рисунок 23). Ко всем узлам применялся массовый допуск 5 частей на миллион.

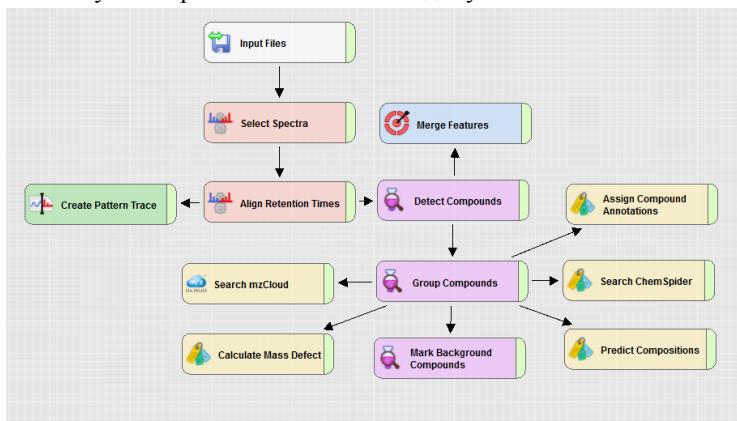


Рисунок 23. Снимок экрана в программе Compound Discoverer с протоколом обработки масс-спектрометрических данных, поиска по базам данных и аннотирования результатов.

В результате для *Rhododendron species* удалось обнаружить 132 соединения, из которых 88 были идентифицированы по базе данных mzCloud, а остальные с помощью поиска «ChemSpider» и подтверждались литературными данными. Двадцать семь из 132 соединений были обнаружены впервые.

В листьях *Eranthis longistipitata* (*Ranunculaceae*) было обнаружено более 160 соединений, из которых 72 идентифицированы на уровне класса и 58 – на уровне отдельных соединений. Из них 49 соединений были определены по базе данных mzCloud, а остальные с помощью поиска «ChemSpider» и подтверждались литературными данными или стандартами сравнения.

Показано, что среди идентифицированных соединений наиболее широко представлен класс флавоноидов (18 соединений, Таблица 11), в том числе шесть агликонов (кверцетин, кемпферол, аромадендрин, 6-метокситаксифолин, флоретин и (+)-катехин) и моно- и дигликозиды (остальные соединения).

13

соединений).

Таблица 11. Флавоноиды, идентифицированные в водно-этанольных экстрактах листьев *E. longistipitata* методом ЖХ-МСВР с использованием баз данных mzCloud и ChemSpider.

№	Расчетная масса	Измеренная масса	Разница масс [ppm]	mzCloud рейтинг	Режим	Идентифицированные соединения
<b>Flavonols</b>						
1	596,13773	596,1369	-1,42	Нет	+	Peltatoside
2	464,09548	464,0952	-0,51	98,2	+	Hyperoside *
3	434,08491	434,0846	-0,72	98,7	+	Reynoutrin
4	302,04265	302,0423	-1,15	99,9	+	Quercetin *
5	596,13773	596,1371	-1,00	98,1	-	Quercetin 3-sambubioside
6	286,04774	286,0475	-0,80	99	+	Kaempferol *
7	418,09	418,0897	-0,79	79,8	+	Juglalin
8	448,10056	448,1003	-0,54	98,5	+	Trifolin
9	464,09548	464,0958	0,75	99,2	-	Isoquercitrin
10	610,15338	610,1525	-1,46	98,9	+	Rutin *
<b>Flavones</b>						
11	580,14282	580,1426	-0,40	Нет	-	Carlinoside
<b>Flavans</b>						
12	290,079	290,07898	-0,11	Нет	+	Cianidanol
13	450,1526	450,15215	-0,99	Нет	+	Auriculoside
14	334,0689	334,06903	0,48	Нет	-	6-Methoxytaxifolin
15	288,0634	288,06336	-0,11	Нет	+	Aromadendrin
16	452,1319	452,13172	-0,32	Нет	+	Aspalathin
17	436,137	436,13681	-0,30	Нет	+	Phloridzin
18	274,0841	274,08393	-0,69	Нет	+	Phloretin

Таблица 12. Кверцетин и его производные, идентифицированные в водно-этанольных экстрактах *S. hypericifolia* методом ЖХ-МСВР с использованием баз данных mzCloud и ChemSpider.

№	Расчетная масса	Измеренная масса	Разница масс [ppm]	mzCloud рейтинг	Режим	Идентифицированные соединения
1	610,1537	610,1534	0,48	Нет	-	Rutin *
2	464,0952	464,0955	-0,59	99,6	+	Hyperoside *
3	302,0424	302,0427	-0,73	99,9	+	Quercetin *
4	610,1534	610,1534	0,01	96,9	+	Rhamnetin-3-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranoside
5	464,0955	464,0955	0	99,4	-	Isoquercitrin *
6	550,0957	550,0959	-0,24	97,5	+	Quercetin-3-O-(6''-O-malonyl)- $\beta$ -D-glucoside
7	434,0847	434,0849	-0,45	98,4	+	Reynoutrin
8	478,111	478,1111	-0,37	97,6	+	3-O-methylquercetin-3'-O- $\beta$ -D-glucopyranoside
9	316,0583	316,0583	-0,13	99	+	Isorhamnetin
10	434,0842	434,0849	-1,71	Нет	-	Avicularin *

\* Соединения подтверждены стандартами.

Обнаружено, что концентрация гликозидов кверцетина, гиперозида и рутина в листьях *E. longistipitata* была выше, чем соответствующих агликонов. Эти гликозиды обладают фармакологической активностью, и комбинация с богатым флавоноидным профилем листьев *E. longistipitata* предполагает биологическую активность данного растения.

При изучении растения *Spiraea hypericifolia* (Rosaceae) акцент был сделан на определение кверцетина и его производных. В результате было обнаружено 10 соединений (Таблица 12), из которых 8 были определены по базе данных mzCloud, а остальные с помощью стандартов сравнения.

Основными соединениями были различные гликозиды кверцетина, содержащие глюкозу (четыре соединения), галактозу (одно соединение), ксилозу (два соединения), арабинозу (одно соединение) или рутинозу (одно соединение) в качестве углеводного остатка. Причем семь из идентифицированных веществ (кверцетин, гиперозид, изокверцитрин, рейноутрин, авикулярин, рутин и изорамнетин) обладают фармакологической активностью. Данные о наличии кверцетина и его производных в экстракте *S. hypericifolia* расширяют представления о возможном практическом использовании этого растения.

### **2.3. Поиск потенциальных биомаркеров заболеваний в плазме крови с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения для выявления пациентов страдающих депрессией**

Вышеописанный подход также можно применять при анализе метаболомного профиля плазмы крови человека с целью выявления потенциальных биомаркеров различных заболеваний. При определении состава смеси веществ, как в случае экстракта растений, основной целью работы являлась идентификация максимально возможного количества соединений, и неопределяемые вещества исключались из рассмотрения. В случае же выявления биомаркеров, акцент смещен на поиск молекул, концентрация которых существенно отличается в сравниваемых группах, например, больных пациентов и здоровых доноров. Это влечет изменение дизайна эксперимента: во-первых, возникает необходимость набора выборки образцов, во-вторых, требуется соблюдение одинаковых условий подготовки образцов и проведения самого анализа. Иначе выявленные различия могут быть обусловлены не изменениями в организме при заболевании, а влиянием внешних факторов. Большой разброс определяемых сигналов из-за непостоянства условий анализа может замаскировать отличия между группами, которые по этой причине могут быть не выявлены. Поэтому перед проведением самого исследования необходимо тщательно проверить, как условия анализа влияют на

определяемый состав плазмы крови. Как указывалось выше, каждый образец необходимо анализировать трижды, и образцы должны быть стабильны в течение всего цикла анализа, в том числе при нахождении в системе автоматической подачи образцов. Это приводит к необходимости использования ультра-ВЭЖХ систем и соответствующих колонок, для уменьшения времени хроматографического разделения без существенного снижения количества и качества детектируемых сигналов.

Поиск потенциальных биомаркеров осуществляется по различию в уровне сигналов молекул в разных группах, причем количественное измерение концентрации каждого соединения не производится. Однако при одинаковых условиях пробоподготовки и анализа, уровень сигнала прямо пропорционален концентрации, и сравнение можно проводить по площади пика под кривой. Хотя сравнение происходит по усредненным значениям для всех образцов в выборке, эти значения также измеряются и для каждого образца индивидуально, что позволяет анализировать данные как методом дифференциального анализа, так и методом главных компонент.

Дифференциальный анализ позволяет определить сигналы, значимо различающиеся между группами, а метод главных компонент позволяет определить как происходит распределение индивидуальных образцов.

С помощью представленного подхода определялись потенциальные биомаркеры в плазме крови пациентов с диагнозами депрессии (F3211 и F3311) по сравнению со здоровыми донорами. Анализ исследуемых образцов проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе DIONEX UltiMate 3000 UHPLC system (Thermo Scientific) и масс-спектрометре Q Exactive HF (Thermo Scientific).

Хроматографическое разделение проводили на аналитической колонке ProntoSIL C18 AQ (ЭкоНова, Россия) с предколонкой Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies, USA) с помощью изократического градиента 90 % В в течение 15 минут со скоростью потока элюента 0,3 мл/мин, где элюент А это 0,1 % раствор муравьиной кислоты в воде, а элюент В - ацетонитрил с добавлением 0,1 % муравьиной кислоты.

Были проанализированы образцы плазмы крови 60 человек, из которых 30 входили в группу сравнения (здоровые доноры), а 30 были пациентами с диагнозами F3211 и F3311.

Идентификацию соединений проводили по базе данных mzCloud (<https://www.mzCloud.org>) и поисковой системе ChemSpider, включающей в себя базы данных KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>), ChEBI (<https://www.ebi.ac.uk/chebi/>), FDA UNII – NLM, Human Metabolome Database (<https://hmdb.ca/>) и LipidMAPS (<https://www.lipidmaps.org/>).

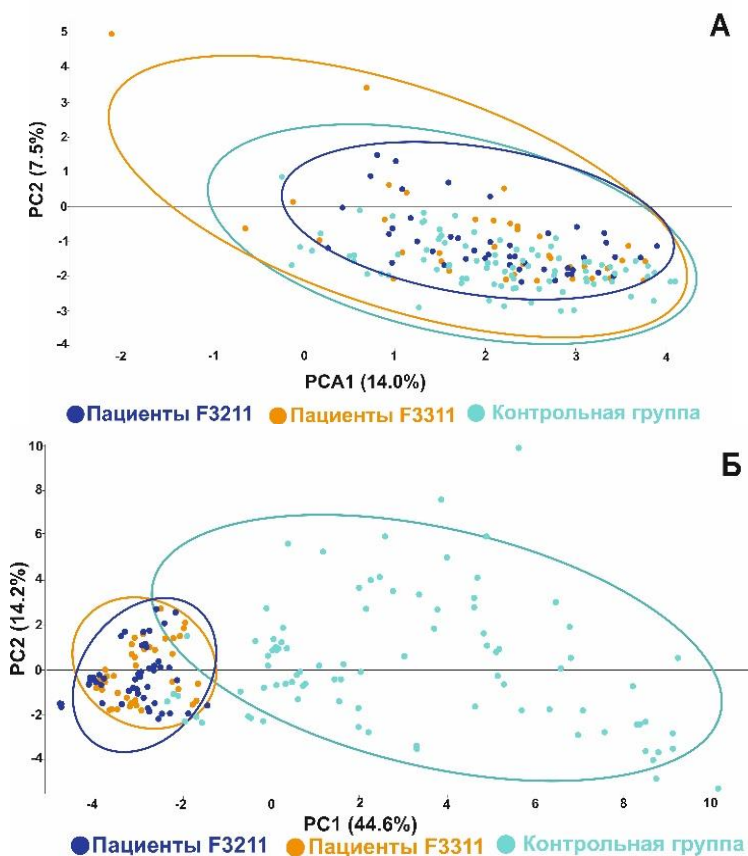


Рисунок 24. График распределения групп пациентов по координатам первых двух принципиальных компонент: с учетом всех детектированных метаболитов в плазме крови (А) и по отобраным метаболитам (Б).

Всего было выделено 1072 сигнала, для значимой части соединений было найдено соответствие какой-либо структуре. Однако это не приводило к разделению групп между собой (Рисунок 24А). Проведя фильтрацию элементов и последовательный анализ данных, удалось разделить группы больных с диагнозами депрессии и здоровых доноров (Рисунок 24Б). Такого разделения удалось достичь, используя 32 соединения, из которых только 4 были определены по точной массе и фрагментам в базе данных *mzCloud* с рейтингом выше 90, 14 были предварительно определены по точной массе в других базах данных, для 10 была определена только возможная брутто-формула, и 4 соединения определить не удалось. Тем не менее, все эти

индивидуальные соединения достоверно отличаются между группами пациентов и здоровых доноров ( $p < 0.05$ ). А вот между собой у групп пациентов с диагнозами F3211 и F3311 значимых различий не было обнаружено. Стоит отметить, что уровень всех отобранных соединений у пациентов ниже, чем у здоровых доноров, и их комбинация приводит к достаточно компактному распределению образцов пациентов на графике главных принципиальных компонент (Рисунок 24Б). Тогда как у здоровых людей разброс концентраций каждого соединения больше, что дает более обширное распределение, однако недостаток одного или даже нескольких метаболитов не приводит к возникновению или течению депрессии, а только их комбинация характеризует данное заболевание. Тем самым, даже не зная строения всех соединений, отобранных для разделения групп, можно построить панель биомаркеров, используя которую по совокупности признаков можно на основе клинического анализа предполагать диагноз заболевания.

### **Заключение**

Несмотря на значительные различия физико-химических свойств и физиологических концентраций как эндогенных метаболитов, так и экзогенных низкомолекулярных веществ, попадающих в организм извне, масс-спектрометрия зарекомендовала себя как эффективный метод определения разнородных аналитов в образцах различной природы. Широта применения масс-спектрометрических методов для решения разнообразных задач целевой и нецелевой метаболомики, начиная от количественного определения отдельных соединений и лекарственного мониторинга, и заканчивая метаболомным профилированием и «фингерпринтингом» целых организмов, тем не менее, препятствует созданию универсального метода, подходящего для метаболомного анализа различных биологических объектов. Это приводит к параллельному развитию масс-спектрометрических подходов в целевой и нецелевой метаболомике, призванных эффективно решать соответствующие задачи.

Поскольку целевая метаболомика направлена на выявление и количественную оценку лекарственных препаратов и уже известных молекулярных маркеров патологических состояний, развитие данных методов анализа сфокусировано на повышении селективности и аналитической чувствительности, уменьшении объема образцов и расширении природы анализируемых объектов. Разработанные и валидированные новые масс-спектрометрические подходы, комбинирующие метод сухих пятен и метод мониторинга параллельных реакций масс-спектрометрии высокого разрешения, позволяют с высокой



аналитической чувствительностью и селективностью проводить количественный анализ лекарственных препаратов в малом объеме образца (до 2 мкл плазмы крови), что продемонстрировано в работе на примерах сердечно-сосудистых препаратов атенолол и аписабан. Аналогичный подход, применённый к сухим пятнам плазмы крови, только с использованием метода множественных реакций масс-спектрометрии низкого разрешения позволяет проводить поиск новых биомаркеров психических заболеваний на основе набора аминокислот и ацилкарнитинов. В работе также показана возможность использования тандемной масс-спектрометрии низкого разрешения для мониторинга сердечно-сосудистых и противовирусных препаратов при проведении фармакокинетических исследований лекарственных препаратов и исследовании новых способов их доставки.

Нецелевая метаболомика направлена на проведение сравнительного анализа паттернов метаболитов и их изменений при патологии организма или внешнем на него воздействии, поэтому используемые методы служат для обнаружения максимального количества метаболитов и идентификации новых соединений. Представленные в работе подходы позволяют проводить профилирование метаболома крови человека при различных психических заболеваниях для выявления отклонений в биохимических процессах, вызванных патологией, определять состав и видоспецифические особенности в метаболомном профиле растений для выявления их потенциальной биологической активности. Достигнутые в настоящей работе результаты расширяют возможность использования масс-спектрометрических подходов и еще раз подчеркивают их важность при решении различных задач целевой и нецелевой метаболомики.

## **ВЫВОДЫ**

В работе созданы масс-спектрометрические подходы, позволяющие решать задачи целевой и нецелевой метаболомики: проводить количественное определение выбранных для анализа веществ в пробах различной природы и идентифицировать неизвестные соединения в составе сложных смесей.

Разработаны и валидированы согласно рекомендациям Европейского агентства лекарственных средств масс-спектрометрические методы анализа сердечно-сосудистых (варфарин, атенолол, аписабан) и противовирусных (тековиримат и НИОХ-14) лекарственных препаратов.

1) Показано, что применение метода мониторинга параллельных реакций, используемого в масс-спектрометрии высокого разрешения, позволяет достичь диагностической чувствительности подхода, сопоставимой с методом мониторинга множественных реакций масс-спектрометрии низкого разрешения, и использовать его для терапевтического лекарственного

мониторинга, что было продемонстрировано на примере препаратов тековиримат, атенолол и апиксабан. Установлено, что для разработанных и валидированных масс-спектрометрических подходов количественного анализа препаратов апиксабан и атенолол с использованием метода мониторинга параллельных реакций, аналитическая чувствительность в 10 и более раз превосходит чувствительность существующих методов анализа, выполненных с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения.

2) Показана применимость методов мониторинга множественных реакций, на примере варфарина, и мониторинга параллельных реакций, на примере апиксабана и атенолола, для количественного определения лекарственных препаратов в образцах сухих пятен плазмы крови, эквивалентных объему плазмы крови 2 мкл, с погрешностью не более 20%.

3) Установлено, что применение тандемной масс-спектрометрии при определении концентрации свободных аминокислот - аланина, аргинина, аспарагиновой кислоты, цитрулина, глутаминовой кислоты, глицина, метионина, орнитина, фенилаланина, тирозина, валина, изолейцина и пролина с использованием внутренних стандартов - позволяет расширить применимость метода и проводить анализ анализов не только в сухих пятнах крови, но и в жидких и твердых образцах различной природы.

4) Впервые показано, что количественное определение аминокислот и ацилкарнитинов может использоваться при поиске биомаркеров и построении метаболомных профилей психических заболеваний. Для выявления пациентов с шизофренией в работе предложено использовать аминокислоты валин, аспартат, цитруллин, глицин, аргинин и орнитин, а также ацилкарнитины C14, C14OH, C16OH, C16:1, C16:1OH, C18, C18OH, C18:1, C18:1OH, C18:2OH и C5:1, у которых наблюдается снижение концентрации, и ацилкарнитин C4DC, концентрация которого повышена по сравнению со здоровыми донорами. В случае шизофрении, осложненной метаболическим синдромом, отмечено повышение уровня валерилкарнитина, лейцина/изолейцина и аланина, что свидетельствует об их участии в патогенезе метаболических нарушений при параноидной шизофрении.

5) С использованием метода масс-спектрометрии высокого разрешения можно эффективно определить различия в уровне метаболитов у пациентов с аффективными расстройствами и здоровых доноров в условиях отсутствия полной информации о строении соединений. Предложен набор из 32 биомаркеров, позволяющий разделить группы пациентов с клиническим диагнозом депрессия и здоровых доноров.

6) Впервые получены метаболомные профили растений *Myricaria Bracteata*, *Rhododendron*, *Eranthis longistipitata* и установлено, что:

- среди 160 выявленных соединений в листьях *Eranthis longistipitata* наиболее широко представлен класс флавоноидов (18 соединений), в том числе шесть агликонов (кверцетин, кемпферол, аромадендрин, 6-метокситаксифолин, флоретин и (+)-катехин), и моно- и дигликозиды (13 соединений). Показано, что концентрация гликозидов кверцетина, гиперозида и рутина выше, чем соответствующих агликонов.

- в листьях *Rhododendron species* содержится 132 соединения, идентифицированные как изопреноиды, фенольные соединения, азотсодержащие соединения, производные жирных кислот и другие органические соединения, причем 27 соединений были идентифицированы впервые. Анализ главных компонент подтвердил видоспецифичность метаболического профиля трех видов *Rhododendron* и близкое родство между видами *R. burjaticum* и *R. lapponicum*.

- в листьях *Myricaria Bracteata* в основном содержатся метиловые эфиры кверцетина (изорамнетин, рамназин), кемпферола (кемпферид, рамноцитрин) и деллаговая кислота. Образец, собранный на Алтае, характеризуется повышенным содержанием кемпферида и рамназина по сравнению с образцом из Таджикистана.

### **Основные результаты диссертации изложены в следующих работах:**

1. Chernonosov A.A., Karpova E.A., Karakulov A.V. Metabolomic profiling of three *Rhododendron* species from Eastern Siberia by liquid chromatography with high-resolution mass spectrometry // *South African Journal of Botany*. – 2023. – V. 157. – P. 622–634.
2. Petrova N.V., Chernonosov A.A., Koval V.V., Andreeva V.Y., Erst A.S., Kuznetsov A.A., Kulikovskiy M.S., Wang W., Yu S.-X., Kostikova V.A. LC–HRMS for the Identification of Quercetin and Its Derivatives in *Spiraea hypericifolia* (Rosaceae) and Anatomical Features of Its Leaves // *Plants (Basel)*. – 2023. – V. 12, N. 2. – P. 381.
3. Shishkina L.N., Mazurkov O.Y., Bormotov N.I., Skarnovich M.O., Serova O.A., Mazurkova N.A., Skarnovich M.A., Chernonosov A.A., Selivanov B.A., Tikhonov A.Y., Gamaley S.G., Shimina G.G., Sysoyeva G.M., Taranov O.S., Danilenko E.D., Agafonov A.P., Maksyutov R.A. Safety and Pharmacokinetics of the Substance of the Anti-Smallpox Drug NIOCH-14 after Oral Administration to Laboratory Animals // *Viruses*. – 2023. – V. 15, N. 1. – P. 205.
4. Mednova I.A., Chernonosov A.A., Kornetova E.G., Semke A.V., Bokhan N.A., Koval V.V., Ivanova S.A. Levels of Acylcarnitines and Branched-Chain Amino Acids in Antipsychotic-Treated Patients with Paranoid Schizophrenia with Metabolic Syndrome // *Metabolites*. – 2022. – V. 12, N. 9. – P. 850.
5. Ambros E., Karpova E., Kotsupiy O., Trofimova E., Zakabluk G., Chernonosov A., Koval V., Novikova T. A Mechanocomposite Based on Biogenic Silica and

- Green Tea Flavonoids Modulates Adaptability of Strawberry Microclones to In Vitro and Ex Vitro Conditions // *J Soil Sci Plant Nutr.* – 2022. – .
6. Chernonosov A.A., Oleinik G.A., Koval V.V. Application of Parallel Reaction Monitoring to the Development and Validation of a Quantitative Assay for ST-246 in Human Plasma // *Int J Mol Sci.* – 2022. – V. 23, N. 14. – P. 8021.
  7. Aksenova L.V., Koval V.V., Chernonosov A.A. Parallel Reaction Monitoring Mode for Atenolol Quantification in Dried Plasma Spots by Liquid Chromatography Coupled with High-Resolution Mass Spectrometry // *Processes.* – 2022. – V. 10, N. 7. – P. 1240.
  8. Karpova E.A., Krasnikov A.A., Lyakh E.M., Chernonosov A.A. Leaf surface secretion of flavonoids in *Myricaria bracteata* and *M. longifolia* (Tamaricaceae) // *Taiwania.* – 2022. – V. 67, N. 3. – P. 413–421.
  9. Erst A.S., Chernonosov A.A., Petrova N.V., Kulikovskiy M.S., Maltseva S.Y., Wang W., Kostikova V.A. Investigation of Chemical Constituents of *Eranthis longistipitata* (Ranunculaceae): Coumarins and Furochromones // *Int J Mol Sci.* – 2022. – V. 23, N. 1. – P. 406.
  10. Oleinik G.A., Koval V.V., Usova S.V., Shishkina L.N., Chernonosov A.A. Development and Validation of a Method of Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry for Quantification of ST-246 (Tecovirimat) in Human Plasma // *Molecules.* – 2022. – V. 27, N. 11. – P. 3577.
  11. Kostikova V.A., Chernonosov A.A., Kuznetsov A.A., Petrova N.V., Krivenko D.A., Chernysheva O.A., Wang W., Erst A.S. Identification of Flavonoids in the Leaves of *Eranthis longistipitata* (Ranunculaceae) by Liquid Chromatography with High-Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS) // *Plants (Basel).* – 2021. – V. 10, N. 10. – P. 2146.
  12. Karpova E.A., Davlatov S.K., Chernonosov A.A. Phenolic compounds in taxonomy of *Myricaria longifolia* and *Myricaria bracteata* (Tamaricaceae) // *BIO Web Conf.* – 2021. – V. 38. – P. 51.
  13. Mednova I.A., Chernonosov A.A., Kasakin M.F., Kornetova E.G., Semke A.V., Bokhan N.A., Koval V.V., Ivanova S.A. Amino Acid and Acylcarnitine Levels in Chronic Patients with Schizophrenia: A Preliminary Study // *Metabolites.* – 2021. – V. 11, N. 1. – P. 34.
  14. Bychkova E., Dome K., Gosman D., Beisel N., Chernonosov A. Mechanically Activated Enzymatic Hydrolysis of Pea Seeds and Its Effects on Bakery Products. // *Applied Food Biotechnology.* – 2021. – V. 8, N. 3. – P. 213–223.
  15. Chernonosov A., Aksenova L., Koval V. The Development of a Liquid Chromatography High-Resolution Mass Spectrometric Method for Apixaban Quantification in Dried Plasma Spots in Parallel Reaction Monitoring Mode // *Processes.* – 2021. – V. 9, N. 3. – P. 450.
  16. Мазурков О.Ю., Шишкина Л.Н., Бормотов Н.И., Скарнович М.О., Серова О.А., Мазуркова Н.А., Скарнович М.А., Черноносков А.А., Тихонов А.Я., Селиванов Б.А. Фармакокинетические показатели субстанции НИОХ-14 — нового противооспенного фармакологического вещества //

- Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2021. – Т.84, №5. – С.22–26.
17. Khvostov M.V., Chernonosov A.A., Borisov S.A., Borisova M.S., Meteleva E.S., Evseenko V.I., Polyakov N.E., Dushkin A.V., Tolstikova T.G. Study of supramolecular complex of nifedipine with arabinogalactan on Wistar and ISIAH rats // *Ther Deliv.* – 2021. – V. 12, N. 2. – P. 119–131.
  18. Мазурков О.Ю., Шишкина Л.Н., Бормотов Н.И., Скарнович М.О., Серова О.А., Мазуркова Н.А., Черноносков А.А., Тихонов А.Я., Селиванов Б.А. Оценка абсолютной биодоступности химической субстанции противоопухолевого препарата НИОХ-14 в экспериментах на мышах // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 2020. – Т.170, №2. – С.207–210.
  19. Aksenova L.V., Koval V.V., Chernonosov A.A. Optimization of the Extraction Procedure of Apixaban from Dried Rat Plasma Spots // *J Pharm Res Int.* – 2020. – V. 32, N. 5. – P. 6–14.
  20. Zakabluk G.A., Koval V.V., Chernonosov A.A. Parameters Optimization of Edoxaban Extraction from Dried Plasma Spots // *J Pharm Res Int.* – 2020. – V. 32, N. 32. – P. 119–127.
  21. Gavrilova K., Bychkov A., Bychkova E., Akimenko Z., Chernonosov A., Kalambet Y., Lomovskii O. Mechanically activated hydrolysis of plant-derived proteins in food industry // *Foods and Raw Materials.* – 2019. – V. 7, N. 2. – P. 255–263.
  22. Baturina O.A., Chernonosov A.A., Koval V.V., Morozov I.V. Assessment of the Phenylketonuria (PKU)-Associated Mutation p.R155H Biochemical Manifestations by Mass Spectrometry-Based Blood Metabolite Profiling // *Acta Naturae.* – 2019. – V. 11, N. 2. – P. 42–46.
  23. Chernonosov A.A., Koval V.V. Extraction Procedure Optimization of Atenolol from Dried Plasma Spots // *J Pharm Res Int.* – 2019. – V. 31, N. 6. – P. 1–8.
  24. Chernonosov A. The Use of Dried Blood Spots for the Quantification of Antihypertensive Drugs // *International Journal of Analytical Chemistry.* – 2018. – V. 2018. – P. 1–12.
  25. Chernonosov A.A., Karpova E.A., Lyakh E.M. Identification of phenolic compounds in *Myricaria bracteata* leaves by high-performance liquid chromatography with a diode array detector and liquid chromatography with tandem mass spectrometry // *Revista Brasileira de Farmacognosia.* – 2017. – V. 27, N. 5. – P. 576–579.
  26. Chernonosov A. Quantification of Warfarin in Dried Rat Plasma Spots by High-Performance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry // *Journal of Pharmaceutics.* – 2016. – V. 2016. – P. 1–6.
  27. Khvostov M.V., Chernonosov A.A., Tolstikova T.G., Kasakin M.F., Fedorova O.S., Dushkin A.V. Effect of complexation with arabinogalactan on pharmacokinetics of "guest" drugs in rats: for example, warfarin // *Biomed Res Int.* – 2013. – V. 2013. – P. 156381.

28. Khvostov M.V., Tolstikova T.G., Chernonosov A.A., Fedorova O.S., Lifshits G.I. Pharmacokinetic Features of Warfarin in its Clathrate with Arabinogalactan // Asian J Pharm Clin Res. – 2012. – V. 5, N. S. 4. – P. 251–252.
29. Черноносков, А.А., Коваль В.В., Федорова О.С. Способ определения концентрации варфаринового спирта в плазме крови // Патент РФ № 2486521. Приоритет от 25.04.2012.

*Подписано в печать. Печать офсетная. Бумага офсетная. Формат 60x84  
1/16. Усл. печ. 2 л. Тираж X экз. Заказ № X Отпечатано в типографии  
«Срочная полиграфия» ИП Малыгин Алексей Михайлович 630090,  
Новосибирск, пр-т академика Лаврентьева, 6/1, оф. 104*