ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
НОВОСИБИРСКИЙ ИНСТИТУТ ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ ИМ. Н.Н. ВОРОЖЦОВА
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Фирсова Алина Александровна

Разработка и валидация методик количественного определения физиологически активных веществ на основе камфоры, дегидроабиетиновой и усниновой кислот для фармакокинетических исследований

1.5.4 - биохимия

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:

к.х.н. Рогачев Артем Дмитриевич

Новосибирск – 2025

Оглавление

Список специальных терминов и сокращений 5
Введение 7
Глава 1. Обзор литературы 15
1.1. Особенности применения масс-спектрометрии в доклинических исследованиях 15
1.2. Методы обработки биологических образцов 21
1.2.1. Методы гомогенизации тканей 23
1.2.2. Классические методы пробоподготовки биологических образцов для анализа инструментальными методами (ВЭЖХ-УФ или МС/МС) 29
1.2.3. Современные методы микроэкстракции 38
1.3. Заключение по обзору литературы 44
Глава 2. Обсуждение результатов 45
2.1. Исследование противовирусного агента камфецина 45
2.1.1. Оптимизация методики пробоподготовки сухих пятен крови 45
2.1.2. Исследование стабильности камфецина в сухих пятнах крови 47
2.1.3. Разработка и валидация методики анализа камфецина в плазме крови 49
2.1.4. Исследование распределения камфецина между компонентами крови 54
2.2. Исследование фармакокинетики и распределения ингибитора TDP1 на основе дегидроабиетиновой кислоты (KS-389) 63
2.2.1. Подбор хроматографических и масс-спектрометрических условий 63
2.2.2. Исследование стабильности KS-389 в образцах цельной крови 68
2.2.3. Разработка метода пробоподготовки образцов цельной крови и тканей 68
2.2.4. Валидация методик для количественного определения KS-389 в биологических матрицах 71
2.2.5. Исследование фармакокинетики KS-389 и его распределения по органам 77
2.3. Исследование фармакокинетики агента OL9-116, ингибитора TDP1 на основе усниновой кислоты 81
2.3.1. Подбор хроматографических и масс-спектрометрических условий анализа 81
2.3.2. Разработка методики пробоподготовки образцов цельной крови и исследование стабильности OL9-116 в цельной крови 84
2.3.3. Валидация методики количественного определения OL9-116 в цельной крови 85
2.3.4. Исследование фармакокинетики агента OL9-116 90

2.3.5. Исследование противоопухолевого эффекта OL9-116 в комбинации с топотеканом в различных схемах на модели карциномы легких Льюис 95
2.4. Исследование распределения агента OL9-116 в органах 98
2.4.1. Оптимизация условий хроматографического разделения 98
2.4.2. Разработка протокола пробоподготовки образцов тканей легких, печени, почек 100
2.4.3. Валидация методик количественного определения OL9-116 в легких, печени, почках 103
Биологичес-кая матрица 108
2.4.4. Исследование распределения OL9-116 в легких, печени, почках здоровых животных и опухоленосителей 109
Глава 3. Экспериментальная часть 115
3.1 Материалы 115
3.1.1 Реагенты 115
3.1.2 Оборудование 115
3.1.3 Рабочие растворы 116
3.1.4 Экспериментальные животные 117
3.1.5 Подготовка биологических образцов 117
3.2 Эксперименты *in vitro* 118
3.2.1 Приготовление градуировочных образцов и образцов контроля качества для биологических жидкостей 118
3.2.2 Приготовление образцов при различных температурах 119
3.2.3 Приготовление образцов с различными значениями гематокрита 119
3.2.4 Приготовление образцов для изучения процессов сорбции 119
3.2.5 Пробоподготовка образцов плазмы крови 120
3.2.6 Пробоподготовка образцов цельной крови 120
3.2.7 Приготовление и обработка образцов гомогенатов тканей 121
3.2.8 Исследование стабильности агентов 127
3.3 Аналитические методы 128
3.3.1. Условия анализа камфецина 128
3.3.2. Условия анализа KS-389 128
3.3.3. Условия анализа агента OL9-116 129
3.4 Валидация методик количественного определения 130
3.4.1. Селективность 130

3.4.2. Градуировочная зависимость и нижний предел количественного определения 131
3.4.3. Точность и прецизионность 131
3.4.4. Степень извлечения и матричный фактор 132
3.4.5. Стабильность и эффект переноса 132
3.5 Эксперименты *in vivo* 133
3.5.1 Приготовление лекарственных форм 133
3.5.2 Исследование фармакокинетики 133
3.5.3 Исследование распределения 134
Заключение 135
Выводы 136
Список литературы 137
Приложение 1. Исследование противоопухолевого эффекта OL9-116 в комбинации с топотеканом 154
Приложение 2. Разрешение на проведение клинических испытаний 156

Список специальных терминов и сокращений

1,5-DAN – 1,5-диаминонафталин

2,5-BDPO – 2,5-бис(4-диэтиламинофенил)-1,3,4-оксадиазол

4,4’-DADPM – 4,4’-диаминодифенилметан

2-Ad – гидрохлорид 2-адамантиламина

ACN – ацетонитрил

ADMET (absorption, distribution, metabolism, excretion, toxicity) – абсорбция, распределение, метаболизм, выведение, токсичность

AUC (Area Under the Curve) – площадь под кривой

CL – клиренс

DBS (dried blood spot) – сухое пятно крови

DMS (dried matrix spot) – сухое пятно матрицы

EMA (European Medicines Agency) – Европейское агентство лекарственных средств

FA – муравьиная кислота

FDA (Food and Drug Administration) – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов

FPSE (fabric phase sorptive extraction) – метод твердофазной экстракции на модифицированном целлюлозном носителе

HRMS (high resolution mass spectrometry) – масс-спектрометрия высокого разрешения

IC_{50} (концентрация полумаксимального ингибирования) – концентрация исследуемого вещества, приводящая к 50%-ному снижению активности фермента.

LOD (limit of detection) – нижний предел обнаружения

LLOQ (lowest limit of quantitation) – нижний предел количественного определения

MeOH – метанол

MRM – метод мониторинга множественных реакций

LLC (Lewis lung carcinoma) – карцинома легких Льюис

PCA (principal component analysis) – анализ главных компонент

QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) – Быстро, Просто, Дёшево, Эффективно, Надежно и Безопасно

TDP1 – тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1

UGT – уридин-5’-дифосфо-глюкуронилтрансфераза

XIC – извлеченная ионная хроматограмма

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией

ВЭЖХ-УФ – высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовой детекцией

ГХ/МС – газовая хроматография с масс-спектрометрической детекцией

ЖЖЭ – жидко-жидкостная экстракция

МИПс (MIPs, Molecularly Imprinted Polymers) – полимеры, полученные в технике молекулярного отпечатка

МОФы – металл-органические координационные полимеры

НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат

ТФЭ – твердофазная экстракция

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

Введение

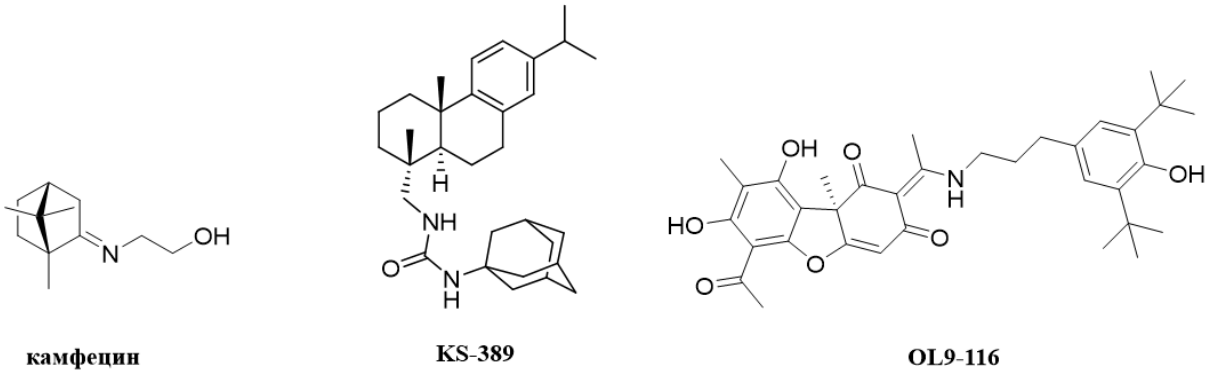
Актуальность и степень разработанности темы исследования

Природные соединения и их структурные аналоги внесли большой вклад в развитие фармакологии и фармации, в особенности при терапии противоопухолевых, инфекционных и сердечно-сосудистых заболеваний [1–3]. Около трети препаратов, одобренных FDA за последние 20 лет, основаны на природных соединениях и их производных [4]. Разработка новых фармакологических соединений требует перехода от исследований *in vitro* к *in vivo*, что невозможно без применения современных инструментальных методов анализа. Поэтому разработка аналитических методик является важным этапом ранней разработки лекарственных препаратов. Тщательное изучение фармакокинетики при выборе и оптимизации перспективной малой молекулы на ранних этапах может снизить вероятность отказа от дальнейших исследований на более поздних стадиях [5]. Фармакокинетические параметры позволяют сделать вывод о скорости всасывания и выведения активного вещества, определить максимальные концентрации. Важным шагом в исследовании фармакокинетики вещества является изучение его распределения между компонентами крови, по органам, направления метаболизма и т.д. Такие исследования позволяют оптимизировать дозу, лекарственную форму и терапевтическую схему для дальнейших исследований препарата.

Изучение поведения ксенобиотиков в организме, в частности, исследование их фармакокинетики, осуществляется в первую очередь определением концентрации активного вещества в биологических жидкостях и тканях органов с использованием инструментальных методов анализа. В основном для этого используются методы высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрической детекции (ВЭЖХ-МС/МС), обеспечивающие высокую чувствительность и точность анализа. Разработка и валидация биоаналитических методик с достаточной чувствительностью к целевому соединению и его предполагаемым метаболитам является сложной задачей для исследователей при проведении экспериментов *in vivo*. Основная трудность таких работ заключается в необходимости поиска оптимального способа пробоподготовки и условий анализа для количественного определения аналитов, которые должны удовлетворять жестким требованиям по валидации, предъявляемым к биоаналитическим методикам.

Ранее в Лаборатории физиологически активных веществ НИОХ СО РАН был получен ряд производных природных соединений, проявивших высокую биологическую активность в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Так, производное камфоры и аминоэтанола, камфецин (рис. 1),

показало высокую активность в отношении вируса гриппа A/H1N1. Конъюгаты дегидроабиетиламина и 1-адамантиламина (агент KS-389), а также усниновой кислоты и 4-(3-аминопропил)-2,6-ди-трет-бутилфенола (агент OL9-116) являются эффективными ингибиторами фермента репарации ДНК TDP1.



камфецин **KS-389** **OL9-116**

Рисунок 1. Структурные формулы камфецина, производного дегидроабиетиновой кислоты KS-389 и производного усниновой кислоты OL9-116.

К настоящему времени разработаны и валидированы две методики количественного анализа камфецина в биологических матрицах. Так, с использованием метода ГХ-МС разработана методика, позволяющая определить его в плазме крови крысы в диапазоне концентраций 0,1-2 мкг/мл [6]. Методика, основанная на основе ВЭЖХ с тандемной масс-спектрометрической детекцией, позволила определять вещество в сухих пятнах крови крысы в диапазоне концентраций 50-2500 нг/мл и изучить фармакокинетику вещества при внутривенном введении [7], однако в данной работе показана низкая степень извлечения вещества (около 2%), что может накладывать определенные ограничения на используемое оборудование. Также с использованием метода ВЭЖХ с масс-спектрометрической детекцией была изучена фармакокинетика вещества при пероральном введении, его распределение по органам и идентифицированы основные метаболиты [8]. Для проведения клинических испытаний необходимо расширить арсенал методик анализа камфецина, исследования его возможности сбора и хранения биологических образцов.

Соединение с лабораторным кодом KS-389 относится к ряду производных дегидроабиетиновой кислоты, среди которых были обнаружены агенты, проявляющие синергизм и способные усиливать цитостатические свойства темозоломида на клеточных линиях глиобластомы U-87MG и SNB19 [9,10]. Данное вещество проявило ингибирующую активность в отношении фермента репарации ДНК TDP1 (IC_{50} = 0,1 μM) наряду с низкой токсичностью в экспериментах *in*

vitro. Агент является соединением-лидером среди структурных аналогов [11], поэтому представляет интерес для дальнейших исследований на животных моделях. Соединение OL9-116 получено на основе усниновой кислоты, производные которой относятся к числу наиболее перспективных ингибиторов TDP1, исследуемых в настоящее время [12,13]. Оно продемонстрировало высокую ингибирующую активность (IC_{50} = 0,16 μM) [14], при этом имело низкую токсичность как на клеточных линиях [15], так и в отношении животных [16]. Также агент OL9-116 усиливал цитотоксическое действие ингибиторов TOP1 в экспериментах *in vitro* [13], а в экспериментах *in vivo* при совместном введении с топотеканом усиливал его действие, в результате чего наблюдалось уменьшение размеров опухоли и количества метастаз до 98% у мышей с карциномой легких Льюис и карциномой Кребс-2 [16,17]. Для поиска оптимальных схем введения и дозировок данных соединений необходимо изучить их фармакокинетику, что в свою очередь требует разработки методик их количественного анализа в биологических матрицах.

В связи с изложенным выше, **целью данной работы** стала разработка и валидация методик с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрической детекции для количественного определения камфецина, агентов KS-389 и OL9-116 в биологических жидкостях и тканях органов, а также исследование их стабильности, фармакокинетики и распределения.

Задачи исследования:

1. Разработка и валидация методики количественного определения камфецина в плазме крови крыс с использованием метода ВЭЖХ-МС/МС, исследование его распределения между компонентами крови в различных условиях, а также исследование стабильности образцов сухих пятнен цельной крови, содержащих камфецин, при различных условиях хранения.
2. Разработка и валидация методик количественного определения агента KS-389 в цельной крови, мозге, печени и почках мышей и исследование фармакокинетики и распределения агента в крови и органах мыши при однократном внутрибрюшинном введении в дозе 5 мг/кг.
3. Разработка, валидация методик количественного определения агента OL9-116 в цельной крови, легких, печени и почках мышей, исследование фармакокинетики на мышах при однократном внутрижелудочном и внутрибрюшинном введении в различных дозах и распределения в органах здоровых мышей и мышей с перевитой карциномой легких Льюис.

Научная новизна исследования, теоретическая и научно-практическая значимость

В ходе исследования была оптимизирована методика количественного определения камфецина в сухих пятнах крови, что увеличило степень его извлечения из биологической матрицы и позволило снизить нижний предел количественного определения вещества. Впервые исследована стабильность образцов сухих пятнен крови, содержащих камфецин, при различных температурах и показано, что для их длительного хранения и/или транспортировки необходима глубокая заморозка.

Впервые изучено распределение камфецина между форменными элементами и плазмой крови в широком диапазоне концентраций. Доказано, что распределение вещества не зависит от температуры и гематокрита, а его адсорбция на форменных элементах крови обратима. Полученные результаты позволяют использовать плазму крови, а не цельную кровь, что может упростить и ускорить клинические испытания за счет исключения необходимости в сложной пробоподготовке.

В рамках проведенного исследования автором с использованием ВЭЖХ-МС/МС впервые были разработаны методики количественного определения агента OL9-116 в цельной крови и гомогенатах тканей легких, печени, почек мышей; агента KS-389 в цельной крови и гомогенатах тканей мозга, печени, почек мышей; камфецина в плазме крови крыс. Методики были валидированы согласно требованиям международных регуляторных документов FDA [18] и EMA [19], что обеспечивает высокую точность и достоверность результатов. Описанные методики для количественного определения KS-389, OL9-116, камфецина в биологических жидкостях и тканях позволяют проводить доклинические и, при адаптации методик для анализа биологических жидкостей человека, клинические исследования с применением тандемной масс-спектрометрии. Разработанные методики пробоподготовки обеспечили возможность минимизации объема биоматериала, необходимого для анализа (до 10 мкл цельной крови), что существенно снижает инвазивность экспериментов и соблюдает принципы биоэтики в работе с лабораторными животными.

Впервые была исследована фармакокинетика и распределение производного дегидроабиетиновой кислоты, агента KS-389, у мышей с тяжелым комбинированным иммунодефицитом при однократном внутрибрюшинном введении и рассчитаны основные фармакокинетические параметры вещества. Впервые доказана способность KS-389 проникать через гематоэнцефалический барьер, что представляет собой значимый результат для разработки препаратов вспомогательной терапии для лечения онкологических заболеваний, включая глиомы.

Впервые была изучена фармакокинетика производного усниновой кислоты OL9-116 при внутрижелудочном введении животным в дозе 150 мг/кг и внутрибрюшинном введении в дозе 5 мг/кг. На основании полученных данных был произведен расчет основных фармакокинетических параметров, в результате анализа которых установлен пролонгированный эффект агента OL9-116. Впервые доказано, что внутрибрюшинное введение агента OL9-116 позволяет снизить дозу в 30 раз для достижения значений максимальной концентрации и площади под кривой, аналогичных внутрижелудочному введению. Использование полученных данных о фармакокинетике OL9-116 и опубликованных данных по фармакокинетике топотекана позволило повысить эффективность терапии карциномы легких Льюис в экспериментах *in vivo*.

Впервые было изучено распределение агента OL9-116 в легких, печени и почках мышей при внутрижелудочном введении агента в группах здоровых мышей и мышей с карциномой легких Льюис. Показано, что у здоровых животных значения максимальной концентрации вещества в органах выше, чем у опухоленосителей, что может быть обусловлено различием в процессах его абсорбции, распределения и выведения. Полученные результаты подчеркивают необходимость дальнейших исследований для более глубокого понимания механизмов изменения фармакокинетики соединения OL9-116 в условиях протекания опухолевого процесса.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Разработанные методики на основе ВЭЖХ-МС/МС позволяют проводить количественный анализ камфецина в плазме крови, а также агентов KS-389 и OL9-116 в цельной крови и органах для определения параметров фармакокинетики и изучения распределения веществ.
2. Распределение камфецина между форменными элементами и плазмой крови является обратимым процессом и практически не зависит от концентрации вещества, температуры и гематокрита.
3. Применение методики количественного определения агента KS-389 в цельной крови позволило установить его фармакокинетические параметры при однократном внутрибрюшинном ведении, а использование методик для анализа тканей позволило подтвердить его способность преодолевать гематоэнцефалический барьер.
4. Фармакокинетика соединения OL9-116 при внутрибрюшинном введении в дозе 5 мг/кг сопоставима с его фармакокинетикой при внутрижелудочном введении в дозе 150 мг/кг по значениям параметров C_{max} и AUC, что позволило скорректировать схему его введения с топотеканом.

5. Распределение агента OL9-116 в легких, печени, почках и первичных опухолевых узлах для мышей с перевитой карциномой легких Льюис характеризуется постоянным уровнем концентрации вещества без выраженного пика и фазы выведения агента, в отличие от группы здоровых животных, у которых в тех же тканях наблюдаются локальные максимумы.

Методология и методы исследования

Теоретической и методологической основой представленного исследования послужили фундаментальные и прикладные исследования отечественных и зарубежных ученых по данной тематике, публикации в периодических изданиях, методические рекомендации. Определение концентрации исследуемых агентов проводилось методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемным масс-спектрометрическим детектированием в режиме мониторинга множественных реакций (MRM). Основными нормативными документами, регламентирующими процесс разработки и валидации биоаналитических методик, выступали регуляторные документы FDA, EMA. Все эксперименты с использованием животных проводились в соответствии с Директивой Европейского Сообщества (2010/63/EU). Обработка полученных результатов проводилась с использованием метода наименьших квадратов, расчетов относительного стандартного отклонения и относительной погрешности.

Степень достоверности

Достоверность представленных в работе результатов обусловлена однородностью выборки объектов исследования, весомым количеством повторных измерений для одного объекта исследования, использования валидированных методик для количественного определения агентов, согласованностью с ранее опубликованными результатами, а также теоретическим обоснованием полученных экспериментальных данных.

Личный вклад автора

Автором лично выполнен поиск и анализ научной литературы по теме исследования, проведена разработка и валидация методик, пробоподготовка, анализ биологических образцов методом ВЭЖХ-МС/МС, статистическая обработка полученных данных и интерпретация результатов. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования, включая постановку задач, их экспериментальную реализацию, подготовку и представление результатов на научных конференциях. Соискателем внесен существенный вклад в подготовку научных публикаций по теме исследования. Органы и ткани мышей для исследования фармакокинетики агента OL9-116, а также данные по исследованию противоопухолевого эффекта OL9-116 в сочетании с топотеканом были получены и предоставлены

сотрудниками Лаборатории биоорганической химии ферментов ИХБФМ СО РАН (основной вклад Корниенко Т.Е.) и сотрудником ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, к.б.н. Поповой Н.А.

Связь диссертации с основными научными темами, внедрение результатов

Полученные результаты вошли в цикл доклинических исследований камфецина, по результатам которых получено разрешение Министерства Здравоохранения РФ №160 от 17.04.2020 на проведение клинических испытаний вещества. В диссертацию включены результаты, полученные соискателем при выполнении исследований по гранту РНФ 19-73-00051 «Дизайн новых адамантан-содержащих ингибиторов ферментов репарации ДНК, способных повышать эффективность химиотерапевтических агентов в отношении мультиформной глиобластомы» (руководитель к.х.н. Пономарев К.Ю.), гранту РНФ 21-14-00105 «Ингибиторы тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 для сенсибилизации опухолевых клеток к химиопрепаратам, используемым в клинике» (руководитель к.х.н. Захаренко А.Л.).

Публикации и апробация результатов исследования

По материалам диссертации опубликованы тезисы 15 докладов, 5 статей в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus. Результаты исследования докладывались на конференциях в виде 8 устных докладов.

Результаты диссертационной работы были представлены на следующих конференциях: 57-я Международная научная студенческая конференция (Новосибирск, 2019); XXVI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2019); Междисциплинарная конференция «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии» (Крым, 2019); The 6th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry (онлайн-конференция, 2020); XXVIII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2021); Первая Всероссийская школа для молодых ученых по медицинской химии MedChemSchool2021 (Новосибирск, 2021); The 9th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry (онлайн-конференция, 2023); XXIV Международная научно-практическая конференция студентов и молодых ученых «Химия и химическая технология в XXI веке» (Томск, 2023); Всероссийская конференция с международным участием «Идеи и наследие А.Е. Фаворского в органической химии» (Санкт-Петербург, 2023); VI Съезд фармакологов России (Москва, 2023); 6-я Российская конференция по медицинской химии (Нижний Новгород, 2024).

Объем и структура диссертации

Работа изложена на 157 страницах машинописного текста, содержит 63 рисунка, 25 таблиц. Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, заключения, выводов, списка цитируемой литературы и приложения. Библиографический список состоит из 174 литературных источников.

Благодарности

Прежде всего, автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю к.х.н. Рогачеву Артему Дмитриевичу за постановку задач исследования, помощь в их реализации; за предоставленную свободу научного поиска и поддержку предлагаемых идей; за переданные знания, навыки и опыт в области хроматографии и масс-спектрометрии.

Автор благодарит сотрудников Лаборатории физиологически активных веществ под руководством чл.-корр. РАН, д.х.н., проф. Салахутдинова Н.Ф. за возможность реализации совместных проектов и дружественную, теплую атмосферу. Отдельные слова благодарности автор выражает д.х.н. Яровой О.И., д.х.н. Лузиной О.А., к.х.н. Ковалевой К.С. за предоставление веществ для проведения исследований, изложенных в данной работе. Автор выражает благодарность сотрудникам Лаборатории фармакологических исследований под руководством д.б.н., проф. Толстиковой Т.Г. за предоставление животных и биологического материала для разработки методик. Особую признательность автор выражает заведующему Лаборатории ингибиторов вирусных протеаз д.б.н. Хвостову М.В. за ценные советы и помощь с анализом результатов в области фармакологических исследований.

Автор благодарит сотрудников Лаборатории биоорганической химии ферментов ИХБФМ СО РАН, под руководством акад. РАН, д.х.н., проф. Лаврик О.И, в особенности Корниенко Т.Е., к.х.н. Захаренко А.Л., а также сотрудника Лаборатории регуляции экспрессии генов ИЦиГ СО РАН, к.б.н. Попову Н.А. за помощь в проведении исследований фармакокинетики и распределения агента OL9-116, исследование противоопухолевой активности агента OL9-116 и продуктивную совместную работу; сотрудников SPF-вивария ИЦиГ СО РАН под руководством к.б.н. Завьялова Е.Л. за помощь в проведении исследований фармакокинетики и распределения агента KS-389 на мышиной модели с тяжелым комбинированным иммунодефицитом.

Наконец, автор выражает благодарность мужу, маме и папе, а также близким и друзьям за неизменную поддержку, терпение, любовь и заботу на протяжении всех лет учебы, а также в процессе проведения исследований и написания этой диссертации.

Глава 1. Обзор литературы

Основной целью разработки методов анализа ксенобиотиков в крови, плазме и других биологических матрицах обычно является изучение фармакокинетики и распределения этих соединений. В данном обзоре рассмотрены особенности применения масс-спектрометрии и методики пробоподготовки биологических жидкостей и органов при проведении экспериментов в рамках доклинических исследований перспективных лекарственных препаратов. Особое внимание уделено преимуществам и недостаткам каждого из способа обработки биологической матрицы. Обзор включает в себя современные тенденции в методиках обработки биологических жидкостей и тканей, применяемых в ранней разработке лекарственных препаратов, контроле качества одобренных лекарственных препаратах, токсикологии, для анализа малых молекул.

1.1. Особенности применения масс-спектрометрии в доклинических исследованиях

В XX веке применение таких инструментальных методов химического анализа как высокоэффективная жидкостная хроматография, спектроскопия ядерного магнитного резонанса, масс-спектрометрия и вычислительные алгоритмы достигло значительных успехов в области медицинской химии. Именно применение инструментальных методов позволило качественно и количественно определять химические компоненты растений и использовать их при разработке лекарственных препаратов [20–22]. Масс-спектрометрия как специфическая система обнаружения в течение нескольких лет ограничивалась применением совместно с газовой хроматографией (ГХ). С конца XX века масс-спектрометрию стали эффективно сочетать с ВЭЖХ, а наиболее значимым достижением стала система ВЭЖХ с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС), разработанная и оптимизированная за последние 30 лет. При этом наблюдается неуклонный рост распространения систем ВЭЖХ-МС по сравнению с ГХ-МС для биоанализа лекарственных средств [23].

Исследования последних десятилетий показывают, что высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (МС/МС) является мощным инструментом для количественного определения лекарственных средств и метаболитов в биологических жидкостях (рис. 2). В настоящее время данный метод считают наиболее предпочтительным в силу его чувствительности и селективности как в фундаментальных, так и в прикладных исследованиях [24–28]. Масс-спектрометрические методы анализа, как правило, имеют более высокую чувствительность по сравнению с другими аналитическими методами,

такими как иммуноферментный, радиоиммунный, хемолюминисцентный анализы, ВЭЖХ в сочетании с ультрафиолетовым детектором, газовая хроматография, капиллярный электрофорез [29,30]. Они демонстрирует превосходную специфичность к аналиту благодаря характерным для каждого вещества осколочным ионам, высокому разрешению и уникальным способностям фильтрации, особенно доступным в тандемной масс-спектрометрии или масс-спектрометрии высокого разрешения [31].

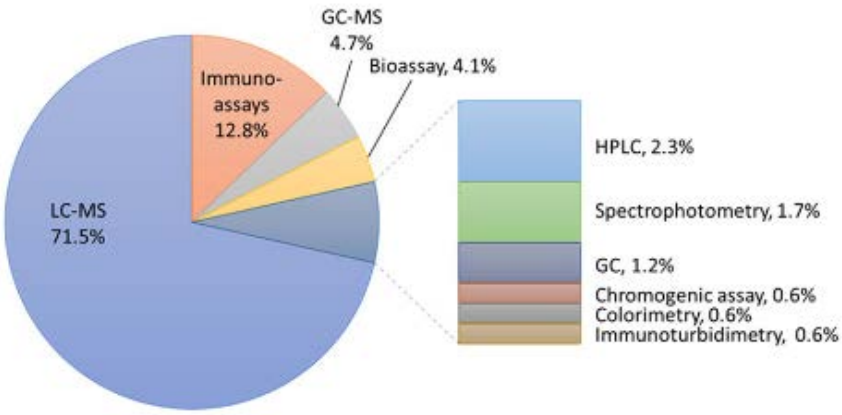


Рисунок 2. Аналитические методы, применяемые в терапевтическом мониторинге лекарственных средств. Адаптировано из [29].

В современной фармацевтической разработке лекарственных препаратов животные модели выступают одним из инструментов в доклиническом скрининге биологически активных молекул и их продвижению на стадию клинических испытаний. Для исследования активности перспективного биологически активного вещества в опытах на животных необходимо подобрать его соответствующую дозу и режим введения, провести фармакокинетические исследования, для которых важно количественно определять вещество в биологической жидкости (цельная кровь, плазма крови, сыворотка, моча, слюна, спиномозговая жидкость). Данные исследования невозможно проводить без разработанного и валидированного протокола для количественного определения ксенобиотика.

Животные модели чаще всего используются для оценки основных фармакокинетических параметров, эффективности и безопасности лекарств [32]. В качестве животной модели для проведения доклинических исследований, как правило, используют животных небольшого размера, таких как мыши, крысы, хомяки [33,34]. Грызуны выступают наиболее популярной моделью, поскольку они имеют биологическое сходство с человеком, с ними легко работать и разводить в

лабораторных условиях [35]. Так, крысы схожи с человеком по составу крови, структуре тканей, физиологическим реакциям в ответ на различные воздействия. В работе [36] сообщается, что все человеческие гены, которые связаны с заболеваниями, имеют ортологи в геноме крысы.

Исследования с использованием лабораторных животных ограничивают объем отбираемой биологической жидкости, особенно при проведении экспериментов, требующих частого отбора цельной крови. Так, в длительном эксперименте, связанном с отбором большого количества образцов крови, у мышей можно отбирать образцы объемом 10-20 мкл и до 100-200 мкл для крыс. Это накладывает дополнительные требования к чувствительности аналитических методов и подходам к обработке биологических матриц [29].

Небольшой объем отбираемой пробы и матричный эффект требуют особой чувствительности аналитического метода. При исследовании фармакокинетики матричный эффект является основным препятствием, поскольку компоненты матрицы способны подавить сигнал аналита в десятки или сотни раз. Данный эффект обусловлен составом биологических жидкостей и тканей. Например, моча имеет высокое содержание неорганических солей (например, натрия, фосфата, сульфата и аммиака), мочевины, креатинина, белков и пигментных продуктов распада крови (например, урохрома). Плазма крови, легкие, мозг содержат большое количество фосфолипидов, цельная кровь содержит эритроциты, которые обычно подвергаются лизису. Использование стадии хроматографического разделения позволяет дополнительно очистить образец от примесей, которые не удалось удалить при проведении пробоподготовки, что позволяет снизить матричные эффекты, снизить предел обнаружения (LOD) и количественного определения (LLOQ) аналитов. Анализ образцов в режиме мониторинга множественных реакций (MRM) позволяет избирательно регистрировать осколочные ионы, характерные для целевого аналита [37]. В данном режиме масс-спектрометр отслеживает серию «реакций» — переходов между ионными состояниями молекулы, начиная с родительского иона (precursor ion) и заканчивая фрагментами (product ions), которые образуются в результате его фрагментации. Этот метод позволяет фокусироваться только на интересующих ионах, исключая нежелательные молекулы, что особенно важно при анализе сложных образцов, таких как кровь или другие биологические жидкости, ткани, где присутствуют матричные компоненты.

При изучении фармакокинетики в доклинических исследованиях используют низкие дозы введения вещества (до 150 мг/кг), что обеспечивает концентрацию в крови и плазме крови на уровне нескольких десятков или сотен нг/мл. При расчете фармакокинетических параметров оценивается значение AUC (Area Under the Curve, площадь под кривой), которое используются для

описания и количественной оценки аспектов зависимости концентрации вещества в биологической жидкости от времени [38]. Для расчета необходимо, чтобы концентрация действующего вещества оценивалась в течение трехкратного периода полувыведения ($\tau_{1/2}$) [39], поэтому в данных исследованиях используют специфичные и чувствительные аналитические системы, такие как тандемная масс-спектрометрия и масс-спектрометрия высокого разрешения. К тому же, для большинства соединений использование ВЭЖХ-МС является единственным подходом, позволяющим получить полный профиль зависимости концентрации веществ в биологической жидкости от времени [23].

Биотрансформация лекарственного средства как в тканях кишечника, так и в печени является одним из важнейших факторов, определяющих его фармакокинетический профиль. Метаболизм лекарственных веществ можно разделить на две части: фаза I (окисление, восстановление и гидролиз) и фаза II (конъюгация). Процессы окислительной биотрансформации катализируются семейством ферментов цитохрома P450 (CYP) [40], тогда как реакции конъюгации проводятся в основном при участии фермента уридин-5'-дифосфо-глюкуронилтрансферазой (UGT) [41]. Ферменты цитохрома P450 участвуют в окислительно-восстановительных реакциях, используя реакционноспособное гемовое кольцо, при этом атом железа является конечным акцептором или донором электронов, а НАДФН - необходимым кофактором (рис. 3) [42]. Данные ферменты также называются оксидазами смешанной функции и похожи на другие ферменты, участвующие в транспорте электронов.

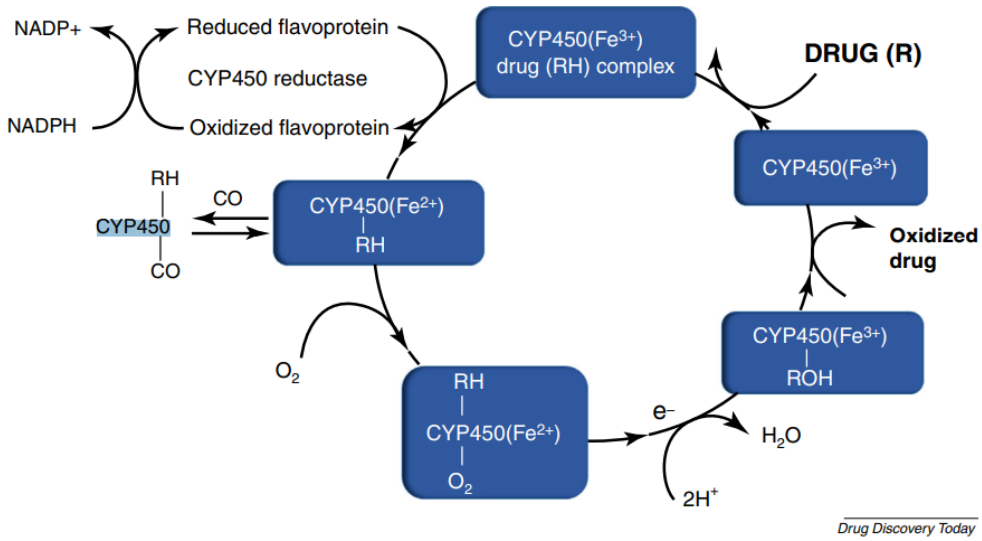


Рисунок 3. Каталитический цикл цитохрома P450 (CYP450). Адаптировано из [42].

Исследования по идентификации и профилированию метаболитов, проводимые на этапе оптимизации структурной формулы соединения-лидера, могут сыграть важную роль в разработке новых лекарственных препаратов на основе малых молекул [43,44]. Эти исследования обычно дополняются экспериментами по выделению метаболитов для оценки образования реакционноспособных метаболитов [45], которые могут взаимодействовать с лекарственной молекулой или привести к побочным реакциям у пациентов [46]. В результате данных исследований возможно оптимизировать структуру малой молекулы для улучшения фармакокинетических параметров, блокирования путей, приводящих к образованию реакционноспособных метаболитов, или введению функциональных групп для изменения метаболических путей.

Масс-спектрометрия является одним из инструментов, применяемых в исследованиях биотрансформации ксенобиотиков. С внедрением в систему жидкостной хроматографии масс-спектрометрия стала стандартным аналитическим инструментом для анализа образцов при исследованиях метаболизма [47]. В настоящее время ведется постоянная работа, направленная на повышение чувствительности метода и эффективности обнаружения метаболитов.

Так, в работе [8] для поиска метаболитов камфецина использовали метод нетаргетированного скрининга образцов мочи после введения камфецина группе крыс внутрижелудочно с использованием масс-спектрометра с тройным квадруполем. Важно отметить, что нетаргетированный поиск метаболитов с применением масс-спектрометров такого типа возможен только в экспериментах без фрагментации молекулярных ионов с объединением полученных хроматограмм образцов до и после введения лекарственного вещества. Поиск различий метаболомных составов осуществлялся с помощью метода анализа главных компонент (PCA, principal component analysis), широко применяемого в метаболомных исследованиях [48–50]. В результате было обнаружено, что основными метаболитами камфецина являются его глюкуронид (M1), иминокислота (M2) и сульфат (M3) камфецина (рис. 4).

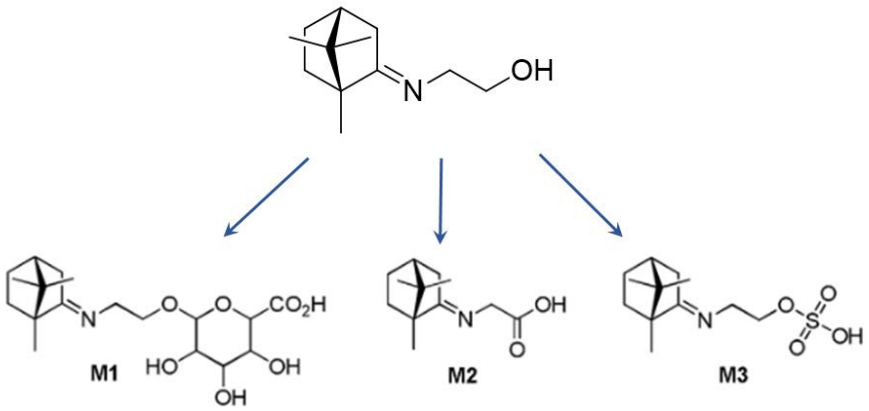


Рисунок 4. Структурные формулы камфецина и его метаболитов. Адаптировано из [8].

Основным недостатком применения масс-спектрометров низкого разрешения для поиска метаболитов является невозможность установления точной молекулярной массы веществ и подтверждения их брутто-формул. Для однозначного подтверждения структурной формулы полученных метаболитов применяют масс-спектрометрию высокого разрешения в сочетании с методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР) [51]. Так, идентификацию метаболитов камфецина авторы работы [8] проводили с использованием масс-спектрометрии высокого разрешения, в том числе для определения брутто формулы не только исходных молекул, но и осколочных ионов. Полученные данные о метаболитах камфецина сопоставимы с основными путями биотрансформации спиртов: окисление, глюкуронирование спирта, сульфирование вещества по гидроксильной группе, образование эфиров жирных кислот и фосфорилирование [52–54].

Масс-спектрометрия высокого разрешения (HRMS) является мощным инструментом для изучения метаболизма лекарственных средств. Она позволяет проводить как целевой, так и нецелевой анализ, обеспечивая высокую чувствительность и универсальность в обнаружении метаболитов, включая ранее неизвестные. Одним из ключевых преимуществ HRMS является возможность точного определения молекулярной массы с минимальной погрешностью. В сочетании с тандемной масс-спектрометрией (MS/MS) метод обеспечивает фрагментацию молекул, что помогает выявлять структурные изменения в исходных веществах, такие как гидроксилирование, деметилирование или конъюгация с глюкуроновой кислотой.

В сочетании с жидкостной хроматографией, масс-спектрометрия высокого разрешения позволяет эффективно анализировать сложные биологические матрицы, такие как кровь, моча или ткани. Это представляет возможным выделение и изучение метаболитов даже при их крайне низких концентрациях. Одним из важных преимуществ метода является отсутствие необходимости

в стандартах для проведения анализа, что особенно актуально на начальных этапах исследований, когда стандартные образцы метаболитов или исходных веществ могут быть недоступны. Более того, данный подход является экспрессным, так как позволяет одновременно анализировать большое количество соединений.

Примером применения HRMS является работа [55], в которой авторы изучали содержание синтетических каннабиноидов и их метаболитов в образцах мочи. Значимость данного исследования заключается в отсутствии стандартных образцов для быстрого обнаружения соединений в случаях интоксикации. Путем фрагментации ионов было установлено, что основными метаболитами являются гидроксилированные производные исходных соединений, тогда как глюкуронированные производные не были обнаружены. Разработанный метод может быть адаптирован для анализа других соединений синтетических каннабиноидов в токсикологии или применен для обнаружения данного класса соединений в других биологических матрицах, например в крови и плазме.

1.2. Методы обработки биологических образцов

Этап пробоподготовки исторически был и остается самой сложной частью разработки биоаналитической методики. За прошедшие годы было разработано несколько методов решения проблем увеличения степени извлечения и снижения матричных эффектов с целью повышения достоверности и надежности результатов в разработанной методике. В последние годы определенные подходы в обработке образцов приобрели известность и получили признание при рутинной подготовке проб. Пробоподготовка образцов биологических матриц идет в тесной связке с методом ВЭЖХ-МС/МС и в настоящее время является областью интенсивных разработок. Можно утверждать, что часть аналитической методики, связанная с подготовкой пробы, является наиболее важной и сложной с точки зрения как затрат времени, так и сложности извлечения целевого аналита. Важно обеспечить высокую степень извлечения вещества и избавиться от мешающего влияния соединений, составляющих матрицу. При разработке методик, направленных на потоковый анализ, немаловажным также является фактор стоимости расходных материалов и времени обработки образца. Кроме того, поскольку каждая матрица имеет свои уникальные особенности, различные характеристики каждого аналита и матрицы часто определяют тип метода экстракции, который следует использовать [56].

Объектами исследований при разработке методик служат клеточные культуры, биологические жидкости, а также гомогенаты тканей. К биологическим жидкостям относят

жидкости, производимые организмом, такие как кровь, моча, слюна, секреторные жидкости и т.д. Данные жидкости используют как в диагностических, так и в научных целях. В доклинических исследованиях перспективных биологически активных веществ также прибегают к количественному определению ксенобиотика в сыворотке и плазме крови, которые получают после отбора цельной крови у животного. Преимущество работы с сывороткой и плазмой крови заключается в возможности хранения образцов, в отличие от образцов цельной крови [57]. Как обсуждалось ранее, каждая матрица обладает своими особенностями, поэтому требует первостепенного анализа веществ, которые могут оказывать мешающее влияние и подавлять аналитический сигнал.

Современные методы пробоподготовки биологических образцов представляют возможным использование небольшого объема биологических жидкостей при исследовании фармакокинетики. Такой подход позволяет свободно перемещаться животному во время эксперимента, не наносит вред организму и не вводит животное в стресс, что уменьшает вероятность возникновения экспериментальной ошибки из-за изменения нормальной физиологии и метаболизма, снижает риск потери большого количества крови, как следствие – гибели животного [58].

Количественное определение лекарственных препаратов в тканях в последнее время стало более распространенным дополнением к анализу биологических жидкостей. Анализ соединений в образцах тканей порой является необходимой стадией, которую необходимо включить в разработку биоаналитических методик. Причинами проведения такого типа анализов могут стать изучение распределения вещества в организме [59], обнаружение лекарственного препарата в локальной области (например, опухоли) [60,61], клеточные исследования [62].

Подбор метода гомогенизации и обработки тканей является вызовом для исследователей, поскольку ткани представляют собой сложную функциональную систему, богатую клетками, мембранами, электролитами, ферментами, в отличие от плазмы [63]. Применение одной и той же процедуры гомогенизации и экстракции целевого аналита для разных органов редко представляется возможным из-за разнообразия тканей и их свойств. К примеру, разработанный метод для анализа ксенобиотика в мозге может быть неподходящим для анализа того же вещества в печени или почках в силу больших различий состава и плотности тканей. Наиболее распространена ситуация подавления или усиления аналитического сигнала при работе с различными гомогенатами с использованием единой процедуры экстракции и анализа [64,65]. Результат анализа гомогенатов зависит от аналита и особенностей матрицы, но в литературе нет

данных о закономерности, позволяющей предсказать результат и выбрать единую процедуру обработки тканей.

При выборе способа пробоподготовки также важно ориентироваться на то, каким методом будет определяться аналит. Так, при использовании хроматографических методов крайне важно удалить белки и другие высокомолекулярные соединения, которые при попадании на хроматографическую колонку в присутствии органического растворителя выпадут в осадок при денатурации и тем самым быстро выведут ее из строя. При анализе веществ методом ВЭЖХ-УФ необходимо удостовериться, что биологическая матрица не содержит соединений, элюирующихся одновременно с аналитом и имеющих поглощение в УФ спектре на выбранной длине волны. Анализ методом ВЭЖХ-МС/МС требует также удаления неорганических солей и компонентов биологической матрицы, таких как фосфолипиды, способных подавлять ионизацию аналита. В то же время, этот метод позволяет проводить анализ без разделения аналита и примесей, при условии, что они не дают перекрывающихся сигналов в масс-спектре.

Выбор метода обработки образца зависит не только от инструментального метода анализа, показателей степени извлечения, матричных эффектов, но и от удобства проведения эксперимента. Порой, пренебрегая высокими показателями извлечения аналита из матрицы и достижению низких значений предела чувствительности, можно обеспечить удобство проведения эксперимента, сбор и передачу образцов между коллективами исследователей, уменьшить время обработки большого количества проб. Поэтому, несмотря на строгий регламент FDA и EMA [19], важно сохранять баланс между требуемыми показателями, удобством и скоростью выполнения протокола.

В литературе описано множество современных способов пробоподготовки биологических образцов. Тем не менее, в практике основное распространение получили методы твердофазной экстракции [66–68], жидко-жидкостной экстракции [69,70], осаждение белков биологической матрицы [71,72]. В данном разделе мы рассмотрим современные методы гомогенизации и пробоподготовки при разработке биоаналитических методик как для биологических жидкостей, так и для гомогенатов тканей.

1.2.1. Методы гомогенизации тканей

Для многих типов тканей пробоподготовка остается сложным этапом в процессе биоанализа. Для того чтобы извлечь аналит из биологической матрицы, такой как ткань, необходимо разрушить не только ее структуру, но и целостность клеток, составляющих ее. Основной целью гомогенизации образцов тканей при анализе ксенобиотиков является получение

однородного гомогената, который при пипетировании представляет собой жидкий образец точного объема. Для разрушения структуры ткани используют различные методы гомогенизации образцов: механическая гомогенизация [73–75] и ферментативное расщепление [74,76]. Механические методы включают измельчение ткани вручную с помощью пестика, использование автоматического гомогенизатора, обработку ультразвуком. Выбор способа гомогенизации в первую очередь зависит от типа обрабатываемой ткани. В биоаналитических исследованиях чаще всего используют основные органы метаболизма и выведения, такие как печень и почки, а также органы и ткани, в которых необходимо провести подтверждение наличия вещества (мозг, легкие, сердце, мышцы, кожа).

При работе с органами схема пробоподготовки увеличивается. Целый орган или его часть помещают в пробирку, взвешивают и гомогенизируют. Гомогенат ткани обрабатывают согласно протоколу и анализируют. Общая схема обработки образца ткани представлена на рисунке 5. В зависимости от поставленной задачи, типа ткани выбирают наиболее оптимальный способ гомогенизации образца.

Рисунок 5. Общая схема обработки образцов ткани.

Тщательное измельчение образца ткани достигается путем растирания с помощью пестика. Ступка и пестик являются доступными и универсальными гомогенизаторами, изготовленными из различных материалов в разных размерах (рис. 6). Некоторые из них можно использовать во время охлаждения жидким азотом для придания хрупкости тканям; в таком случае гомогенат представляет собой порошок. Ткань помещают в ступку или в пробирку типа Эппендорф и проворачивающими движениями измельчают с помощью пестика, который плотно прилегает к стенкам сосуда. Такие гомогенизаторы обычно изготавливаются из боросиликатного стекла и являются многоразовыми. На рынке представлено множество гомогенизаторов, которые подходят для разного типа тканей. Гомогенизаторы Potter, Tenbroek и Duall подходят для более плотных тканей [77], таких как мышцы, почки, за счет своей формы. Гомогенизатор Dounce используют для мягких тканей [78,79]. Преимуществами гомогенизации с помощью растирания в ступке является отсутствие нагревания образца при трении, что является важным для приготовления митохондриальных препаратов [80], и возможность проведения гомогенизации при охлаждении в

жидком азоте [81]. Данный способ подходит для небольших серий образцов. Недостатком данного способа гомогенизации является длительная ручная обработка серии образцов, сложность автоматизации процесса и получение неоднородного гомогената.

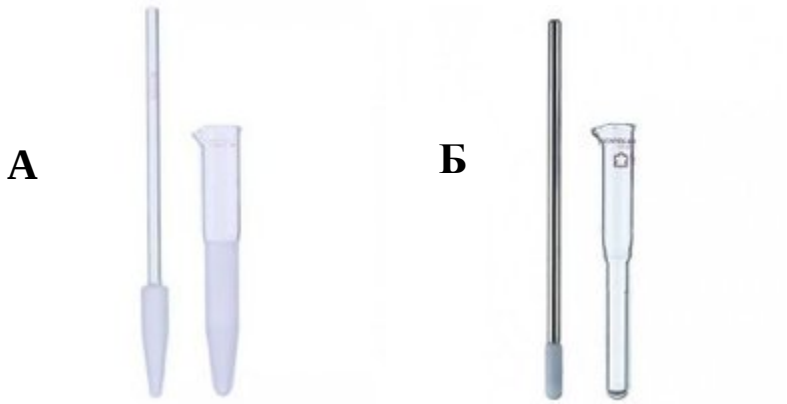


Рисунок 6. Гомогенизаторы Dual (А) и Potter (Б), состоящие из ступки и пестика.

Гомогенизаторы по типу ротор-статор (рис. 7) представляют собой систему, состоящую из неподвижного цилиндра и внутренней высокоскоростной лопасти, которую называют ротор или генератор. С помощью лопасти происходит тонкое измельчение плотных тканей, таких как целые органы, мышцы, соединительные ткани [82]. Например, плацентарные сосуды имеют высокое содержание мышечной и волокнистой ткани, что затрудняет гомогенизацию биологического образца. В работе [83] авторы показали, что наиболее предпочтительным способом гомогенизации ткани плацентарных сосудов для количественного определения липидов по сравнению с гомогенизацией с использованием шаровой мельницы, криогенным измельчением и гомогенизатора Dounce, которые практически не разрушали биологический образец.

Для достижения однородной консистенции к образцу добавляют воду, буферный раствор или чистую плазму [84]. Гомогенизаторы такого типа используют и при охлаждении образцов. Малинский и соавторы гомогенизировали филе рыбы с добавлением сухого льда для анализа ряда перфторированных соединений для контроля их содержания в водоемах. Гомогенат представлял собой мелкодисперсный порошок, который удобно хранить и взвешивать для анализа. По всей видимости, одной из причин использования данного метода в работе стало удобство применения гомогенизатора типа ротор-статор при гомогенизации большого объема ткани в рамках одного образца [85].

Авторы работы [86] разрабатывали методику количественного определения фарнезил- и геранилгеранилпирофосфатов, которые являются промежуточными продуктами мевалонового

пути, в ткани мозга. Авторы утверждают, что нарушение образования данных изопреноидов может привести к таким серьезным заболеваниям, как болезнь Альцгеймера. Использование гомогенизатора по типу ротор-статор при охлаждении образцов и добавлении буферного раствора позволило провести полную валидацию методики количественного определения указанных аналитов в ткани мозга человека.

Рисунок 7. Гомогенизаторы по типу ротор-статор.

Для мягких тканей, таких как мозг или жировая ткань [87], используют ультразвуковую гомогенизацию (рис. 8), однако в литературе есть примеры использования ультразвуковой гомогенизации для измельчения плотных тканей, таких как легкие и печень [88–90]. Установка для ультразвуковой гомогенизации представляет собой электронный генератор с таймером и регулятором мощности, пьезоэлектрическую колебательную систему с зондом в металлическом корпусе. За счет интенсивной вибрации и высокочастотных волн происходит расщепление ткани, что приводит к эффективной гомогенизации образца. Иногда исследователи используют ультразвуковую баню в силу ее доступности и распространенности в лабораториях, однако она не является эффективным в получении гомогенатов тканей, поскольку ультразвуковой зонд обеспечивает в 100 раз больше энергии, чем ультразвуковая баня.

Применение ультразвуковой гомогенизации тканей успешно продемонстрировано в ряде исследований влияния метамфетамина, его производных и метаболитов при исследовании нейротоксичности в отдельных областях мозга [91] и цельном органе [92], оценке количества цефтриаксона в легких при ингаляционной форме введения препарата [93]. Таким образом, метод ультразвуковой гомогенизации тканей зарекомендовал себя надежными и воспроизводимым.

Рисунок 8. Гомогенизация с помощью ультразвукового зонда.

При интенсивном встряхивании смеси образца ткани и растворителя вместе с небольшими стеклянными, керамическими или металлическими шариками происходит разрушение клеточной структуры [94]. Такой способ механической гомогенизации получил название bead-beating, что переводится как «разбивание шариками» (рис. 9). В пробирку, содержащую шарики для гомогенизации, помещают навеску ткани или целый орган, добавляют воду или буферный раствор. При интенсивном встряхивании с частотой до 10000-20000 Гц в течение нескольких секунд получается однородный гомогенат. Тип шариков зависит от типа ткани, которую нужно гомогенизировать. Шарики из стекла или керамики идеально подходят для получения гомогенатов мягких тканей, таких как жировая ткань, печень. Преимуществами данного способа механической гомогенизации являются быстрота проведения гомогенизации, отсутствие переноса образца, поскольку шарики являются одноразовыми, широкая область применения для разных типов тканей, возможность одновременного гомогенизации нескольких образцов. К очевидным недостаткам данного метода можно отнести высокую стоимость оборудования (шейкера) и расходных материалов и невозможность получения однородного гомогената для плотных тканей.

Рисунок 9. Установка для гомогенизации с помощью специальных шариков.

Авторы работы [95] разработали протокол, сочетающий в себе встряхивание ткани с металлическими шариками и ультразвуковую обработку образцов и позволяющий получить однородный гомогенат. Такой способ позволил унифицировать гомогенизацию широкого ряда органов (мозг, сердце, легкие, печень, селезенка, кровь, рог матки, спинной мозг, почки и мышцы) и избежать различия в степени гомогенизации органов. На первом этапе цельный орган измельчали и отделяли от волокнистой и соединительной ткани. К очищенной ткани добавляли воду и несколько стальных бусин для гомогенизации. Гомогенизацию проводили в течение 5-10 минут, после охлаждали на льду 30 минут. Образец отделяли от стальных бусин, переносили в чистые конические пробирки типа Эппендорф и дополнительно обрабатывали ультразвуком в течение 10 секунд. Такой метод позволял получить наиболее однородный гомогенат даже для таких плотных тканей, как сердце и мышцы.

В случае работы с особо прочными и волокнистыми тканями, такими как кожа и легкие, трудно добиться однородной гомогенизации механическим способом. Для таких образцов применяют ферментативное расщепление, которое позволяет расщепить соединительные ткани. Для этого чаще всего используют протеазу, протеиназу К и коллагеназу как индивидуально, так и в формате коктейля [74]. При исследовании фармакокинетики препаратов для местного применения важно количественно определять содержание в различных слоях кожи. Для получения гомогенатов кожи наиболее предпочтительным является применение коллагеназы, которая разрушает и дезагрегирует структуру ткани, не повреждая клеточные мембраны, и способствует наиболее полному извлечению анализируемого вещества. Для количественного определения диклофенака в ткани кожи после местного применения авторы использовали сочетание ферментативного

расщепления ткани в течение 16 часов и механической гомогенизации с добавлением стальных шариков в течение 5 минут. Сочетание механической и ферментативной гомогенизации позволило получить однородный образец и точные результаты анализа диклофенака методом ВЭЖХ-МС/МС по сравнению с применением данных методов по отдельности [96].

Ключевым преимуществом данного метода является невысокая стоимость реагентов и получение однородных гомогенатов, но данный способ не лишен недостатков. Ферментативная гомогенизация является наиболее длительным методом: обработка образца может занять от 1 до 24 часов. В литературе упоминаются способы ускорения ферментативной реакции для гомогенизации образцов, такие как расщепление при повышенном давлении [97] или обработке ультразвуком [98]. Проведение ферментативной гомогенизации с обработкой ультразвуком позволяет сократить время до 5 минут, но важно проверить стабильность анализируемых веществ в разработанных условиях гомогенизации [99], так как проведение ферментативной реакции способно внести химические изменения [95].

1.2.2. Классические методы пробоподготовки биологических образцов для анализа инструментальными методами (ВЭЖХ-УФ или МС/МС)

Одним из наиболее распространенных и популярных способов обработки биологического образца является метод осаждения белков. Этот метод заключается в добавлении органического растворителя или другого раствора-осадителя к биологическому образцу, что приводит к коагуляции белков и выпадению их в осадок. Для этих целей используют растворы кислот (наиболее предпочтительной является трихлоруксусная кислота), оснований, солей, органических соединений, таких как мочевина. Кроме того, используют низшие спирты, ацетонитрил или их комбинации в зависимости от определяемого компонента и биологической матрицы. В большинстве биоаналитических методов к одному объему биологического образца добавляют не менее трех объемов растворителя, затем образец интенсивно встряхивают и центрифугируют (рис. 10). Поскольку коагуляция белков приводит к изменению структуры матрицы, молекула, связанная с этими белками, переходит в растворитель. При применении данного метода пробоподготовки совместно с анализом ВЭЖХ-УФ нужно учитывать интерференцию мешающих компонентов, таких как фосфолипиды, аминокислоты, олигопротеины, метаболиты, которые экстрагируются совместно с целевым веществом. Так, образцы, осажденные метанолом, содержат на 40% больше фосфолипидов по сравнению с ацетонитрилом [100], тетрагидрофураном или этанолом [101].

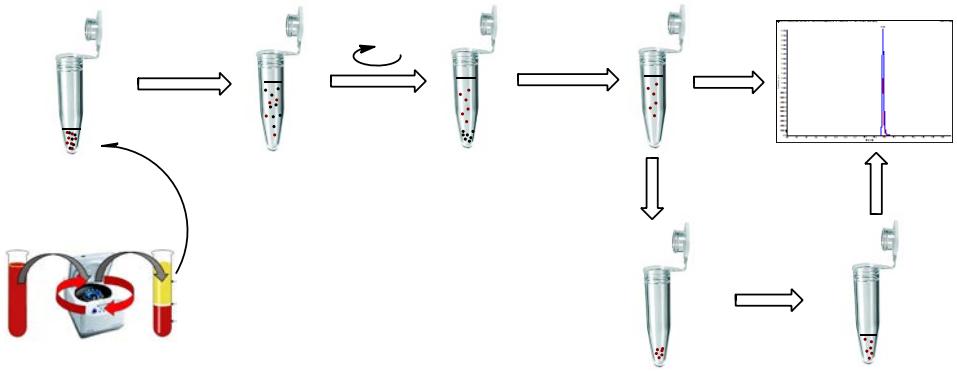


Рисунок 10. Общая схема пробоподготовки методом осаждения белков плазмы органическим растворителем.

Помимо удаления белка, добавление органического растворителя в биологическую жидкость может также разрушать связи между аналитом и белками, присутствующими в растворе. В результате полученные концентрации являются общими и эквивалентны сумме концентраций связанных и несвязанных (свободных) молекул [102]. Метод осаждения белков матрицы часто применяется для фармакокинетических исследований, поскольку обладает рядом преимуществ, таких как простота, экспрессность и хорошая воспроизводимость.

Данный метод применим практически к любому виду биологической матрицы. Он может обеспечивать одновременное извлечение нескольких компонентов для последующего анализа, что также является преимуществом данного способа пробоподготовки. Так, авторы статьи [103] разработали метод для одновременного количественного определения полиэтиленгликоля, паклитаксела и пэгилированного паклитаксела в плазме крыс, в котором белки матрицы осаждали ацетонитрилом. Высокая степень извлечения аналитов и низкие пределы количественного определения, показанные на этапе валидации методики, позволяют использовать данный подход при анализе подобных полимеров с неопределенной молекулярной массой в биологических жидкостях. К недостаткам метода осаждения белков относится разбавление образца, которое снижает чувствительность методики (повышает LLOQ) или требует упаривания растворителя для концентрирования, что увеличивает время пробоподготовки. Тем не менее, этот метод наиболее часто используется в лабораторной практике ввиду своей простоты [71].

Метод осаждения белков матрицы часто применим к изучению распределения соединения в различных органах [104,105]. Так, было изучено распределение бисаболангелона, обладающего противоопухолевой, антисептической и противовирусной активностью, в различных органах у

крыс. Несмотря на простоту метода, авторам удалось адаптировать методику для широкого ряда матриц: сердце, печень, селезенка, легкие, почки, матка, яичники, желудок, мозг и мышцы. На этапе пробоподготовки проводили осаждение белков ацетонитрилом. Степень извлечения бисаболангелона составила 100±8%, а нижний предел количественного определения составил 2-4 нг/мл в зависимости от выбранной ткани [106]. Хочется отметить, что для обработки гомогентатов тканей часто недостаточно применять лишь метод осаждения из-за высокого содержания фосфолипидов в некоторых тканях. В работах метод осаждения комбинируют с очисткой обращено-фазовым сорбентом, неорганическими солями [107,108], а также с жидко-жидкостной экстракцией [109].

Метод жидко-жидкостной экстракции (ЖЖЭ) основан на извлечении аналита с помощью соединения двух несмешивающихся жидкостей. Данный способ пробоподготовки находит широкое применение для извлечения липофильных соединений из биологических жидкостей и гомогенатов тканей [70]. Смесь состоит из двух фаз: водной, в качестве которой выступает биологический образец, и органической (экстрагент). Типичная схема обработки образцов методом ЖЖЭ приведена на рисунке 11.

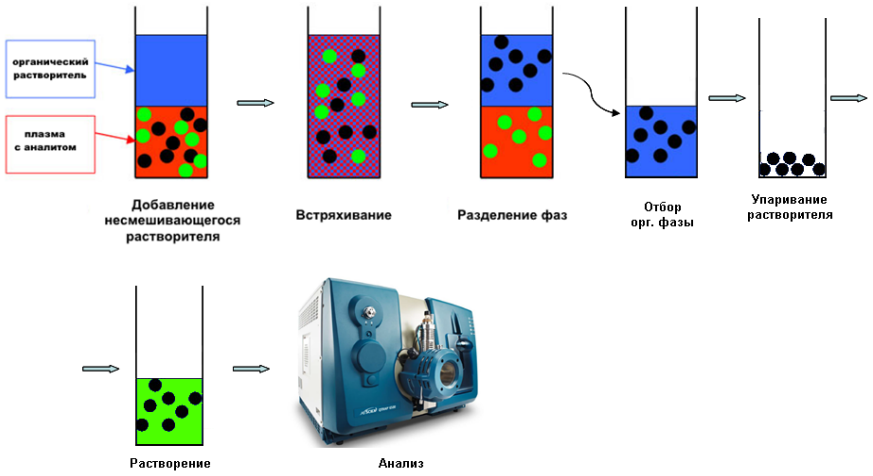


Рисунок 11. Схема пробоподготовки образцов методом жидко-жидкостной экстракции.

В процессе разработки методики пробоподготовки необходимо подбирать растворитель, наиболее полно и селективно извлекающий анализируемое вещество из образца, проверять необходимость в использовании неорганических солей (NaCl, K_2CO_3, $MgSO_4$ и др.) для повышения степени извлечения аналита из образца (эффекта высаливания) [110], а также исследовать влияние буферных добавок на процесс перехода вещества из водной фазы в органическую.

Введение неорганических солей в экстрагент позволяет искусственно создать фазовое разделение между смешивающимися с водой органическими растворителями и водой. В основном добавление электролита (или смеси электролитов) позволяет ослабить или нарушить силы сольватации между биологической матрицей и растворителем. В работе [111] был разработан протокол жидко-жидкостной экстракции с добавлением ацетата аммония к ацетонитрилу. Данный способ обработки плазмы крови крысы позволил наиболее полно извлечь ряд алкалоидов, терпеноидов и флавоноидов по сравнению с методами осаждения, жидко-жидкостной экстракцией, жидко-жидкостной экстракцией с добавлением глюкозы. Авторы отмечают, что введение неорганических солей в классический метод жидко-жидкостной экстракции является успешной стратегией в анализе веществ различной полярности для многокомпонентного лекарственного средства растительного происхождения.

Поскольку для извлечения аналитов по классическому методу ЖЖЭ используются органические растворители, не смешивающиеся с водой, обязательной стадией процесса пробоподготовки будет упаривание экстракта, так как иначе будет невозможно осуществить процесс хроматографического разделения методом ВЭЖХ. Как правило, удаление растворителей проводится в вакуумной центрифуге или в потоке инертного газа. Эта стадия существенно увеличивает общее время пробоподготовки и может приводить к разбросу полученных результатов.

Основными преимуществами метода ЖЖЭ являются возможность селективного извлечения отдельных классов метаболитов (как правило, липофильных), а также возможность концентрирования образца для последующего анализа. Так, в работе [112] для оценки биологической роли оксилипинов (метаболиты окисления жирных кислот) был разработан метод количественного определения в плазме крови человека. Для определения тринадцати оксилипинов в плазме в предварительных испытаниях одним из способов обработки образца был метод жидко-жидкостной экстракции этилацетатом, однако авторы указывают на низкую степень извлечения (40%) в сравнении с обработкой плазмы с помощью твердофазной экстракции.

При определении основного метаболита седативного средства флунитразепама, 7-аминофлунитразепама, использовали экстракцию этилацетатом образцов мочи [113]. Авторы сообщают о высокой степени извлечения аналита и низком пределе количественного определения (0,1 нг/мл), но данные результаты возможны при проведении анализа ВЭЖХ-МС/МС с использованием капиллярной монолитной колонки на этапе хроматографии. При сравнении результатов, полученных другими коллективами с использованием обращено-фазовой хроматографии или введением дополнительной стадии обработки образца методом твердофазной

экстракции, авторы делают акцент на важности условий анализа проб. Поэтому невозможно рассматривать методики обработки биологических образцов изолированно от инструментального метода анализа.

Несмотря на простоту и распространенность на практике, метод жидко-жидкостной экстракции имеет ряд недостатков: низкая или переменная степень извлечения аналита, низкая селективность. Для пробоподготовки требуется большой объем образца, что редко можно обеспечить при проведении биоанализа, а использование большого объема органического растворителя может приводить к образованию эмульсий. Кроме того, с помощью данного метода невозможно извлечь гидрофильные молекулы из матрицы [114,115]. Из-за специфического извлечения липофильных веществ, при обработке таких матриц как цельная кровь, плазма, мозг, легкие, печень происходит извлечение большого количества фосфолипидов, которые подавляют ионизацию веществ при проведении анализа методом ВЭЖХ-МС/МС с ионизацией электрораспылением. Другой особенностью метода ЖЖЭ, которую можно отнести к его недостаткам, является зависимость процесса экстракции от большого количества факторов проведения эксперимента, таких как влияние pH биоматрицы, температуры образца при пробоподготовке, времени его обработки и т.д.

В последнее время для обработки биологических образцов набирает популярность метод твердофазной экстракции (ТФЭ) с использованием специальных одноразовых картриджей или планшетов, заполненных силикагелем или специальной фазой. Принцип твердофазной экстракции основан на очистке образца методом колоночной хроматографии: образец наносят на сорбент, промывают и элюируют через картридж (рис. 12). Таким образом, примеси, находящиеся в образце, элюируются с картриджа при промывке или задерживаются на сорбенте. Объем картриджа и тип сорбента может быть подобран в соответствии с решаемой задачей. В зависимости от объема и состава пробы, можно подобрать подходящий сорбент картриджа, начиная от обращенной фазы C8/C18, органических сополимеров на основе стирола/дивинилбензола, силикагеля, модифицированного полярными функциональными группами, такими как амино-, диол- или циано-группы, ионобменных фаз, как катионных, так и анионных, заканчивая аффинными сорбентами, такими как иммуноадсорбенты и молекулярные импринтированные полимеры (MIPs) [116–118].

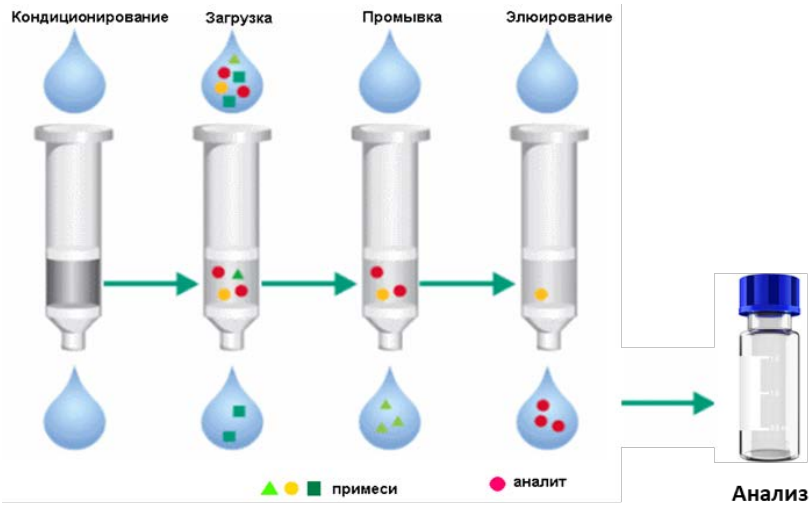


Рисунок 12. Схема пробоподготовки образцов с использованием картриджей для ТФЭ.

В настоящее время данный метод пробоподготовки пользуется большой популярностью в лабораторной практике, поэтому увеличение объемов производства способствует снижению их стоимости. Метод ТФЭ, как правило, более эффективен по сравнению с жидко-жидкостной экстракцией, поскольку достаточно прост в использовании и позволяет обеспечить количественное извлечение вещества. Картриджи чаще всего используют для обработки жидких образцов и экстрагирования нелетучих аналитов. Это коммерчески доступный продукт, который легко можно подобрать под конкретную аналитическую задачу [119,120].

При этом данный вид пробоподготовки возможно автоматизировать. Одной из коммерческих систем ТФЭ-ВЭЖХ является Symbiosis производства Spark Holland, Нидерланды [121,122]. Она включает в себя блок автосамплера, бинарный насос, автоматизированный блок с картриджами ТФЭ, оснащенный двумя насосами подачи растворителей под давлением и комбинированные клапанные системы для направления растворителей (рис. 13). В начале каждого цикла в блок загружаются картриджи для ТФЭ. После этапа кондиционирования и уравновешивания картриджа водным раствором, исследуемый образец наносится на картридж и промывается водным раствором. Затем образец с картриджа элюируется органическим растворителем на хроматографическую колонку и определяется с помощью масс-спектрометрии. На этапе элюирования образца с первого картриджа ТФЭ, следующий образец наносится на новый картридж. Таким образом, параллельном цикле работы установки для очистки образцов, сокращается время, требующееся для пробоподготовки.

Рисунок 13. Установка ТФЭ-ВЭЖХ, оснащенная блоком автосамплера, бинарным насосом и автоматизированным блоком с картриджами ТФЭ.

Проводя пробоподготовку с использованием ТФЭ, можно избежать многих проблем, таких как неполное разделение фаз, неполное извлечение вещества, необходимость в использовании большого количества органических растворителей, с которыми приходится сталкиваться, используя метод жидко-жидкостной экстракции.

При разработке аналитической методики не всегда возможно использовать наиболее простой метод экстракции, такой как метод осаждения белков матрицы или ЖЖЭ. В работе [69] 4'-циано-2'-дезоксиинозин (SK14-061a) – аналог инозина – лекарственного препарата против вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1), определяли в крысиной плазме методом ВЭЖХ/МС-МС. В качестве метода экстракции был сделан выбор в пользу ТФЭ, поскольку метод осаждения метанолом или ацетонитрилом не обеспечивал наиболее полное извлечение ксенобиотика. Использование метода ТФЭ позволило удалить большую часть эндогенных соединений из плазмы крови и селективно экстрагировать вещество. Степень извлечения 4'-циано-2'-дезоксиинозина составила 92,4±10,9%, что указывает на применимость данного метода.

При определении N-[2-(4-гидроксифенил)этил]-2-(2,5-диметоксифенил)-3-(3-метокси-4-гидроксифенил) акриламида, проявившего физиологическую активность против болезни Паркинсона, в плазме крови и моче человека сравнивали метод осаждения белков и картриджи ТФЭ. Поскольку при осаждении белков матрицы органическим растворителем матричный эффект был выше, в качестве метода пробоподготовки образца плазмы и мочи человека был выбран ТФЭ.

Данный метод обеспечивал эффективное удаление компонентов матрицы по сравнению с методом осаждения [123].

Метод твердофазной экстракции с течением времени становится более предпочтительным для исследователей, потому что лишен ограничений в используемых сорбентах и аналитах. Область современных исследований экстракции образцов фактически смещается в сторону ТФЭ. На базе данного метода становится возможным создание унифицированных методов очистки и экстракции биологических образцов.

Одной из вариаций метода твердофазной экстракции тканей является использование планшетов типа Ostro. Ostro представляет собой 96-луночный планшет, заполненный сорбентом для очистки образцов от белков и фосфолипидов. Планшет помещают над пробирками типа Эппендорф. Образцы биологической матрицы (цельная кровь, плазма крови, сыворотка) помещают в 96-луночный планшет (рис. 14), добавляют 1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле в соотношении 1:3, перемешивают пипетированием или с помощью шейкера. Образцы пропускают через мембрану планшета под давлением, полученный фильтрат анализируют [124].

Рисунок 14. 96-луночный планшет Ostro, Waters.

Главным преимуществом процедуры твердофазной экстракции с помощью планшетов Ostro является то, что этот продукт является готовым решением, которое не требует оптимизации. Метод позволяет выполнять пробоподготовку в полуавтоматическом режиме, при этом он подходит для количественного определения фосфолипидов, в частности фосфатидилхолинов (ФХ) и лизофосфатидилхолинов (ЛизоФХ), в тканях. В сравнении с жидко-жидкостной экстракцией метод Ostro позволяет уменьшить объем требуемого образца и избежать эмульгирования при извлечении фосфолипидов [125].

Обработка образцов с применением 96-луночных планшетов является более экспрессной, в сравнении с картриджами для ТФЭ, поскольку не требует кондиционирования. Примером может служить исследование De Baere и соавт. [126], в котором определяли содержание гамитромицина в плазме крови и тканях легких. С применением планшетов Oasis Ostro^{TM} или HybridSPE-Phospholipid SPE была разработана методика количественного анализа вещества, которая по сравнению с процедурами пробоподготовки с использованием ТФЭ, занимала гораздо меньше времени. Авторы отмечают, что уделили особое внимание скорости, потому что для дальнейшего исследования фармакокинетики необходима обработка большого количества образцов.

Для увеличения степени извлечения аналита из образца и удаления фосфолипидов часто используют неорганические соли, такие как хлорид и цитрат натрия, сульфат магния, ацетат аммония. Совместно с высаливанием используют полярные органические растворители, совместимые с ВЭЖХ-МС/МС, такие как ацетонитрил, изопропанол, ацетон. Несмотря на то, что они хорошо смешивается с водой, существуют методы разделения раствора на два слоя при добавлении солей и/или другого органического растворителя [127]. Такой метод получил достаточно широкую популярность ввиду достаточно низкой стоимости и высокой эффективности при анализе широкого ряда метаболитов. Он нашел применение в пробоподготовке тканей, а одна из его модификаций получила название QuEChERS (кэтчерс) - Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe (Быстро, Просто, Дёшево, Эффективно, Надежно и Безопасно). Данный метод изначально был разработан для анализа остатков различных пестицидов во фруктах, овощах, зерновых культурах и продуктах их переработки [128], однако в дальнейшем он нашел широкое применение в лабораторной практике для пробоподготовки различных образцов, в том числе биологических. В работе Дерванда и соавторов [129] была продемонстрирована применимость метода для допинг-контроля широкого ряда агентов и их метаболитов в моче. В стандартном протоколе используют метод жидко-жидкостной экстракции метил-трет-бутиловым эфиром или этилацетатом, которые не позволяют добиться наиболее полной степени извлечения гидрофильных веществ. Использование процедуры QuEChERS позволило извлечь более 90% аналитов, в том числе стабилизатор HIF FG-4592, бензоилэкгонин, фуросемид, а также станозолол-глюкурониды, которые не удавалось извлечь методом ЖЖЭ.

Метод позволяет извлекать из проб целевые аналиты и удалять мешающие вещества, такие как органические кислоты, липиды, пигменты, сахара. Процедура обработки образца методом QuEChERS включает в себя последовательные стадии высаливания и твердофазной очистки биологического образца. Метод обеспечивает высокую степень извлечения для широкого спектра

химических соединений, а конечный экстракт растворен в ацетонитриле и пригоден для анализа методом ВЭЖХ. В литературе упоминается о данном методе пробоподготовки для анализа ксенобиотиков разной природы в биологических жидкостях [130,131] и тканях [132]. При этом метод активно используется в ранней разработке лекарственных препаратов [133] и токсикологии [134]. Приведенные данные позволяют рассматривать метод QuEChERS как перспективный способ пробоподготовки биологических образцов для решения различных задач в области биоанализа.

1.2.3. Современные методы микроэкстракции

Развитие нанотехнологий, в частности наносорбентов, позволило расширить возможности и границы применения метода твердофазной экстракции (рис. 15). Большинство современных методов микроэкстракции основано на принципах взаимодействия с сорбентом. Применение новых сорбентов, развитие методов микроэкстракции биологических образцов обусловлено не только увеличением экстракционных характеристик (высокая степень извлечения, специфичность, селективность), но и минимизацией органических растворителей для обеспечения экологичного подхода [135,136]. Поиск новых сорбентов для твердофазной экстракции и переход к платформам, позволяющим уменьшить время обработки биологических образцов, является современным вызовом.

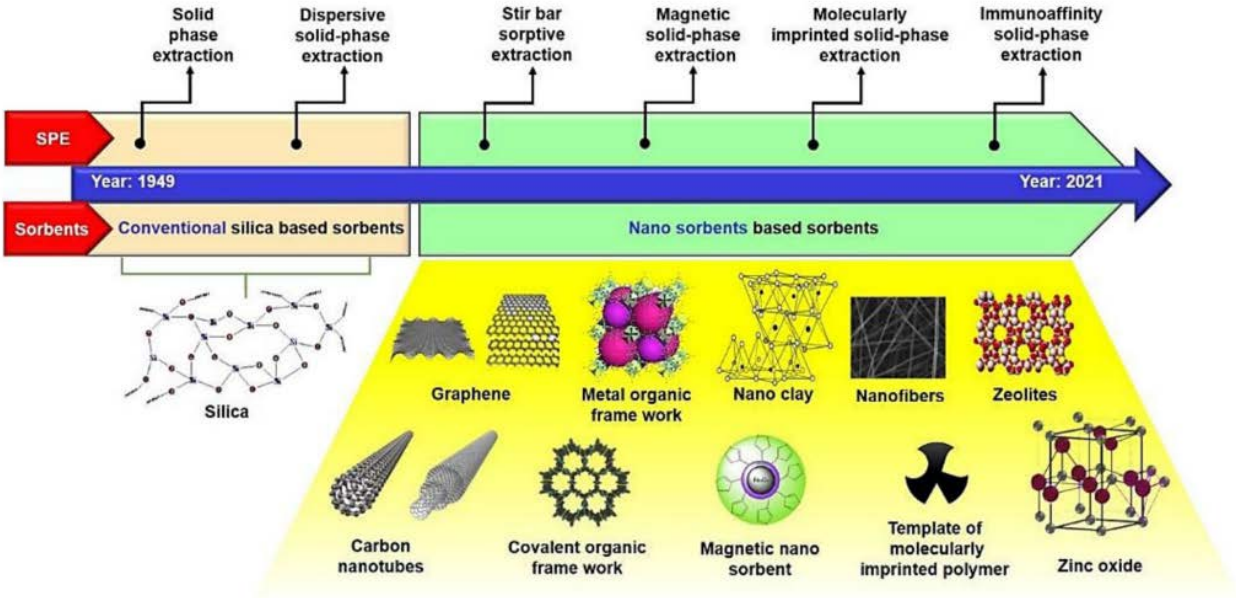


Рисунок 15. Эволюция наносорбентов и развитие методов ТФЭ. Адаптировано из [137].

Переход к методам микроэкстракции являлся сложным этапом модификации метода твердофазной экстракции. К сорбентам предъявляются высокие требования, такие как

практичность, эффективность, увеличенная площадь поверхности соприкосновения с образцом, стабильность. Наноматериалы были широко исследованы в качестве новых сорбентов для ТФЭ, и это позволило перейти на следующий этап развития методов пробоподготовки. Сорбенты нового поколения обладают высокой степенью адсорбции и удельной площадью поверхности, возможностью многократного использования [138]. При этом в качестве сорбентов для пробоподготовки они показали себя селективными и позволили эффективно отделять определяемые компоненты от матрицы. Наноматериалы разнообразны по размеру и поверхностным свойствам частиц, что позволяет подобрать наиболее подходящий сорбент.

В недавних обзорах [137,139–142] сообщалось о тенденциях развития и применения новых функциональных материалов в биоанализе. Различные наночастицы с разным составом и морфологией используют в качестве сорбентов для пробоподготовки с целью очистки и концентрирования анализируемого вещества. К наиболее популярным наночастицам и нанокомпозитам относят молекулярные импринтинговые полимеры (МИП), оксиды металлов и неметаллов и их производные, графен, оксид графена и их модификации, углеродные нанотрубки, металл-органические координационные полимеры (МОФы), магнитные частицы (рис. 16).

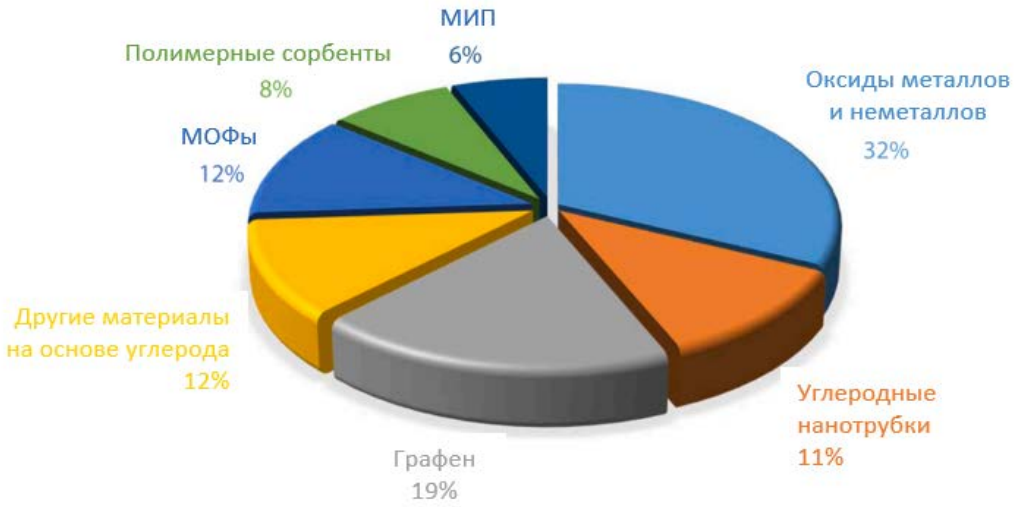


Рисунок 16. Частота применения каждой из групп сорбентов в твердофазной микроэкстракции. Адаптировано из [139].

Одним из ярких примеров служит разработка новых сорбентов на основе графена и оксида графена. Оксид графена наиболее широко используется в качестве сорбента, поскольку содержит карбоксильные и гидроксильные функциональные группы, позволяющие обратимо взаимодействовать с аналитом, обладает высокой дисперсностью в воде по сравнению с графеном,

большой площадью и универсальной модификацией поверхности [139,141]. Коллектив авторов из Китая разработал сорбенты на основе модифицированного графена и оксида графена [143]. Авторы отмечают, что сорбенты являются универсальными и высокоэффективными для твердофазной экстракции. Они могут быть использованы для широкого спектра аналитов: от малых молекул до макромолекул, таких как белки. Благодаря разной полярности графена и оксида графена, сорбент можно эффективно использовать для нормально-фазовой и обращенно-фазовой экстракции, что расширяет границы применения экстракции.

Помимо разработки различных сорбентов для твердофазной экстракции, существуют платформы, которые позволяют не только очищать и концентрировать образец, но и хранить в течение времени. Метод сухого пятна крови (Dried Blood Spot, DBS) является одним из методов микроэкстракции и был разработан в 1963 году Гатри и Сузи как альтернативный способ проведения анализов при неонатальном скрининге [144]. Изначально метод заключался в нанесении нескольких капель капиллярной крови, взятых из пятки или пальца ребенка, на специальную фильтровальную бумагу в формате карты. В отличие от приготовления плазмы из цельной крови, данный метод позволяет получить образец, готовый к пробоподготовке в краткие сроки (рис. 17А). Образцам просто дают высохнуть на воздухе без обработки, после чего их можно хранить в течение нескольких недель (пример карты с нанесенными пятнами крови представлен на рис. 17Б). Первоначально эти карты были созданы для анализа аминокислот.

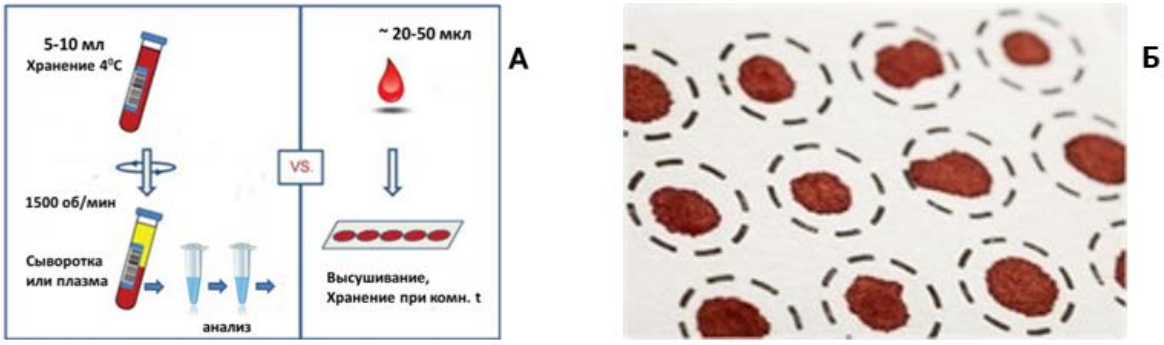


Рисунок 17. Сравнение схемы обработки цельной крови и получения сухого пятна крови (А); образцы крови, нанесенные на бумажный носитель (Б).

С 90-х годов прошлого века исследователи начали применять метод сухого пятна крови в качестве пробоподготовки биологических образцов в сочетании с масс-спектрометрическими методами анализа. Интерес к сбору и обработке образцов на бумажных карточках постоянно растет из-за того, что для анализа требуется 20-50 мкл образца. В настоящее время данный подход

применяется для анализа различных биологических матриц, таких как кровь, плазма, моча, слюна, обобщая технологию термином «сухие пятна матрицы» (dried matrix spot, DMS) [145].

Преимущество данного метода заключается в том, что аналиты, будучи адсорбированными на твердофазном носителе – целлюлозе, – не подвергаются воздействию ферментов, а белки биоматрицы необратимо адсорбируются и не оказывают мешающего влияния на анализ. Тем не менее, некоторые соединения нестабильны в биологических жидкостях, таких как кровь, плазма, моча, слюна и требуют определенной обработки для предотвращения деградации анализируемого вещества [146].

Известно, что состав крови может оказывать влияние на степень извлечения вещества, что необходимо учитывать при разработке методов анализа с использованием сухих пятен крови. В частности, при использовании сухих пятен крови для пробоподготовки важно проверять влияние гематокрита на результат анализа. Однако связь между уровнем гематокрита и степенью извлечения аналита не была установлена в ряде исследований. Например, при исследовании извлечения различных аналитов с карт DBS различных производителей, использующих кровь с разным уровнем гематокрита, корреляция не была выявлена [147]. Для минимизации влияния гематокрита на результаты анализа рекомендуется проводить анализ целого пятна крови. Это подтверждено исследованием авторов работы [148], которые показали, что при анализе образцов, взятых из центральной части пятна крови и с его края, получаются разные результаты. Таким образом, для получения более точных и воспроизводимых результатов необходимо анализировать пятно крови целиком.

Анализ препаратов для терапевтического мониторинга лекарственных средств обычно проводится на сыворотке или плазме венозной крови. Применение метода сухого пятна крови значительно облегчает задачу: он позволяет проводить анализ быстрее и с большим комфортом для пациента, поскольку процедура отбора крови является минимально инвазивной и заключается в проколе пальца и самостоятельном сборе капель крови на карту. Это облегчает отбор крови как у детей, так и у взрослых в домашних условиях, хотя для сбора таких образцов необходимо тщательно соблюдать инструкцию. Образцы DMS могут рассматриваться как альтернативный метод анализа венозной крови. В перспективе с помощью метода сухого пятна могут быть проведены аналогичные исследования плазмы или контроля гематокрита [149]. Несмотря на широкое распространение данного подхода как в клинической практике, так и в исследовательской деятельности, в литературе нет сведений о применении DMS для анализа малых молекул в

гомогенатах тканей в рамках доклинических исследований. При этом сообщается, что DMS используют для анализа образцов мозга в ветеринарных целях [150].

Таким образом, анализ литературы показал, что метод DMS обладает привлекательностью для применения в биоаналитических методиках. При разработке методик анализа с применением данного метода были выявлены его основные преимущества и недостатки. К преимуществам метода можно отнести его простоту и скорость процедуры пробоподготовки, необходимость минимальных количеств биологической матрицы (как правило, для анализа используется 20-50 мкл крови или плазмы) и растворителя, доступность метода (низкая стоимость расходных материалов), возможность автоматизации пробоподготовки. Недостатками DMS являются необходимость использования высокочувствительного метода детекции для определения низких концентраций веществ, а также влияние многих факторов на выход вещества при пробоподготовки (состав крови, площадь пятна крови и др.).

Метод твердофазной экстракции на целлюлозном носителе (fabric phase sorptive extraction, FPSE, рис. 18) – относительно новый способ обработки образцов. Носитель представляет собой ткань из хлопка, полиэстера или стекловолокна, покрытую высокоэффективным гелем – сорбентом, поверхность которого может быть дополнительно модифицирована. Пористая структура геля и проникающая способность тканевой подложки позволяют пропускать растворы, содержащие аналиты с их последующим извлечением. Существует более 30 различных сорбентов для экстрагирования неполярных, среднеполярных, полярных аналитов, органических кислот, белков, пептидов и т.д. Метод FPSE отличается высокой степенью извлечения (96% для неполярных и среднеполярных аналитов). Обработка образца, нанесенного на целлюлозный носитель, требует малого количества органического растворителя, что говорит об экологичности данного метода [151]. К недостаткам этого метода относятся длительность пробоподготовки и малое количество получаемого надосадочного раствора [67].

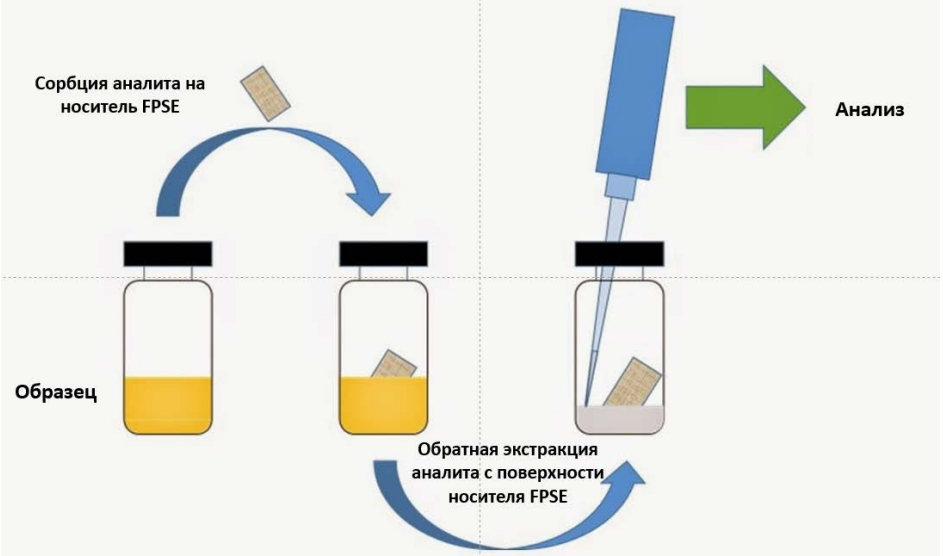


Рисунок 18. Схема пробоподготовки методом твердофазной экстракции с использованием целлюлозного носителя.

Данный метод позволяет одновременно определять несколько веществ, что ускоряет пробоподготовку образцов и не требует разработки методик для каждого вещества отдельно. Например, метод FPSE использовали для одновременной экстракции и анализа образцов плазмы и мочи человека, содержащей двенадцать азольных остатков противомикробного препарата. Разработанный протокол позволил унифицировать способ обработки образцов для широкого спектра соединений в двух представленных матрицах с использованием диодно-матричного детектора, что говорит о высокой воспроизводимости и степени извлечения данного метода твердофазной экстракции [152]. Метод FPSE позволяет одновременно извлекать и концентрировать широкий спектр соединений непосредственно из цельной крови или разбавленной цельной крови, минуя стадию фильтрации или осаждения белков матрицы [153].

Метод применим не только к биологическим жидкостям, но и используется в контроле пищевой промышленности. Для одновременного извлечения остатков триамфеникола – высокополярных антибиотиков (хлорамфеникол, флорфеникол, тиамфеникол) - из сырого молока использовали методику с применением твердофазной экстракции на целлюлозном носителе. Данный способ пробоподготовки был выбран во избежание возникновения систематической ошибки при обработке образца методом осаждения белков [154].

В работе [155] была разработана методика количественного анализа парабенов в тканях молочной железы человека. Было обнаружено, что среди всех протестированных мембран FPSE наивысшая эффективность экстракции достигается при модификации покрытия целлюлозной

ткани золь-гелем политетрагидрофурана. В этом случае степень извлечения соединений составляет около 70%. Метод для контроля содержания парабенов в биологических жидкостях (цельная кровь, плазма, моча) человека так же был разработан с применением метода FPSE. Стоит отметить, что анализ проводили с использованием ВЭЖХ-УФ, что демонстрирует высокую экстракционную способность.

1.3. Заключение по обзору литературы

Прогресс в инструментальных методах и способах обработки биологических образцов за последние десятилетия существенно расширил возможности доклинических исследований лекарственных препаратов. Высокая чувствительность масс-спектрометрического анализа позволила проводить фармакокинетические испытания с использованием минимальных доз, что помогает избежать острых токсических эффектов в экспериментах с животными. Развитие спектроскопии ЯМР, масс-спектрометрии высокого разрешения и математического моделирования дает возможность предсказывать и подтверждать образование метаболитов новых препаратов, а также изучать их влияние на организм на ранних этапах исследования.

Анализ литературных данных показал, что определение ксенобиотиков в биологических образцах остается сложной задачей. Кровь, плазма крови, а также органы, как биологическая матрица, обладают высокой неоднородностью структуры и состава. Разнообразие методов пробоподготовки биологических жидкостей и тканей позволяет выбирать оптимальные подходы для извлечения анализируемых веществ. Для успешного проведения количественного анализа веществ в органах важно правильно подобрать метод гомогенизации тканей и оптимизировать процедуры их извлечения, обеспечивая приемлемую селективность и достаточную чувствительность методики. Выбор метода обработки матрицы определяется не только показателями LLOQ и степенью извлечения, но и целями исследования, для которого разрабатывается методика, а также удобством обработки образцов.

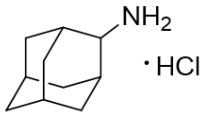
Разработка биоаналитических методик играет важную роль в анализе фармацевтических препаратов в тканях и биологических жидкостях, поскольку позволяет улучшить понимание их фармакологических свойств и безопасности. Современные методы обработки биологических образцов и инструментальные методы анализа с высокой чувствительностью позволяют проводить детальное исследование новых препаратов, что способствует выявлению потенциальных побочных эффектов и снижению риска их проявления еще на стадии доклинических исследований.

Глава 2. Обсуждение результатов

2.1. Исследование противовирусного агента камфецина

2.1.1. Оптимизация методики пробоподготовки сухих пятен крови

Ранее была разработана методика количественного определения камфецина в цельной крови крыс с применением ВЭЖХ-МС/МС и метода сухого пятна крови в диапазоне 50-2500 нг/мл [7]. В данной методике сухие пятна крови экстрагировали ацетонитрилом с добавлением 2-Ad в качестве внутреннего стандарта (рис. 19), а степень извлечения камфецина составляла менее 2%.



2-Ad
(внутренний стандарт)

Рисунок 19. Структурная формула гидрохлорида 2-адамантиламина (2-Ad, внутренний стандарт).

Использование чувствительного масс-спектрометра, такого как AB SCIEX 6500 QTRAP, нивелировало низкую степень извлечения аналита и позволило валидировать методику. Для анализа экстракт разбавляли водой в соотношении 1:9, поскольку при анализе образца, растворенного в чистом ацетонитриле, аналит и внутренний стандарт частично элюируются в области мертвого объема хроматографической колонки с обращенно-фазовым сорбентом. На рис. 20 приведены хроматограммы извлеченного ионного тока (XIC) камфецина и внутреннего стандарта. При приготовлении и анализе смеси камфецина и 2-Ad в ацетонитриле на хроматограммах появились два пика при 1,8 мин для обоих веществ (рис. 20 А, В), что свидетельствует об их элюировании в мертвом объеме хроматографической колонки. Оставшаяся часть обоих веществ элюируется при их нормальном времени удерживания в данных хроматографических условиях (4,6 и 4,7 мин для камфецина и 2-Ad, соответственно). Такой эффект, по-видимому, связан с высокой элюирующей способностью ацетонитрила по отношению к анализируемым веществам. Необходимость разбавления пробы приводила к повышению нижнего предела количественного определения камфецина и проведению дополнительной операции, которая увеличивала время обработки образцов.

В настоящей работе было обнаружено, что при приготовлении раствора камфецина и 2-Ad в метаноле и при использовании этого растворителя в качестве элюента Б подвижной фазы, оба вещества удерживаются на обращенно-фазовом сорбенте хроматографической колонки (рис. 20 Б, Г). На основании этого была проведена оптимизация методики пробоподготовки биологических

образцов как сухих пятен, так и плазмы крови, содержащих камфецин, а в качестве экстрагента был использован метанол.

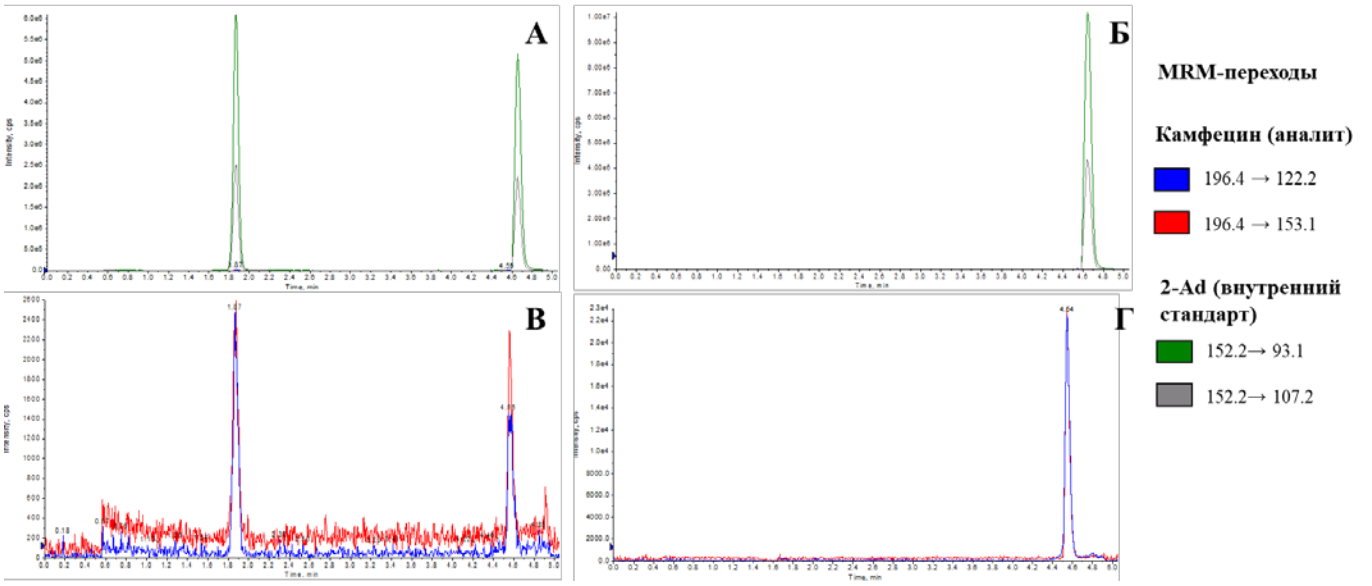


Рисунок 20. Хроматограммы извлеченного ионного тока (XIC) для 2-Ad (внутренний стандарт, 10 мкг/мл, А, Б) и камфецина (аналит, 10 нг/мл, В, Г) в ацетонитриле (А и В соответственно) и в 0,1% растворе муравьиной кислоты в метаноле (Б и Г соответственно).

Для проверки применимости модифицированного метода были приготовлены и проанализированы образцы сухих пятен крови, содержащие камфецин в диапазоне концентраций 2-2000 нг/мл. В результате анализа этих образцов была построена градуировочная зависимость во всем диапазоне концентраций, которая описывается уравнением Хилла (генерируется по встроенному алгоритму программы обработки хроматограмм MultiQuant): $y = \frac{0{,}537 + 0{,}695 \cdot x^{0{,}966}}{3710 + x^{0{,}966}}$ (рис. 21). Точность построенной градуировочной зависимости составила от 91 до 110%, а коэффициент детерминации составил 0,999.

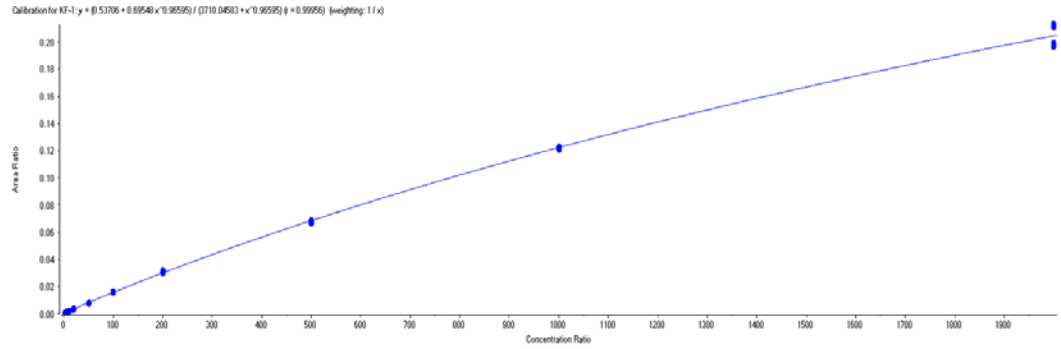


Рисунок 21. Градуировочная зависимость для количественного определения камфецина в образцах сухих пятен крови в диапазоне 2-2000 нг/мл.

Таким образом, изменение экстрагента позволило исключить этап разбавления образца водой, что ускорило процесс пробоподготовки. Кроме того, было обнаружено, что применение 0,1% раствора муравьиной кислоты в метаноле увеличивает степень извлечения камфецина до 10%, что в пять раз превышает значение степени извлечения ранее разработанной и опубликованной методики. Построенная градуировочная зависимость позволила подтвердить применимость методики для дальнейшего анализа камфецина в сухих пятнах крови в широком диапазоне концентраций.

2.1.2. Исследование стабильности камфецина в сухих пятнах крови

Оптимизированная методика экстракции камфецина из сухих пятен крови была применена для исследования стабильности образцов, которую изучали на образцах с низкой (10 нг/мл), средней (100 нг/мл) и высокой (1000 нг/мл) концентрациях вещества в цельной крови. Образцы хранили в течение 28 дней при комнатной температуре (+24°C), в бытовом холодильнике (+4°C), в морозильной камере (–12°C) и низкотемпературной морозильной камере (–70°C). Расчет концентраций камфецина проводили относительно свежеприготовленных образцов с использованием построенной градуировочной зависимости.

При хранении образцов при комнатной температуре наблюдается быстрое снижение содержания камфецина во всем диапазоне концентраций. Более того, для образцов, содержащих 10 нг/мл вещества, снижение содержания вещества более чем на 15 % происходит уже через неделю после их приготовления (рис. 22А). Для образцов сухих пятен, содержащих 100 нг/мл и 1000 нг/мл камфецина, наблюдается снижение наблюдаемой концентрации на 12% и 8% через 7 дней соответственно, а потеря более 15% вещества в этих образцах происходила примерно через 8 и 12

дней, соответственно. Полученные результаты свидетельствуют о том, что образцы необходимо анализировать в достаточно короткие сроки (до 4 дней) при хранении или транспортировке без охлаждения. Снижение концентрации камфецина в образцах сухих пятен при температуре +24˚С, по нашему предположению, обусловлено возможной десорбцией вещества из-за его достаточно высокой летучести, так как одним из свойств камфецина является его способность к сублимации. Также нельзя исключать возможность окисления вещества с образованием соответствующих продуктов. Вероятно, оба процесса протекают параллельно, однако данный вопрос требует изучения.

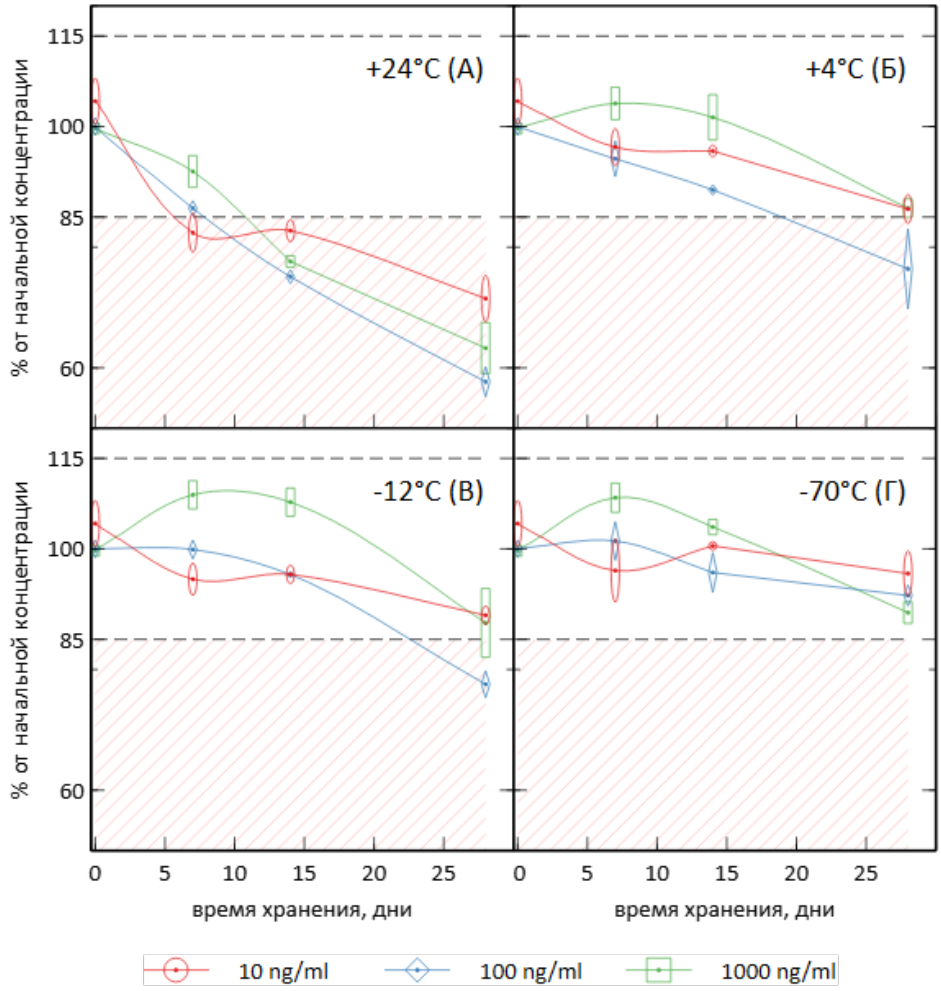


Рисунок 22. Процент от начальной концентрации камфецина в сухих пятнах крови (n=4), хранившихся в течение 28 дней при комнатной температуре (+24˚С, А), в холодильнике (+4˚С, Б), в морозильной камере бытового холодильника (-12˚С, В), при -70˚С (Г).

При хранении образцов в бытовом холодильнике (+4˚С) наблюдается снижение скорости их деградации по сравнению с хранением при комнатной температуре: потеря 15% от

первоначального количества наблюдается через 2 недели (рис. 22Б) для образцов, содержащих камфецин в концентрации 10 нг/мл и 100 нг/мл. Для образцов, содержащих вещество в концентрации 1000 нг/мл, снижение концентрации через 14 дней составила около 5 %, что является допустимой погрешностью при анализе. Через 28 дней после приготовления уровень концентрации камфецина достиг 85% от исходного значения. Таким образом, использование бытового холодильника позволяет значительно увеличить срок хранения образцов сухих пятен крови, который может достигать 4 недель для образцов с относительно высокими концентрациями. Тем не менее, мы полагаем, что данные условиях хранения будут недостаточными для точного определения камфецина в образцах с неизвестным уровнем концентрации.

Использование морозильной камеры бытового холодильника при хранении образцов сухих пятен крови снижает тенденцию к падению концентрации. При хранении образцов в течение 14 дней при температуре –12°C практически не наблюдалось потери вещества (рис. 22В). Тем не менее, с течением времени вещество также десорбируется, что приводит к снижению его концентрации в образцах, поэтому анализ образцов через 28 дней хранения, скорее всего, приведет к некорректным результатам.

Глубокая заморозка сухих пятен крови, содержащих камфецин, при температуре –70°C позволяет хранить образцы в течение 4 недель и корректно определять аналит во всем диапазоне концентраций. Анализ образцов показал, что в течение этого срока хранения снижение содержания концентрации камфецина в образцах не превышало 10% во всем диапазоне концентраций (рис. 22Г).

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что для получения корректных данных образцы камфецина в сухих пятнах крови лучше всего анализировать сразу после приготовления. В случае, когда невозможно провести анализ в течение 3-5 дней или требуется длительная транспортировка образцов, их следует хранить в условиях глубокой заморозки при температуре –70°C не более 1 месяца.

2.1.3. Разработка и валидация методики анализа камфецина в плазме крови

Биоаналитические методики применяются на практике для количественного анализа веществ не только в цельной крови, но и плазме и сыворотке крови. Это обусловлено тем, что плазму и сыворотку крови можно получить в достаточно больших количествах, например, при клинических исследованиях на людях, и хранить полученные образцы в течение длительного времени. В связи с этим, важно иметь в арсенале аналитических методов также условия

пробоподготовки и анализа веществ в этих матрицах. Также, помимо изучения фармакокинетики вещества с использованием плазмы крови, количественный анализ ксенобиотиков в этой матрице может быть использован, например, для изучения распределения его между компонентами крови (форменными элементами и плазмой), что было задачей данного исследования.

На первом этапе разработки методики пробоподготовки образцов плазмы крови были оценены 4 способа: метод осаждения белков органическим растворителем, метод сухого пятна крови (DBS), твердофазная экстракция оксидом алюминия, метод твердофазной экстракции на целлюлозном носителе (FPSE). После анализа методом ВЭЖХ-МС/МС и сравнения площадей пиков камфецина было обнаружено, что все методы обработки матрицы дают относительно одинаковые результаты по извлечению вещества из плазмы крови. Исходя из этого, в данном случае был выбран наиболее простой и быстрый метод пробоподготовки – осаждение белков.

При выборе растворителя для осаждения белков матрицы были выбраны метанол, ацетонитрил и этих же растворителях, содержащих муравьиную кислоту, которая может способствовать увеличению степени извлечения вещества из биологической матрицы. При сравнении площадей пиков камфецина и внутреннего стандарта наибольшие площади с лучшей воспроизводимостью показало осаждение плазмы 0,1% раствором муравьиной кислоты в метаноле (рис. 23).

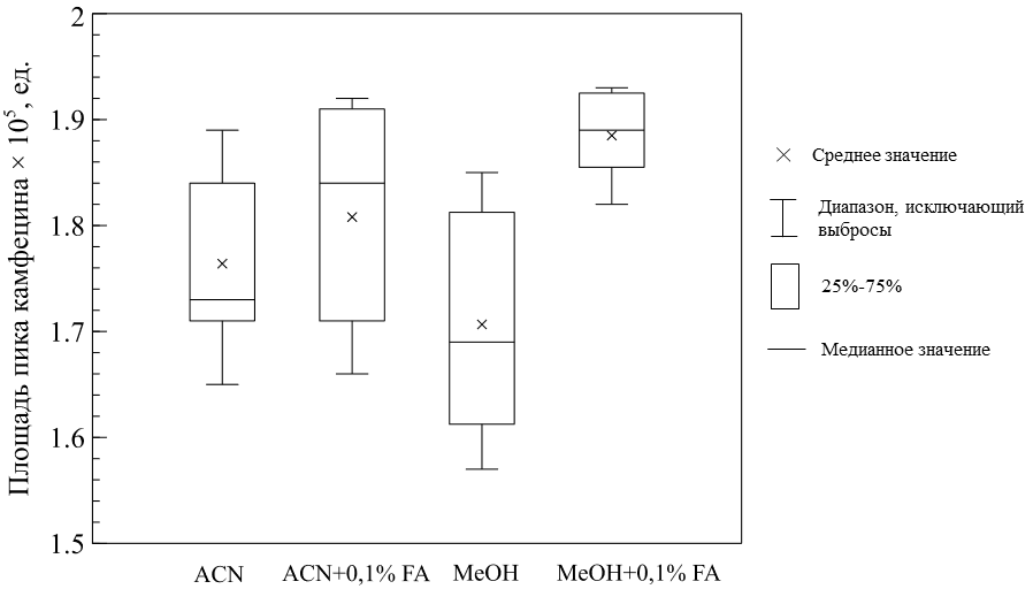


Рисунок 23. Диаграмма значений площади пика камфецина после осаждения органическими растворителями (n=4).

После выбора оптимального растворителя для осаждения белков плазмы была приготовлена, обработана и проанализирована серия градуировочных образцов, содержащих

камфецин в диапазоне 5-5000 нг/мл. Концентрация внутреннего стандарта (2-Ad) в растворе (0,1% муравьиная кислота в метаноле) составляла 1000 нг/мл. При построении градуировочной зависимости площади пика камфецина от его концентрации в плазме без учета внутреннего стандарта была выбрана зависимость, описываемая уравнением Хилла [156]. Использование уравнения Хилла позволяет построить градуировочную зависимость в широком диапазоне концентраций, так как линейная зависимость описывает только точки в диапазоне 5-1000 нг/мл в допустимых пределах погрешности (±20% для LLOQ и ±15% для остальных точек градуировочной зависимости). По-видимому, в области высоких значений концентрации, изменяется степень ионизации вещества и/или изменяется линейность отклика детектора и, следовательно, изменяется угол наклона прямой.

В предварительных экспериментах был проведен подбор наиболее оптимальной концентрации внутреннего стандарта. Были приготовлены, обработаны и проанализированы градуировочные образцы, содержащие камфецин в диапазоне 5-5000 нг/мл. Для поиска оптимальной концентрации внутреннего стандарта в эксперименте использовали 2-Ad со значениями концентрации 1, 5 и 10 мкг/мл. На основании полученных данных нами был выбран рабочий раствор с концентрацией 10 мкл/мл для проведения пробоподготовки образцов плазмы крысы, содержащих камфецин.

Разработанную методику количественного определения камфецина в плазме крови крысы валидировали по параметрам, приведенным в разделе 3.4. Селективность методики была продемонстрирована на холостом образце плазмы и образцах плазмы, содержащих камфецин в концентрации 500 нг/мл (рис. 24).

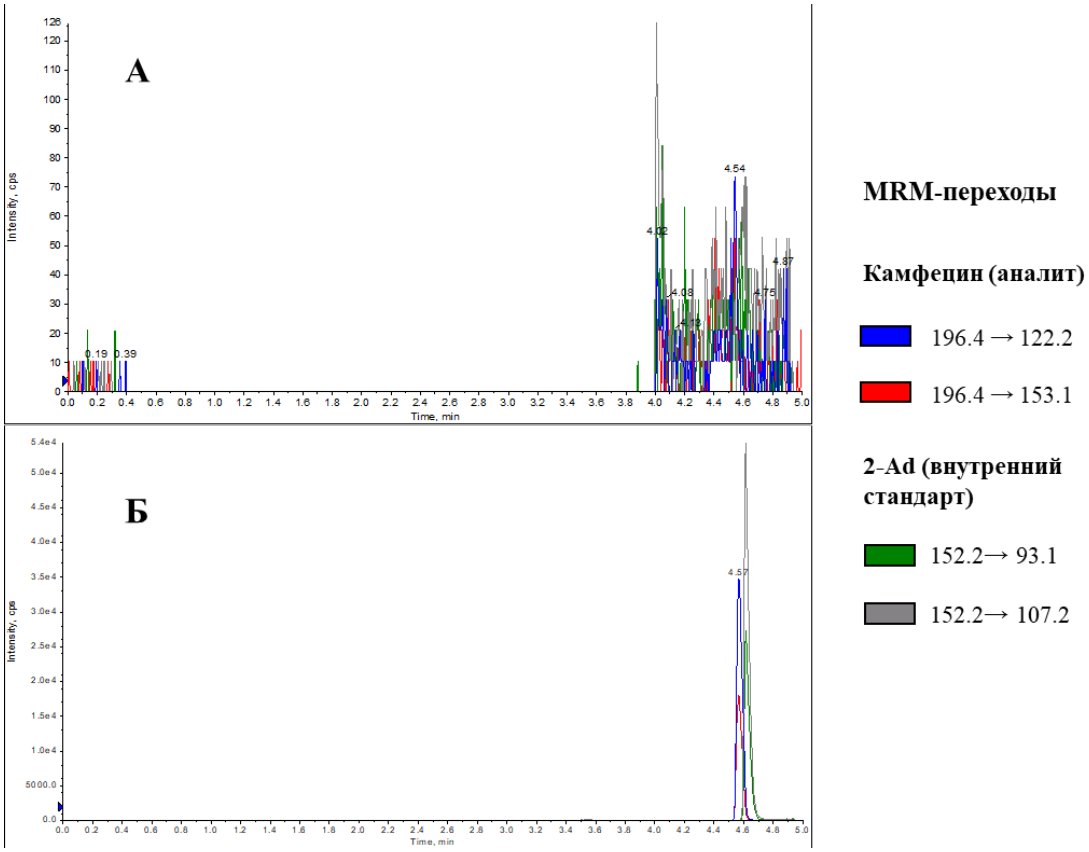


Рисунок 24. Хроматограмма холостого образца плазмы крови (А) и образца плазмы крови, содержащей камфецин с концентрацией 500 нг/мл и внутренний стандарт с концентрацией 10 мкг/мл (Б).

Отсутствие хроматографических пиков веществ, совпадающих по времени удерживания с пиком аналита и внутреннего стандарта, свидетельствует о селективности данной методики и позволяет количественно определять камфецин.

С помощью разработанной методики пробоподготовки были обработаны и проанализированы градуировочные образцы в концентрациях 10-5000 нг/мл. Образец плазмы с концентрацией 5 нг/мл был исключен в силу низкой интенсивности сигнала (соотношение сигнал/шум составил менее 10). Градуировочная зависимость (рис. 25) описывается уравнением Хилла $y = \frac{3{,}57 + 1{,}92 \cdot x^{0{,}97}}{1{,}08 + x^{0{,}97}}$.

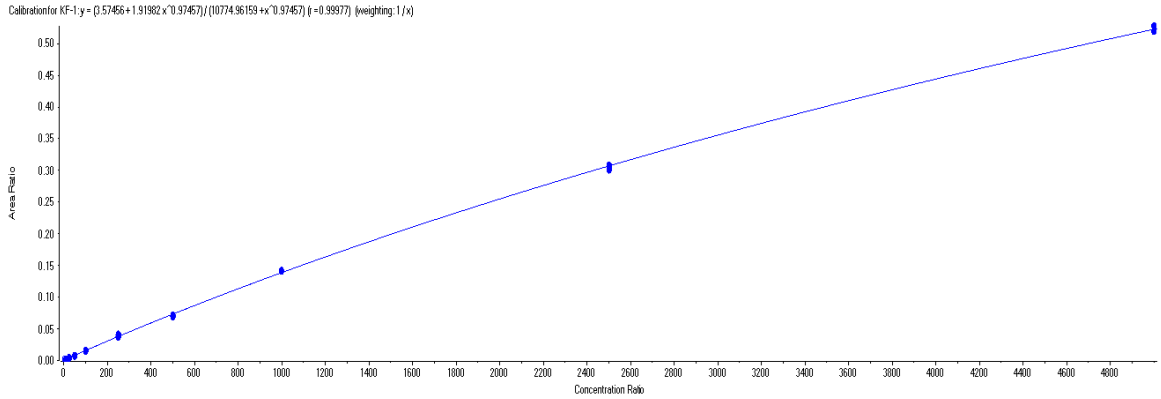


Рисунок 25. Градуировочная зависимость для определения концентрации камфецина в плазме крови крыс в диапазоне 10-5000 нг/мл.

Точность построенной градуировочной зависимости составила от 96 до 104% (табл. 1) и находится в допустимых пределах погрешности, а значение квадрата коэффициента детерминации составило 0,999. Диапазон значений площади пика внутреннего стандарта находился в пределах ±4,6% относительно среднего значения.

Таблица 1. Найденные значения концентраций камфецина в градуировочных образцах.

Концентрации камфецина в плазме, нг/мл	Найденная концентрация±SD, нг/мл, n=4	Точность, %
10	10,3±1,5	103
25	25,3±0,3	101
50	48,2±0,7	96,5
100	97±2	97,2
250	261±15	104
500	484±11	96,8
1000	1022±5	102
2500	2474±50	98,9
5000	5016±75	100

Нижний предел количественного определения составил 10 нг/мл, а отклонение от теоретического значения составило 2,7%. Среднее значение отношения сигнал/шум для шести изменений составило 13,7, что удовлетворяет критерию приемлемости (сигнал/шум ≥ 10).

Результаты анализа образцов контроля качества, полученные внутри и между циклами, приведены в таблице 2. Значения относительной погрешности не превышают допустимую погрешность рассчитанной концентрации (не более 15% от номинального значения, а для образцов LLOQ – 20%).

Таблица 2. Результаты анализа образцов контроля качества.

Тип образца[a)] и (концентрация, нг/мл)	Найденная концентрация±SD, нг/мл, n=6	Относительная погрешность, %	Точность, %
LLOQ (10)	10,57±0,44	4,6	109
QCL (30)	29,13±0,31	9,1	97,3
QCM (2500)	2380±60	2,6	95,0
QCH (4000)	3780±37	3,8	94,6

a) QCL, QCM, QCH – образцы контроля качества в низкой, средней и высокой концентрации агента соответственно.

В таблице 3 представлены значения степени извлечения камфецина для образцов контроля качества с низкой (QCL) и высокой (QCH) концентрацией. Значения степеней извлечения аналита составили 103% и 99,2%. Разработанная методика позволяет практически полностью извлекать камфецин из биологической матрицы в процессе пробоподготовки.

Таблица 3. Значение степени извлечения камфецина из плазмы для образцов контроля качества.

Тип образца[a)] и концентрация, нг/мл	Степень извлечения, % n=6	Относительная погрешность, %
QCL (30)	103,0	12,9
QCH (4000)	99,2	8,5

a) QCL, QCH – образцы контроля качества в низкой и высокой концентрации агента, соответственно.

При анализе холостого образца после образца калибратора с максимальной концентрацией (5000 нг/мл) на хроматограмме не наблюдалось пика камфецина, что свидетельствует об отсутствии переноса вещества при анализе серии образцов. При оценке стабильности вещества после пробоподготовки было установлено, что концентрация камфецина не изменяется в течение 24 часов при хранении образцов в автосамплере, что достаточно для анализа большой серии образцов.

Таким образом, разработанная методика количественного определения камфецина в плазме крови крысы методом ВЭЖХ-МС/МС была валидирована согласно требованиям регуляторных документов и является приемлемой для дальнейшего анализа образцов.

2.1.4. Исследование распределения камфецина между компонентами крови

Кровь является основным переносчиком кислорода и других веществ в организме животных. Она состоит из жидкой среды (плазмы) и форменных элементов, основную массу

которых составляют эритроциты. Доля общего объема крови, занимаемая форменными элементами, называется гематокритом, а его значение зависит от организма. У человека гематокрит составляет 40-50%, а среднее количество форменных элементов крови - около 5×10^9 в 1 мл [157].

Попадая в кровь, вещество может либо оставаться там в свободном виде, либо связываться с форменными элементами крови и/или белками плазмы. Доля связанного вещества зависит от его физико-химических свойств: растворимости в воде, кислотных и основных свойств, наличия функциональных групп, способных вступать в реакцию с амино- или тиольными группами в белках. В случае химической реакции вещество может связываться с белками необратимо или разрушаться. Кроме того, необратимое связывание вещества с белками может быть вызвано сильным электростатическим взаимодействием заряженных групп вещества с группами белков.

Для оценки степени связывания вещества с компонентами крови используется понятие коэффициента распределения f_p [158]. Этот коэффициент определяется как отношение массы вещества, связанного с форменными элементами крови (m_{RBC}), к массе вещества, оставшегося в плазме (m_{PL}, уравнение (1)):

$$f_p = \frac{m_{RBC}}{m_{PL}} \qquad (1).$$

Если к цельной крови объемом V_{BL} добавить количество вещества m_0, то масса вещества, адсорбированного на форменных элементах, будет равна $m_{RBC} = m_0 - m_{PL}$.

Величина m_0 рассчитывается исходя из концентрации вещества в цельной крови, C_{BL}, и объема последней, V_{BL} (2). Масса вещества в плазме может быть рассчитана исходя из его концентрации в плазме, C_{PL}, и объема плазмы, V_{PL} (3).

$$m_0 = C_{BL}\cdot V_{BL} \ (2) \qquad m_{PL} = C_{PL}\cdot V_{PL} \ (3)$$

Поскольку гематокрит (H) — это объемная доля крови, занимаемая форменными элементами (4), объем плазмы зависит от гематокрита и может быть рассчитан по формуле (5):

$$H = V_{RBC}/V_{BL} \qquad (4),$$

$$V_{PL} = V_{BL} - V_{RBC} = V_{BL}\cdot(1\text{-}H) \qquad (5).$$

Принимая во внимание приведенные выше соотношения, можно выразить коэффициент распределения f_p через концентрацию вещества в крови и плазме, а также значение гематокрита по уравнению (6):

$$f_p = \frac{m_{RBC}}{m_{PL}} = \frac{m_0 - m_{PL}}{m_{PL}} = \frac{C_{BL}V_{BL}}{C_{PL}V_{PL}} - 1 = \frac{C_{BL}V_{BL}}{C_{PL}V_{BL}(1-H)} - 1 = \frac{C_{BL}}{C_{PL}(1-H)} - 1 \qquad (6).$$

Связывание вещества с форменными элементами означает адсорбцию определенного его количества на каждом элементе. Обозначим массу вещества, адсорбированного на одном элементе,

то есть его массовую концентрацию, как σ_{RBC}. Тогда общая масса вещества, адсорбированного на форменных элементах, может быть выражена следующим образом:

$$m_{RBC} = \sigma_{RBC} \cdot N_{RBC} \quad (7),$$

где σ_{RBC} - массовая концентрация вещества в одном форменном элементе, а N_{RBC} - общее количество форменных элементов крови. Пусть число форменных элементов, содержащихся в единице объема, равно N_0, тогда в объеме крови V_{BL} будет содержаться $N_{RBC} = N_0 \times V_{BL}$ элементов, а масса вещества, связанного с форменными элементами, будет равна:

$$m_{RBC} = \sigma_{RBC} \cdot N_0 \cdot V_{BL} \quad (8)$$

Количество форменных элементов в единице объема крови N_0 может быть измерено с помощью гематологического анализа. Подставим выражение (8) в формулу (1) для расчета коэффициента распределения f_p, одновременно используя выражение (3), и получим выражение (9):

$$f_p = \frac{\sigma_{RBC} \cdot N_{RBC}}{C_{PL} \cdot (1-H)} \quad (9)$$

Выразим значение σ_{RBC} из формулы (9) и воспользуемся выражением (6). В результате получаем уравнение (10), связывающее концентрацию вещества в крови и плазме, а также гематокрит и количество эритроцитов в единице объема:

$$\sigma_{RBC} = \frac{f_p \cdot C_{PL} \cdot (1-H)}{N_0} = \left[\frac{C_{BL}}{C_{PL} \cdot (1-H)} - 1\right] \cdot \frac{C_{PL} \cdot (1-H)}{N_0} = \frac{C_{BL} - C_{PL} \cdot (1-H)}{N_0} \quad (10)$$

Таким образом, зная концентрацию вещества, внесенного в кровь, а также измерив его концентрацию в плазме, гематокрит и количество форменных элементов в единице объема крови, можно рассчитать концентрацию вещества, связанного с форменными элементами крови.

После введения препарата животному вещество находится при температуре тела +37–39˚C. После отбора крови, в зависимости от лабораторных условий, не всегда получается сразу приготовить плазму, поэтому образцы могут храниться в холодильнике без замораживания (при +4–6°C) или при комнатной температуре. Все эти факторы могут привести к искажению результатов количественного определения вещества, поэтому распределение потенциальных лекарственных препаратов необходимо изучать при различных температурных условиях. Например, было показано, что некоторые препараты существенно отличаются по распределению между форменными элементами крови и плазмой при разных температурах [159,160].

Для изучения распределения камфецина между форменными элементами крови и плазмой были приготовлены образцы крови, содержащие соединение в концентрации 50, 250, 1000 и 2500 нг/мл. Эти значения концентрации были выбраны, поскольку данный диапазон соответствует концентрации камфецина в крови крыс после внутривенного или внутрижелудочного введения

[7,8]. Распределение камфецина изучалось при температурах +4°C, +25°C и +38°C для нормальной крови крысы (H=40%), которые представляют собой основные температуры отбора, хранения и подготовки образцов.

В таблице 4 приведены средние концентрации камфецина в плазме крови крыс после подготовки образцов крови, инкубации, центрифугирования для получения плазмы и обработки образцов при указанных температурах, а также соответствующие значения коэффициентов распределения и концентрации соединения на форменный элемент. Полученные данные представлены в виде диаграммы на рисунке 26А.

Таблица 4. Средние концентрации камфецина в плазме крови, коэффициенты распределения и рассчитанные концентрации в форменных элементах при различных температурах.

T, °C	C_{BL}, нг/мл	C_{PL}±SD, нг/мл n=4	f_p	$\sigma_{RBC}\cdot10^7$, нг/элемент
4	50	44,9±5,7	0,89	$3,39\cdot10^{-2}$
	250	253±2,7	0,64	$1,44\cdot10^{-1}$
	1000	880±16	0,90	$6,94\cdot10^{-1}$
	2500	2129±40	0,96	1,80
25	50	52±4,0	0,62	$2,79\cdot10^{-2}$
	250	269±4,0	0,55	$1,31\cdot10^{-1}$
	1000	941±22	0,77	$6,40\cdot10^{-1}$
	2500	2478±43	0,68	1,49
38	50	48±1,8	0,72	$3,079\cdot10^{-2}$
	250	258±3,6	0,62	$1,40\cdot10^{-1}$
	1000	922±16	0,81	$6,57\cdot10^{-1}$
	2500	2450±70	0,70	1,52

Как видно из таблицы, найденная концентрация камфецина в плазме составляет 76-100% от первоначально внесенной в кровь. Полученные значения коэффициента f_p свидетельствуют о том, что это вещество в диапазоне концентраций 50-2500 нг/мл равномерно распределяется между форменными элементами и плазмой крови, а температура не оказывает существенного влияния на коэффициент распределения. Это свойство камфецина позволяет проводить его количественный анализ в образцах цельной крови, хранившихся при разных температурах.

На рисунке 26Б представлен график зависимости концентрации камфецина, адсорбированного на форменных элементах крови (σ_{RBC}), от количества вещества, добавленного в кровь. Как видно из графиков, параметр σ_{RBC} линейно зависит от начальной концентрации камфецина в крови в диапазоне от 50 до 2500 нг/мл. Близость линий на графике свидетельствует о

том, что существенного влияния температуры на адсорбцию вещества форменными элементами крови нет, хотя наблюдалось некоторое увеличение σ_{RBC} при температуре +4˚C. Вероятно, при этой температуре растворимость вещества снижается, что приводит к увеличению доли адсорбированного на эритроцитах камфецина по сравнению с другими значениями температуры.

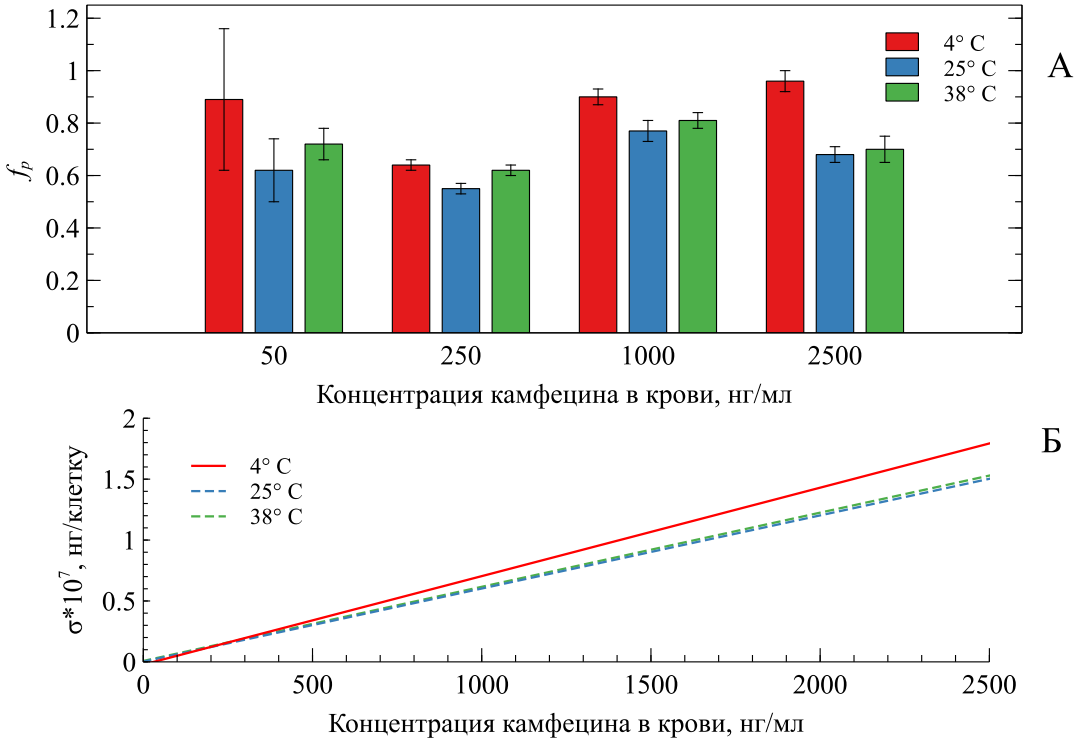


Рисунок 26. Распределение камфецина между компонентами крови в зависимости от концентрации при разных температурах: А – диаграмма значений коэффициентов распределения f_p, Б – график зависимости концентрации камфецина в форменном элементе σ от концентрации камфецина в крови.

Таким образом, было показано, что распределение камфецина между компонентами крови крыс одинаково в достаточно широком диапазоне концентраций. Кроме того, близость концентраций камфецина в плазме к исходным концентрациям вещества в крови указывает на то, что для его количественного определения можно выбирать плазму, а не цельную кровь. Это имеет большое практическое значение, поскольку, в отличие от плазмы, кровь не подвергается заморозке и хранению, а также требует специальных методов пробоподготовки. В случае аналогичного поведения камфецина в цельной крови человека, в ходе клинических испытаний можно будет получать плазму без необходимости подготовки образцов цельной крови. Это значительно

упростит и ускорит клинические испытания, так как не потребует специального оборудования и реагентов для подготовки проб сразу после отбора крови у добровольцев.

Для исследования распределения камфецина между компонентами крови в зависимости от гематокрита (HCT) использовались образцы крови с различными значениями этого параметра. Для этого были подготовлены образцы крови крыс с низким (HCT=24%) и высоким (HCT=65%) значениями гематокрита. Распределение изучали при +25°C для концентраций камфецина 50, 250, 1000 и 2500 нг/мл.

В таблице 5 приведены значения концентраций камфецина в плазме крови крыс после приготовления образцов крови, инкубации, центрифугирования для приготовления плазмы и обработки образцов с различными значениями гематокрита, рассчитаны коэффициенты распределения и соответствующие значения концентрации вещества в одном форменном элементе. Из полученных данных видно, что для образцов крови с низким значением гематокрита концентрация камфецина в плазме составляла 65-85% от исходной концентрации в крови. Для образцов с высоким значением гематокрита концентрация камфецина в плазме составляла 92-130 % от исходной концентрации в крови, что, по-видимому, связано с относительно небольшим объемом плазмы.

Таблица 5. Средние значения концентраций камфецина в плазме, коэффициентов распределения и концентрации в форменных элементах при разных значениях гематокрита.

HCT, %	C_{BL}, нг/мл	C_{PL}±SD, нг/мл n=4	f_p	$\sigma \cdot 10^7$, нг/элемент
24	50	33±1,8	1,0	$5{,}95 \cdot 10^{-2}$
	250	206±5,7	0,6	$2{,}25 \cdot 10^{-1}$
	1000	823±31	0,6	$8{,}93 \cdot 10^{-1}$
	2500	1914±99	0,8	2,55
65	50	46±3,4	2,1	$2{,}96 \cdot 10^{-2}$
	250	260±23	1,8	$1{,}38 \cdot 10^{-1}$
	1000	1061±126	1,6	$1{,}25 \cdot 10^{-1}$
	2500	3259±55	1,2	1,18

На рисунке 27А представлена диаграмма значений коэффициента распределения f_p для образцов крови с различным гематокритом, а также сравнение полученных результатов с данными для нормальной крови. Из диаграммы видно, что с увеличением гематокрита происходит увеличение коэффициента распределения, то есть доли камфецина, адсорбированного на форменных элементах крови. Это связано с увеличением количества вещества, связанного с

форменными элементами, и одновременным уменьшением объема плазмы. На рисунке 27Б представлен график зависимости концентрации камфецина, адсорбированного на форменных элементах крови, от количества вещества, добавленного в кровь с низким и высоким значением гематокрита. Для обоих случаев наблюдалась линейная зависимость значений σ_{RBC} от концентрации вещества в крови. Увеличение гематокрита привело к снижению значений σ_{RBC}, что объясняется увеличением количества адсорбционных сайтов для вещества.

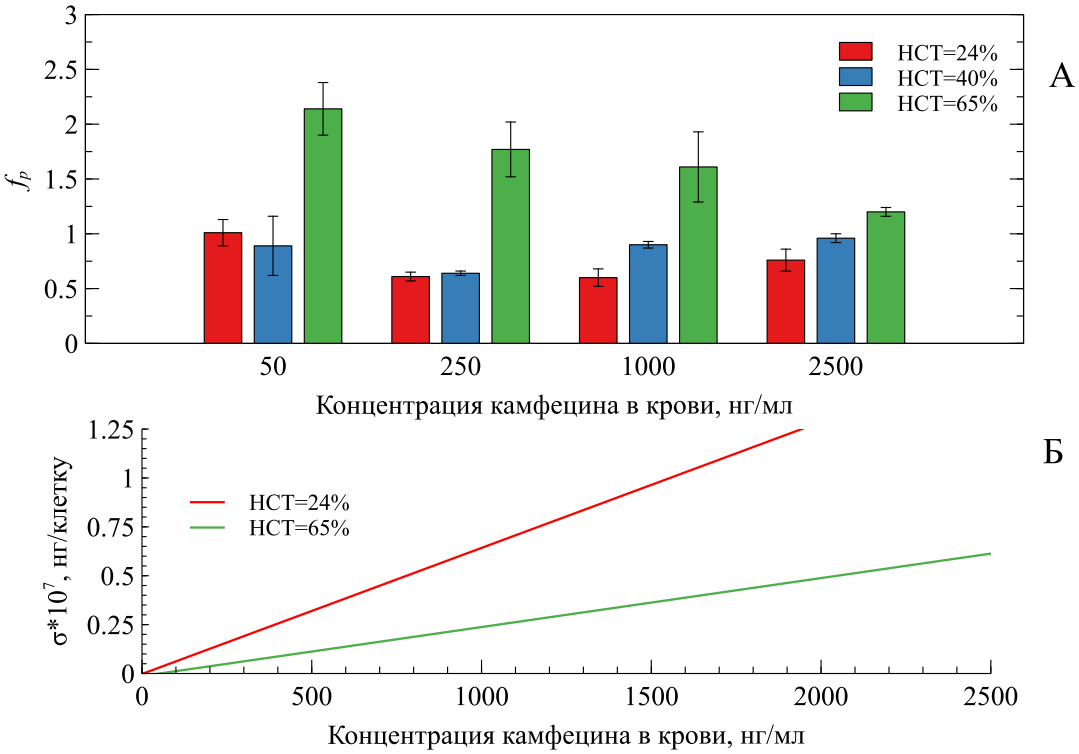


Рисунок 27. Распределение камфецина между компонентами крови при разном значении гематокрита: А – диаграмма значений коэффициентов распределения f_p, Б – график зависимости концентрации камфецина в форменном элементе σ от концентрации камфецина в крови.

Таким образом, показано, что количество адсорбированного камфецина на форменных элементах крови линейно зависит от количества добавленного вещества в диапазоне концентраций от 50 до 2500 нг/мл в крови с различными значениями гематокрита.

Для подтверждения гипотезы о том, что камфецин действительно адсорбируется на форменных элементах крови, а не подвергается биотрансформации с участием ферментов, присутствующих в крови, была изучена обратимость процесса адсорбции вещества на форменных элементах. Для этого были приготовлены образцы крови, содержащие камфецин в ранее упомянутых концентрациях (50, 250, 1000 и 2500 нг/мл), и обработаны в соответствии с

протоколом, описанным в разделе 3.2.4. К нормальной цельной крови крысы (HCT=40%, T=25˚C) добавляли камфецин, аккуратно перемешивали на шейкере, затем центрифугировали и отбирали плазму. Порция плазмы, отобранная после первого центрифугирования, далее будет обозначена как «порция 1». После ее отбора к оставшимся форменным элементам крови добавляли эквивалентный объем чистой плазмы крови крысы. Затем образец осторожно встряхивали на термостатируемом шейкере в течение 15 минут при +25°C, после чего плазму крови снова отделяли центрифугированием и измеряли концентрацию содержащегося в ней камфецина. Вторая порция отобранной плазмы после центрифугирования далее будет обозначена как «порция 2».

Анализ образцов плазмы показал, что концентрации камфецина (табл. 6, порция 1) соответствовали тем, которые наблюдались в предыдущем эксперименте (табл. 4). Это свидетельствует о воспроизводимости распределения камфецина между компонентами крови. Полученные данные также представлены в таблице 6 (порция 2) и на рисунке 28.

Таблица 6. Средние значения измеренной концентрации камфецина в плазме, коэффициентов распределения и концентрации в клетках при изучении процесса адсорбции.

Порция плазмы	C_{BL}, нг/мл	C_{PL}±SD, нг/мл n=4	f_p	$\sigma \cdot 10^7$, нг/элемент
1	50	49±6,8	0,7	$2{,}88 \cdot 10^{-2}$
	250	257±4,5	0,6	$1{,}40 \cdot 10^{-1}$
	1000	912±27	0,8	$6{,}72 \cdot 10^{-1}$
	2500	2325±64	0,8	1,63
2	50	31±1,2	0,68	$1{,}32 \cdot 10^{-2}$
	250	148±4,3	0,40	$5{,}23 \cdot 10^{-2}$
	1000	507±20	0,51	$2{,}24 \cdot 10^{-1}$
	2500	1145±10	0,61	$6{,}18 \cdot 10^{-1}$

Как видно из таблицы 6, концентрация камфецина в плазме крови после второго распределения была примерно в 1,6-2,0 раза ниже, чем в образцах плазмы крови, взятых сразу после добавления вещества в цельную кровь. Коэффициент распределения f_p, рассчитанный после второго центрифугирования плазмы, лишь немного ниже, чем при первом извлечении (рис. 28А). Такая картина свидетельствует о переходе примерно половины камфецина из форменных элементов крови в чистую плазму, что указывает на неметаболический и обратимый процесс адсорбции камфецина на форменных элементах крови.

На рисунке 28Б представлен график зависимости концентрации камфецина, адсорбированного на форменных элементах крови, после первого и второго отбора плазмы от

количества камфецина, добавленного в кровь. Из рисунка видно, что величина σ_{RBC} прямо пропорциональна концентрации камфецина C_{BL}. Переход вещества в чистую плазму при втором отборе свидетельствует об обратимости процесса адсорбции камфецина на форменных элементах.

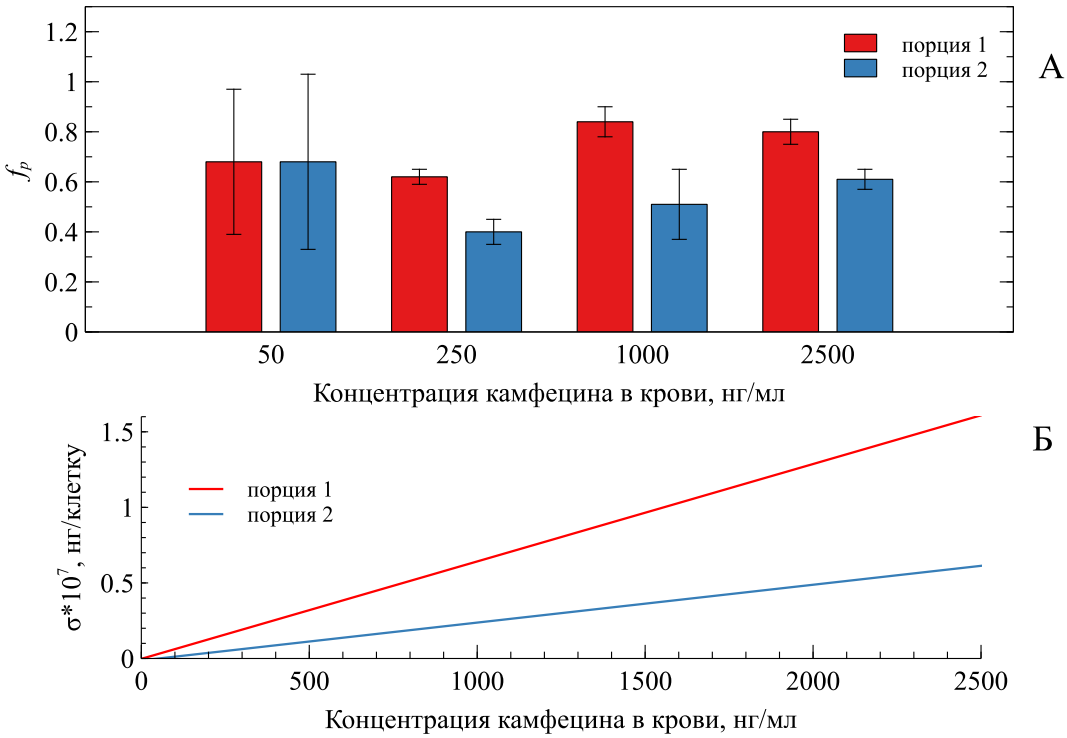


Рисунок 28. Распределение камфецина между компонентами крови при повторной экстракции вещества в чистую плазму: А – диаграмма значений коэффициентов распределения f_p, Б – график зависимости концентрации камфецина в форменном элементе σ от концентрации камфецина в крови.

Согласно полученным данным, можно предположить, что обратимость адсорбции камфецина на форменных элементах крови не будет являться лимитирующим фактором в распределении вещества по общему кровотоку в организме. Форменные элементы крови с адсорбированным веществом представляют собой депо, обеспечивающим его циркуляцию по организму и поддержание его концентрации в плазме и органах. Благодаря обратимости адсорбции камфецина на форменных элементах крови (эритроцитах), вещество будет эффективно проникать в органы, способствуя проявлению противовирусной активности соединения и защищая их от патогенного воздействия вируса гриппа. Линейная зависимость концентрации вещества, адсорбированного на форменных элементах крови, от его концентрации в цельной крови может свидетельствовать о возможности регулирования его концентрации в органах при соответствующей дозировке и режиме введения лекарственного препарата.

2.2. Исследование фармакокинетики и распределения ингибитора TDP1 на основе дегидроабиетиновой кислоты (KS-389)

2.2.1. Подбор хроматографических и масс-спектрометрических условий

При разработке метода масс-спектрометрической детекции соединения KS-389 в режиме MRM использовали раствор вещества с концентрацией 100 нг/мл в 0,1% растворе муравьиной кислоты в смеси вода-метанол (2:8 по объему), и вводили вещество с использованием встроенного шприцевого насоса непосредственно в масс-спектрометр без проведения хроматографического разделения.

На первом этапе проводили анализ в режиме сканирования молекулярных ионов без фрагментации (+Q1) для обнаружения молекулярного иона аналита. На представленном масс-спектре (рис. 29) виден интенсивный сигнал иона m/z = 463,4, соответствующий протонированной форме молекулы вещества.

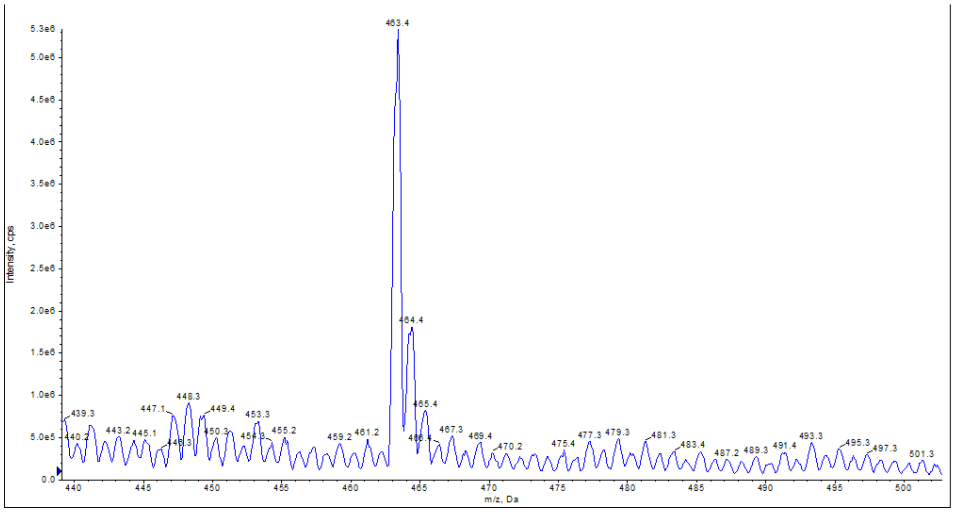


Рисунок 29. Масс-спектр раствора, содержащего KS-389, в режиме сканирования молекулярных ионов без фрагментации.

При фрагментации данного молекулярного иона в режиме соударений (collision-induced dissociation, CID) мы изменяли энергию фрагментации (collision energy, CE) для частичного и полного распада молекулы с образованием осколочных ионов. Низкой энергии фрагментации (CE=25 В) было недостаточно для образования дочерних молекулярных ионов. На масс-спектре присутствует единственный сигнал исходного молекулярного иона агента. При увеличении энергии фрагментации до 35 В наблюдалось образование осколочных ионов, имеющих m/z = 135,5 и 286,4

Да. При высоких значениях энергии фрагментации (CE=45) наблюдается образование дополнительных осколочных ионов с m/z = 107,2 и 173,2 Да, однако полного распада молекулярного иона не происходит (рис. 30). Для анализа соединения KS-389 были выбраны фрагменты 135,1 и 107,2, для которых в автоматическом режиме были оптимизированы параметры сканирования (табл. 25).

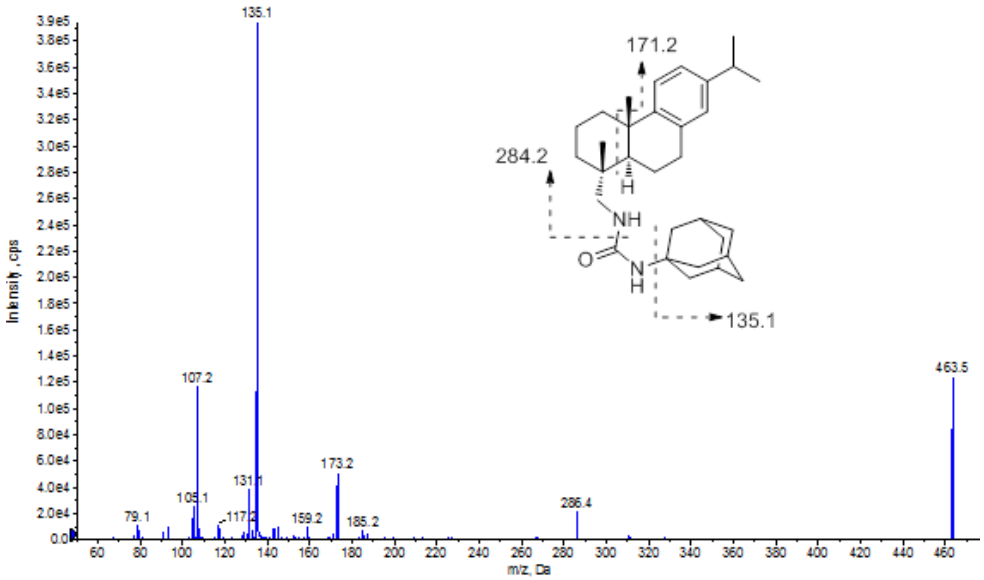
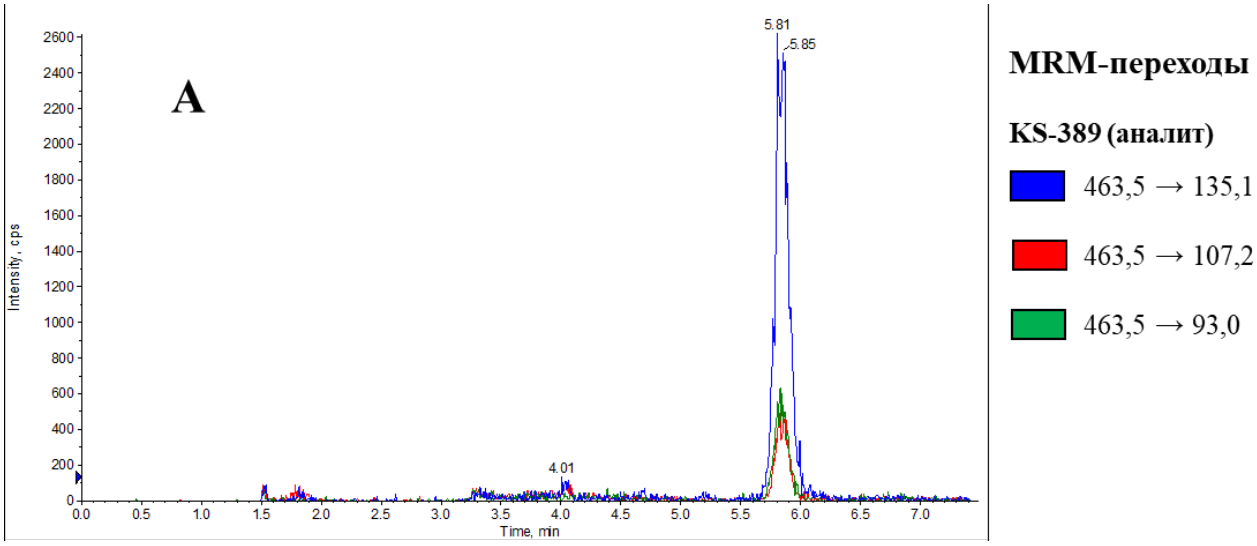


Рисунок 30. Масс-спектр KS-389 в режиме фрагментации, вызванной соударениями.

Для подбора оптимальных условий хроматографического анализа соединения KS-389 был проведен ряд анализов с различным градиентом. При сравнении 0,1% раствора муравьиной кислоты в метаноле и в ацетонитриле, использованных в качестве элюента Б, было обнаружено, что степень ионизации агента KS-389 в метаноле выше, чем в ацетонитриле (рис. 31).



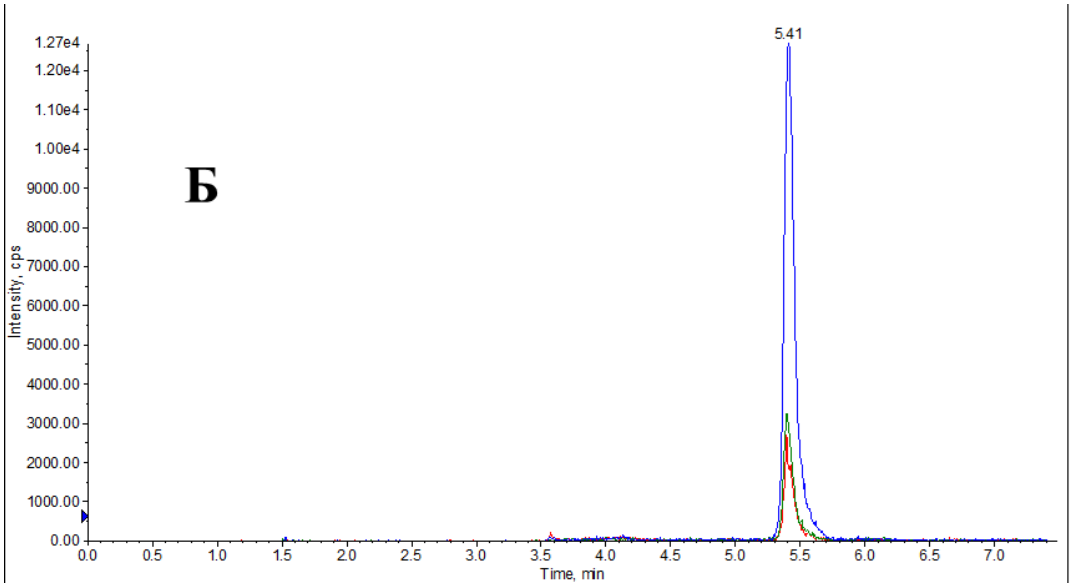


Рисунок 31. Хроматограммы раствора KS-389 с концентрацией 10 нг/мл в градиентном режиме элюирования с использованием в качестве элюента Б А – 0,1% раствора муравьиной кислоты в ацетонитриле; Б – 0,1% раствора муравьиной кислоты в метаноле.

Элюирование вещества с обращенно-фазового сорбента происходит при высоком содержании органического компонента (более 95%). При этом, если начинать элюирование со ступени с высоким содержанием фазы Б (90%), наблюдается значительное уширение хроматографического пика. При нанесении вещества на колонку, уравновешенную 20% органическим компонентом, пик не уширен, а элюирование происходит при прокачке через колонку практически 100%-го метанола.

При повторном анализе одного и того же образца в данных условиях наблюдался значительных разброс в значениях площади пика вещества, т.е. отсутствие воспроизводимости анализа. Уменьшение объема инжекции до 5 мкл и увеличение концентрации органического компонента с 93 до 97% при сохранении скорости элюирования не привели к улучшению результатов. Мы предположили, что причиной этого явления могло быть очень низкое содержание воды в элюенте в момент элюирования вещества с колонки. В результате происходит существенное уменьшение степени ионизации вещества, что приводит к разбросу в значениях. Увеличение скорости элюирования с 200 мкл/мин до 300 мкл/мин с сохранением формы градиента и общего времени анализа приводит к увеличению скорости продвижения вещества по колонке и уменьшению времени его выхода. При этом, поскольку элюирование вещества происходит в 93-95% содержании органического компонента, содержащейся в элюенте воды оказалось достаточно

для стабильной ионизации соединения и приемлемой воспроизводимости, а время удерживания соединения составило 4,9 мин (рис. 32).

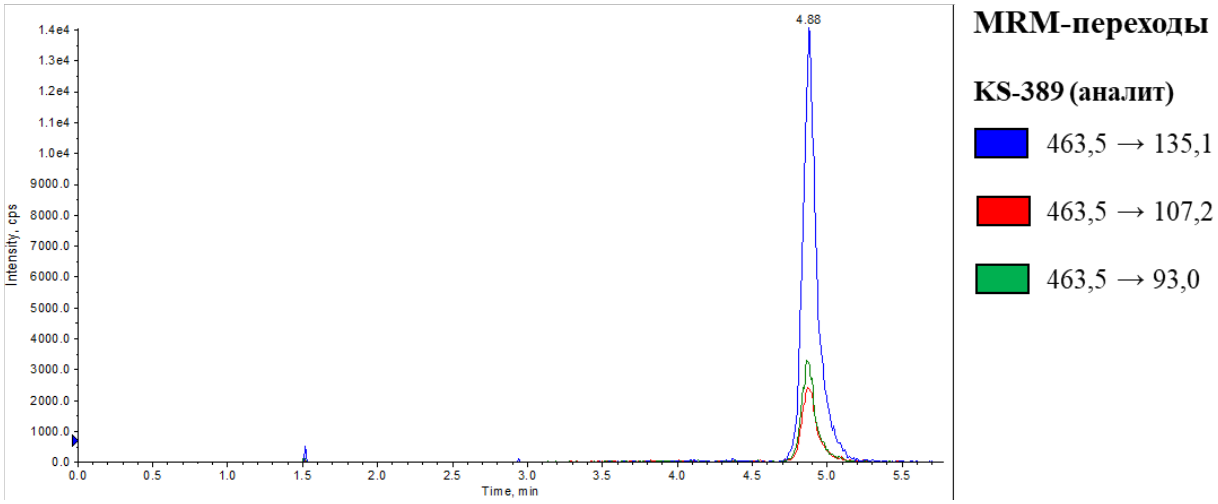


Рисунок 32. Хроматограмма раствора KS-389 с концентрацией 30 нг/мл со скоростью 300 мкл/мин.

Для анализа соединений методом ВЭЖХ-МС/МС рекомендуется использование внутреннего стандарта. Из имеющихся коммерчески доступных реактивов были выбраны соединения, которые могли бы подойти для этого (рис. 33): 4,4’-диаминодифенилметан (4,4’-DADPM), 1,5-диаминонафталин (1,5-DAN), 2,5-бис(4-диэтиламинофенил)-1,3,4-оксадиазол (2,5-BDPO). Приведенные вещества содержат атомы азота, поэтому склонны к протонированию в условиях положительной ионизации электрораспылением.

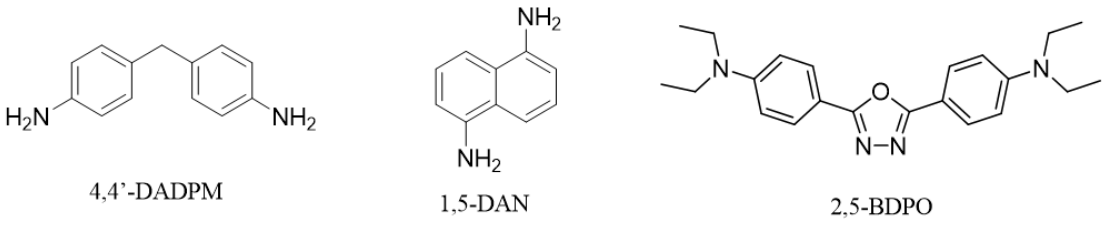


Рисунок 33. Структурные формулы 4,4’-диаминодифенилметана (4,4’-DADPM), 1,5-диаминонафталина (1,5-DAN), 2,5-бис(4-диэтиламинофенил)-1,3,4-оксадиазола (2,5-BDPO).

Были приготовлены растворы выбранных веществ с концентрацией 200 нг/мл в 0,1% растворе муравьиной кислоты в смеси вода-метанол (2:8 по объему). Для каждого вещества были подобраны условия масс-спектрометрической детекции в режиме MRM и проведен анализ в условиях полученного градиента элюирования.

При анализе как 4,4’-DADPM, так и 1,5-DAN в разработанных хроматографических условиях было обнаружено, что оба соединения элюируются в мертвом объеме хроматографической колонки. Время удерживания обоих вещества составило около 1 мин, а их хроматографические пики имеют сильно искаженную форму, поэтому данные вещества не могут быть использованы в качестве внутреннего стандарта для количественного определения агента KS-389. При анализе 2,5-BDPO в разработанных хроматографических условиях было установлено, что вещество удерживается на обращенно-фазовом сорбенте (время удерживания 4,3 мин.), а полученный хроматографический пик имеет симметричную форму и высокую интенсивность (рис. 34А).

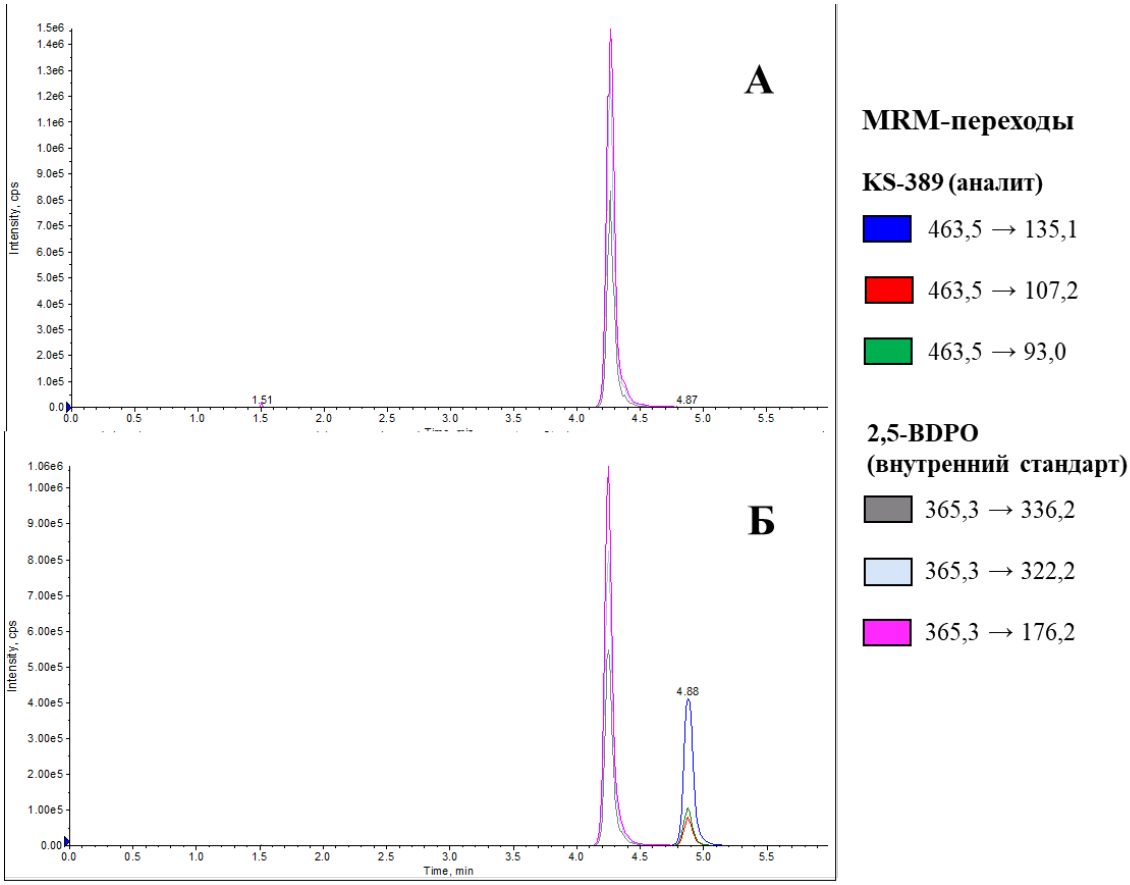


Рисунок 34. Хроматограмма раствора 2,5-BDPO с концентрацией 200 нг/мл в разработанном профиле градиента элюирования (А), хроматограмма образца KS-389, содержащий внутренний стандарт в концентрации 20 нг/мл (Б). Объем пробы 5 мкл.

Таким образом, были разработаны условия хроматографического разделения и масс-спектрометрической детекции для агента KS-389 с использованием градиентного режима элюирования. В качестве внутреннего стандарта был выбран 2,5-BDPO, для которого были

подобраны условия масс-спектрометрической детекции. Вещество может быть использовано в качестве внутреннего стандарта, поскольку имеет стабильный аналитический сигнал в разработанных хроматографических условиях и не взаимодействует с аналитом.

2.2.2. Исследование стабильности KS-389 в образцах цельной крови

Для оценки метаболической стабильности KS-389 в цельной крови *in vitro* был приготовлен образец цельной крови, содержащий вещество в концентрации 1000 нг/мл. Отбор аликвоты образца и обработку осуществляли при комнатной температуре (+24˚C) через 5, 15, 30, 60 и 120 минут с момента приготовления образца. Так как эксперимент являлся предварительным и заключался лишь в оценке стабильности вещества в крови, в качестве метода обработки биологической жидкости был выбран метод осаждения белков смесью 0.2 М раствора сульфата цинка и метанола (2:8 по объему).

На рисунке 35 приведен график зависимости относительной концентрации вещества от времени выдерживания образца. В результате анализа было обнаружено, что концентрация агента KS-389 изменяется в допустимой области погрешности результата, что свидетельствует о стабильности вещества в биологической матрице и отсутствии ферментов, влияющих на биотрансформацию агента в цельной крови.

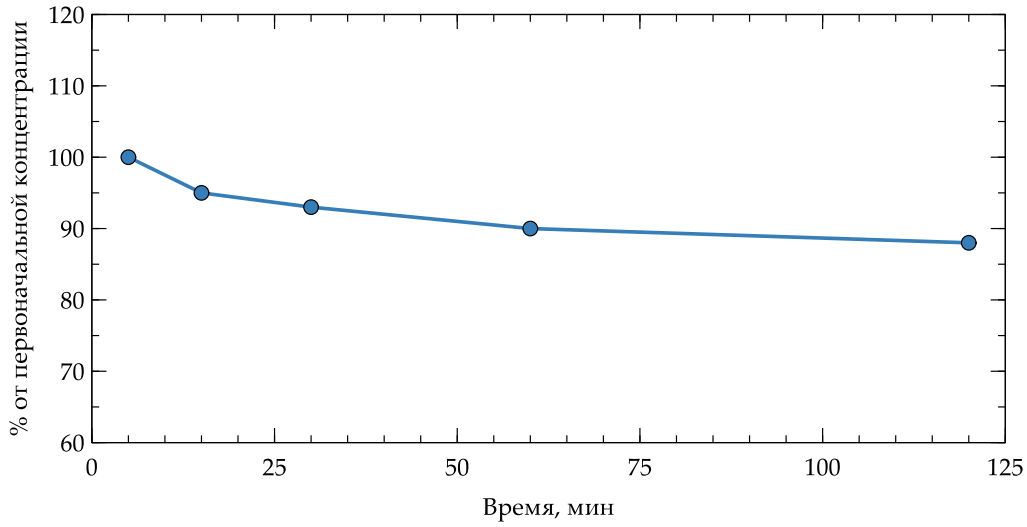


Рисунок 35. График зависимости относительной концентрации KS-389 от времени при его анализе в образцах цельной крови мыши.

2.2.3. Разработка метода пробоподготовки образцов цельной крови и тканей

Для поиска оптимального метода пробоподготовки образцов цельной крови мыши для количественного определения KS-389 были выбраны четыре способа, которые лучше всего

подходили для извлечения вещества данной природы. Среди них жидко-жидкостная экстракция, осаждение белков различными растворителями, метод экстракции вещества из сухого пятна крови и метод твердофазной экстракции вещества на модифицированном целлюлозном носителе (fabric phase sorptive extraction, FPSE).

Жидко-жидкостную экстракцию проводили с использованием этилацетата в связи с химической природой исследуемого соединения, которое, очевидно, нерастворимо в воде и экстрагируется неполярными органическими растворителями. В экспериментах осаждения белков матрицы использовали спирты (метанол, этанол), ацетонитрил, ацетон. В качестве альтернативы данным методам для пробоподготовки также использовали экстракцию сухих пятен крови и FPSE. Сравнение методов пробоподготовки проводили на образцах крови с одинаковой концентрацией вещества.

На рис. 38 приведены хроматограммы образцов цельной крови, содержащей KS-389, после пробоподготовки перечисленными методами. Несмотря на то, что жидко-жидкостная экстракция обеспечивала высокую степень извлечения KS-389 (рис. 36Б), что позволяло снизить предел обнаружения агента при анализе, данный вид пробоподготовки является трудоемким при обработке большой серии образцов. Наблюдаемое на рис. 36А уширение хроматографического пика могло быть вызвано как неполным осаждением белков плазмы органическими растворителями, так и элюированием липидных молекул вместе с аналитом. Оба этих фактора способны одновременно снижать эффективность хроматографического разделения. Экстракция с использованием целлюлозного носителя позволила получить интенсивные хроматографические пики, однако обработка цельной крови данным способом являлась наиболее трудоемкой среди выбранных методов (рис. 36В). В данном случае была выбрана экстракция сухих пятен крови. В результате обработки образцов данным методом были получены симметричные хроматографические пики, интенсивность которых позволяла количественно определять низкие концентрации KS-389 (рис. 36Г). Стоит отметить, что пробоподготовка с использованием сухих пятен крови удобна при исследовании фармакокинетики и не является многостадийной, в отличие от жидко-жидкостной экстракции или метода FPSE.

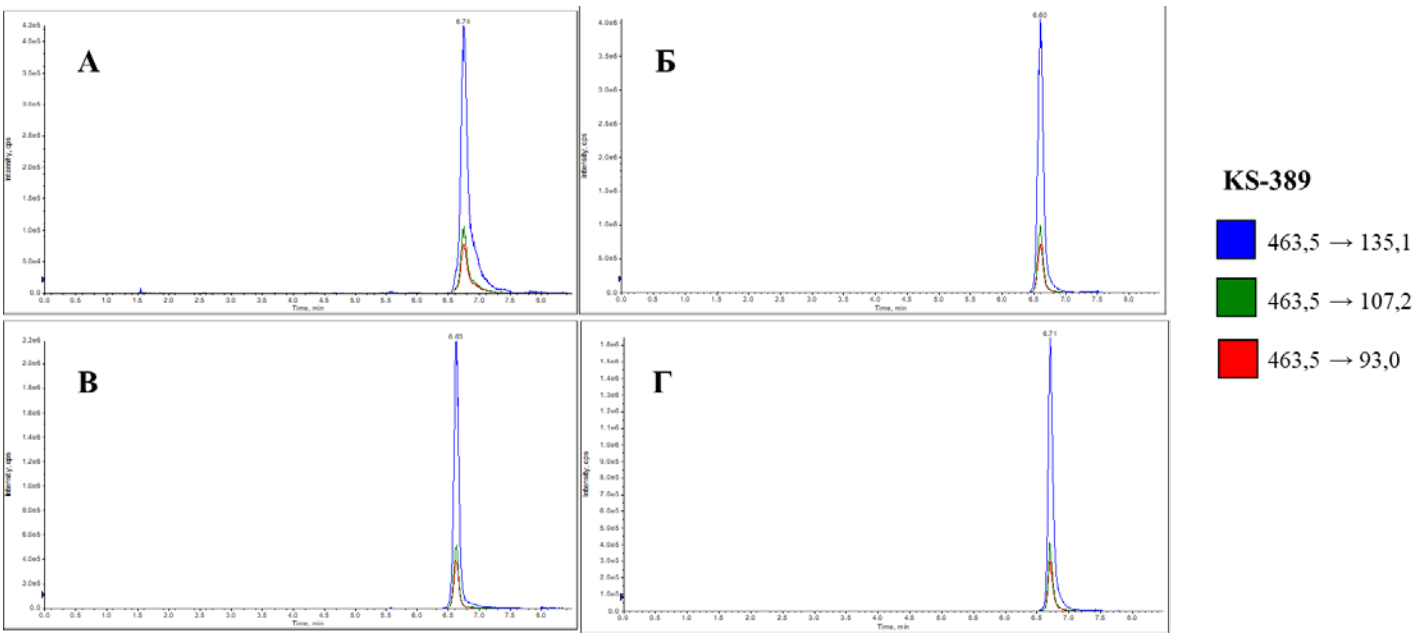


Рисунок 36. Хроматограммы образцов цельной крови, содержащей KS-389, после пробоподготовки методами осаждения метанолом (А), жидко-жидкостной экстракции этилацетатом (Б), FPSE (В), сухого пятна крови (Г).

Диаграмма значений площади пика, полученных при анализе образцов цельной крови, представлена на рисунке 37.

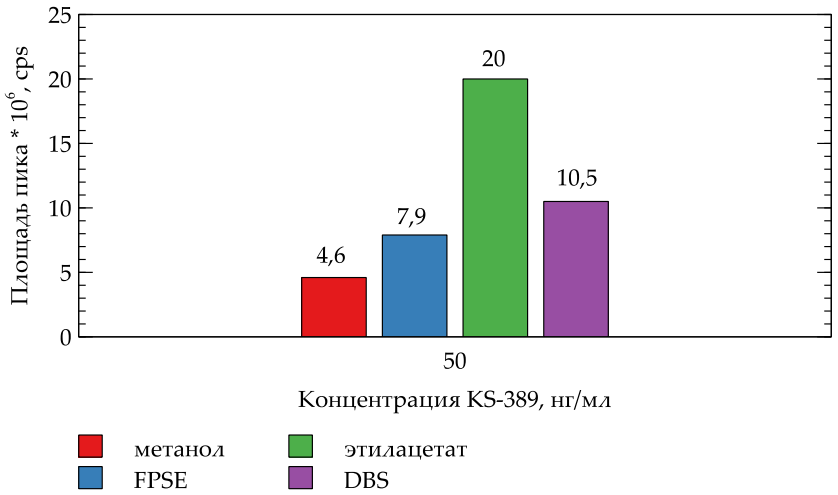


Рисунок 37. Диаграмма значений площади пика, полученных при анализе образцов цельной крови, содержащих агент KS-389 в концентрации 50 нг/мл, при обработке различными методами.

Анализ биологически активных веществ в тканях животных осложняется необходимостью в гомогенизации образца и в подборе системы, позволяющей наиболее полно извлечь анализируемый

компонент. При разработке метода мы использовали два подхода: гомогенизация образца в воде с последующим добавлением метанола и гомогенизация образца в 80% водном метаноле. В качестве модельного образца для предварительных экспериментов использовали мозг мыши.

На хроматограмме образца, полученного при последовательной обработке водой, а затем метанолом, высота пика, соответствующего агенту KS-389, составляет 3.4×10^5 ед. В то же время, при обработке аналогичного образца сразу 80% водным метанолом происходит существенно более эффективное извлечение вещества из биологической матрицы: высота пика вещества составляет 4.7×10^6 ед. Мы предполагаем, что столь значительная разница в степени извлечения вещества обусловлена тем, что в водном гомогенате возможны протекания процессов биотрансформации аналита, тогда как при добавлении органического растворителя происходит омывание разрушенных клеточных стенок и последующее извлечение вещества.

Таким образом, была показана эффективность описанной в литературе методики пробоподготовки биологических тканей [161] для извлечения агента KS-389 из тканей мозга мыши. Данный подход к гомогенизации органов был применен для мозга, печени и почек.

2.2.4. Валидация методик для количественного определения KS-389 в биологических матрицах

На следующем этапе работы разработанные методики были валидированы по параметрам, указанным в разделе 3.4, согласно требованиям регуляторных документов. На первом этапе была продемонстрирована селективность каждой из методик. Для этого проводили анализ холостых образцов каждой из матриц (цельная кровь, гомогенаты мозга, печени, почек) и соответствующих образцов, содержащих KS-389.

Для образцов цельной крови концентрация KS-389 составляла 800 нг/мл. Концентрация агента в гомогенате мозга составляла 50 нг/г, в гомогенате печени – 402 нг/г, в гомогенате почек – 453 нг/г. На хроматограммах холостых образцов перечисленных матриц показано отсутствие пиков веществ, совпадающих по времени удерживания с пиком определяемого вещества и внутреннего стандарта. Таким образом, подтверждена селективность разработанных аналитических методик, что позволяет провести количественное определение KS-389 в присутствии других компонентов.

При построении градуировочных зависимостей для каждой из матриц диапазон концентраций был выбран исходя из предположения значений после введения вещества животным в дозе нескольких мг/кг. Для построения градуировочных зависимостей использовали образцы цельной крови, содержащие вещество KS-389 в концентрации 2, 5, 10, 20, 30, 100, 200, 800, 2000 нг/мл. Градуировочная зависимость (рис. 38) была построена в указанном диапазоне концентраций

и описывается линейным уравнением *y = 0.00122x + 0.00043,* значение коэффициента детерминации составило 0,996.

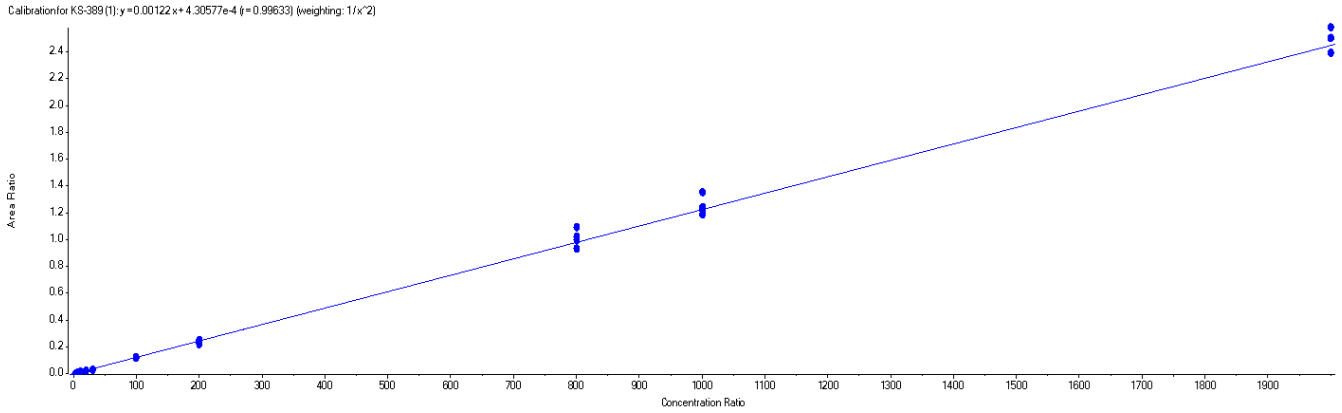


Рисунок 38. Градуировочная зависимость для определения концентрации агента KS-389 в цельной крови диапазоне 2–2000нг/мл.

Нижний предел количественного определения составил 2 нг/г, а отклонение от теоретического значения ±0,3%. Среднее значение отношения сигнал/шум для шести изменений для LLOQ составило 20,8, что удовлетворяет критерию (S/N ≥ 10). Результаты обратного расчета концентраций градуировочных образцов по полученной кривой приведены в таблице 7.

Таблица 7. Найденные значения концентрации KS-389 в градуировочных образцах цельной крови.

Концентрации вещества в цельной крови, нг/мл	Найденная концентрация±SD, нг/мл n=4	Точность, %
2	1,99±0,27	99,7
5	5,23±0,31	105
10	9,41±1,21	94,1
20	20,2±1,15	101
30	27,4±0,17	91,4
100	101±3,05	101
200	193±11	96,3
800	828±52	104
1000	982±59	98,2
2000	2038±77	102

Для построения градуировочной зависимости в гомогенате мозга, концентрации вещества KS-389 составляли 1, 2, 7, 19, 50, 90 нг/г. Градуировочная зависимость была построена в указанном диапазоне концентраций (рис. 39) и описывается линейным уравнением *y = 0,01245x – 0,00622,* значение коэффициента детерминации составило 0,995.

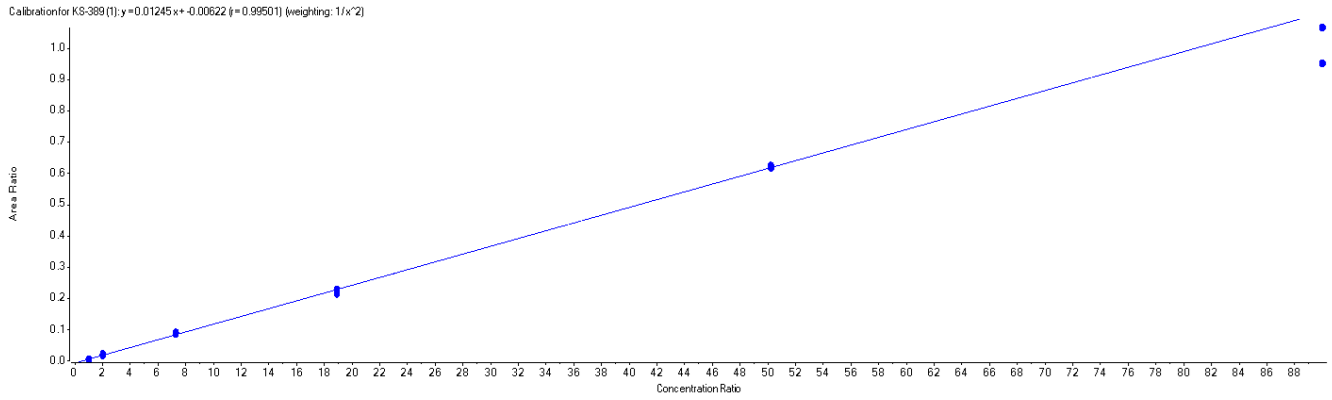


Рисунок 39. Градуировочная зависимость для определения концентрации агента KS-389 в гомогенате мозга диапазоне 1–90 нг/г.

Нижний предел количественного определения составил 1 нг/г, а отклонение от теоретического значения ±5,7%. Среднее значение отношения сигнал/шум для шести изменений для LLOQ составило 160, что удовлетворяет критерию (S/N ≥ 10). Результаты обратного расчета концентраций градуировочных образцов по полученной кривой приведены в таблице 8.

Таблица 8. Найденные значения концентрации KS-389 в градуировочных образцах гомогената мозга.

Концентрации вещества в гомогенатах мозга, нг/г	Найденная концентрация±SD, нг/г n=4	Точность, %
1	0,94±0,02	94,3
2	2,20±0,21	110
7	7,81±0,20	107
19	18,39±0,85	97,3
50	50,6±0,36	101
90	81,7±6,4	90,8

Для построения градуировочной зависимости в гомогенате печени, концентрация вещества KS-389 составляла 5, 10, 20, 100, 200, 402, 902, 1720, 2595 нг/г. Градуировочная зависимость была построена в указанном диапазоне концентраций (рис. 40) и описывается линейным уравнением $y = 4046x - 1301$, значение коэффициента детерминации составило 0,995.

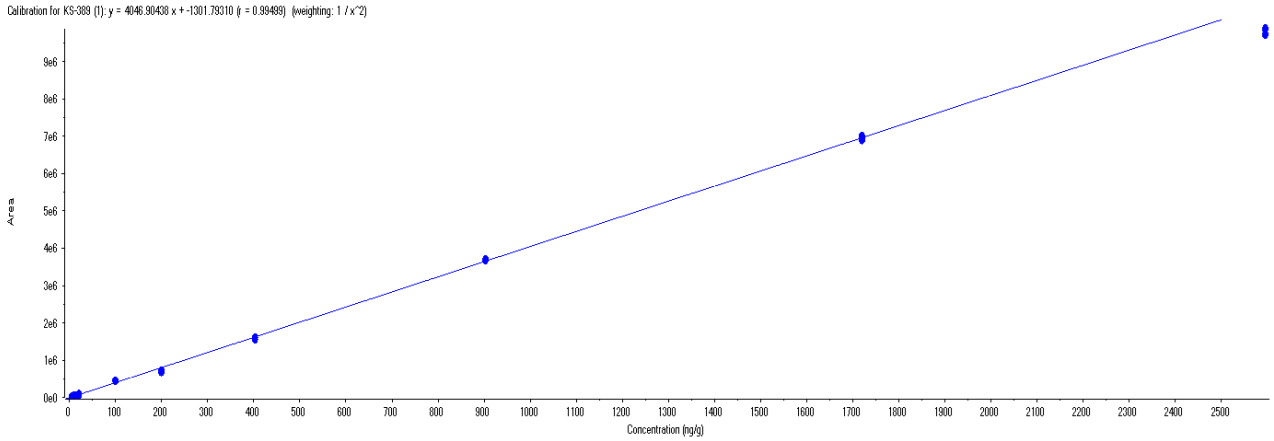


Рисунок 40. Градуировочная зависимость для определения концентрации агента KS-389 в гомогенате печени диапазоне 5–2595 нг/г.

Нижний предел количественного определения составил 5 нг/г, а отклонение от теоретического значения ±5,9%. Среднее значение отношения сигнал/шум для шести изменений для LLOQ составило 221, что удовлетворяет критерию (S/N ≥ 10). Результаты обратного расчета концентраций градуировочных образцов по полученной кривой приведены в таблице 9.

Таблица 9. Найденные значения концентрации KS-389 в градуировочных образцах гомогената печени.

Концентрации вещества гомогенате печени, нг/г	Найденная концентрация±SD, нг/г n=4	Точность, %
5	4,89±0,19	94,1
10	11,43±0,19	111
20	23,01±0,22	113
100	109±1,6	109
200	176±1,7	88,2
402	393±9,5	97,7
902	910,1±0,23	101
1720	1716±16	99,8
2595	2421±27	93,3

Для построения градуировочной зависимости в гомогенате почек, концентрации вещества KS-389 составляли 2.1, 4.7, 11, 20, 50, 90, 453, 1003, 2008 нг/г. Градуировочная зависимость была построена в указанном диапазоне концентраций (рис. 41) и описывается линейным уравнением $y = 0{,}00423x + 0{,}00326$, значение коэффициента детерминации составило 0,996.

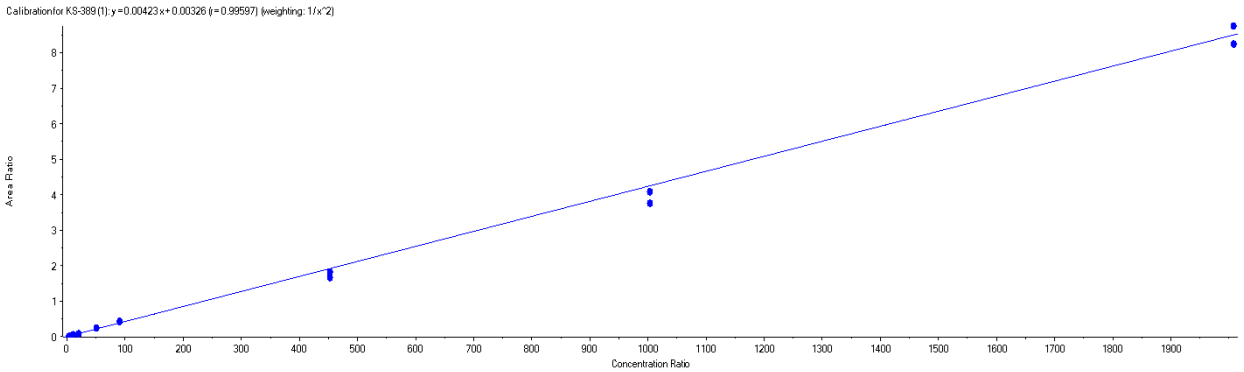


Рисунок 41. Градуировочная зависимость для определения концентрации агента KS-389 в гомогенате почек диапазоне 2-2008 нг/г.

Нижний предел количественного определения составил 2,1 нг/г, а отклонение от теоретического значения ±2,7%. Среднее значение отношения сигнал/шум для шести изменений для LLOQ составило 87. Результаты обратного расчета концентраций градуировочных образцов по полученной кривой приведены в таблице 10.

Таблица 10. Найденные значения концентрации KS-389 в градуировочных образцах гомогената почек.

Концентрации вещества гомогенате почек, нг/г	Найденная концентрация±SD, нг/г n=4	Точность, %
2,1	2,04±0,05	97,3
4,7	4,93±0,45	105
11	11,87±0,90	108
20	19,8±0,3	98,3
50	56,5±0,5	113
90	99±8	110
453	411±26	90,8
1003	925±57	92,2
2008	2006±87	99,9

Точность и прецизионность методик оценивалась для образцов контроля качества с низкими (QCL), средними (QCM) и высокими (QCH) значениями концентраций KS-389 в биологической матрице, не совпадающих по значению для градуировочных образцов, а также для образцов LLOQ. Результаты анализа образцов контроля качества для биологических матриц, полученные внутри и между аналитическими циклами, приведены в таблице 11. Как видно из таблицы, значения

относительной погрешности не превышают допустимую погрешность рассчитанной концентрации (не более 15% от номинального значения, а для образцов LLOQ - 20%). Точность методик также находилась в границах допустимой погрешности, однако, для образцов гомогенатов мозга (LLOQ) и гомогенатов почек (QCH) наблюдается значительное завышение найденных концентраций. Высокое отклонение от номинального значения объясняется сложностью биологических матриц. В таких случаях регуляторные документы допускают, что более 67% используемых образцов контроля качества должны находиться в пределах ±15% от номинальных значений концентрации. При этом более 50% образцов контроля качества на каждом уровне концентрации также должны укладываться в границы ±15% от номинала.

Таблица 11. Результаты анализа образцов контроля качества.

Биологическая матрица	Тип образца[a)] и концентрация, нг/мл или нг/г	Найденная концентрация±SD, нг/мл или нг/г n=8	Прецизионность (CV), %	Точность, %
Цельная кровь	LLOQ (2)	1,88±0,17	8,8	94,0
	QCL (6)	5,87±0,55	9,5	97,8
	QCM (1000)	1049±67	6,4	105
	QCH (1800)	1853±93	5,0	103
Гомогенат мозга	LLOQ (1)	1,6±0,1	6,4	160
	QCL (4,1)	4,58±0,16	3,5	115
	QCM (44)	42,9±3,6	8,4	97,4
	QCH (74)	76,95±3,75	4,9	104
Гомогенат печени	LLOQ (5,2)	5,10±0,55	11	98,0
	QCL (17)	14,5±1,5	11	85,5
	QCM (1286)	1282±67	5,2	100
	QCH (2003)	1825±166	9,1	91,1
Гомогенат почек	LLOQ (2,1)	2,0±0,04	5,5	95,2
	QCL (6,7)	6,7±0,6	8,8	100
	QCM (1006)	1012±84	8,3	101
	QCH (1825)	2356±235	9,9	129

a) QCL, QCM, QCH – образцы контроля качества в низкой, средней и высокой концентрации агента соответственно; LLOQ – образец НПКО.

Для оценки степени извлечения и матричного эффекта были использованы образцы контроля качества низких (QCL) и высоких (QCH) значений концентраций (табл. 12). Степень извлечения аналита из цельной крови при обработке методом сухого пятна составила 2,56% и 1,89%. Таким образом, метод сухого пятна крови, используемый для пробоподготовки цельной крови при количественном определении KS-389, не обеспечивает максимальной степени

извлечения аналита, несмотря на интенсивный сигнал при анализе методом ВЭЖХ-МС/МС. Однако он удобен для отбора, хранения и транспортировки образцов, что делает его подходящим для фармакокинетических исследований.

Рассчитанные значения степеней извлечения аналита из гомогенатов тканей свидетельствует о практически полном извлечении вещества из матрицы при пробоподготовке (82-101%). Значения матричного эффекта, определенные в соответствующем эксперименте, свидетельствуют об отсутствии влияния соединений, соэкстрагированных из биологических матриц, на сигнал аналита.

Таблица 12. Значения степени извлечения и матричного эффекта для образцов контроля качества.

Биологическая матрица	Тип образца[a)] и концентрация, нг/мл или нг/г	Степень извлечения, % n=6	Относит. погрешность, %	Матричный фактор, %	Относит. погрешность, %
Цельная кровь	QCL (6)	2,56	9,3	98,7	8,3
	QCH (1800)	1,89	5,03	99,1	9,7
Гомогенат мозга	QCL (4)	82	3,5	94,3	4,4
	QCH (74)	87	4,9	95,8	6,9
Гомогенат печени	QCL (17)	97	10	97,2	3,5
	QCH (2003)	91	9,1	97,9	3,9
Гомогенат почек	QCL (6.7)	101	8,8	92,1	5,2
	QCH (1825)	101	9,9	93,6	6,4

a) QCL, QCM, QCH – образцы контроля качества в низкой, средней и высокой концентрации агента соответственно.

При оценке стабильности вещества было выявлено, что концентрация KS-389 не изменяется в течение 24 часов при хранении образцов, экстрагированных из разных биологических матриц, в автосамплере хроматографа, что достаточно для анализа большой серии образцов. При анализе холостых образцов после измерения градуировочного образца с максимальной концентрацией на хроматограммах отсутствуют пики аналита, что свидетельствует об отсутствии переноса вещества в автосамплере хроматографа при анализе серии.

2.2.5. Исследование фармакокинетики KS-389 и его распределения по органам

Эксперименты были выполнены в SPF-виварии ИЦиГ СО РАН при участии м.н.с. Лаборатории высокотехнологического фенотипирования лабораторных животных – генетических моделей патологий человека А. С. Хоцкиной.

Полное исследование фармакокинетики было проведено с участием шести животных после проведения предварительного эксперимента, выбора ведущей лекарственной формы и способа ее введения. В предварительных экспериментах была изучена фармакокинетика на трех группах, состоящих из трех животных, которым вводили агент различными способами, а именно: смесь KS-389 с мелом внутрижелудочно, суспензию KS-389 с Tween-80 внутрижелудочно и внутрибрюшинно. Анализ образцов крови, полученных в данном эксперименте, показал, что лекарственная форма, представляющая суспензию вещества с Tween-80, обеспечивает несколько более высокую биодоступность вещества в организме по сравнению с использованием мела в качестве носителя, поэтому данная форма была выбрана для проведения полной фармакокинетики с участием шести животных, а также при изучении распределения вещества по органам с участием 2 животных на одну временную точку.

На рисунке 42А, Б, В представлены усредненные графики зависимости концентрации KS-389 в цельной крови и органах (мозге, печени, почках), а также графики соотношения содержания вещества в ткани к содержанию вещества в крови. Как видно из рисунка, максимальная концентрация вещества как в крови, так и в органах наблюдается через 1 ч после введения вещества в дозе 5 мг/кг. Максимальная концентрация KS-389 в крови составляет в среднем 53 нг/мл, в мозге - 27 нг/г, а в печени и почках - более 1000 нг/г. После достижения максимума содержание вещества постепенно снижается, а практически полное выведение его из организма происходит через 6 часов.

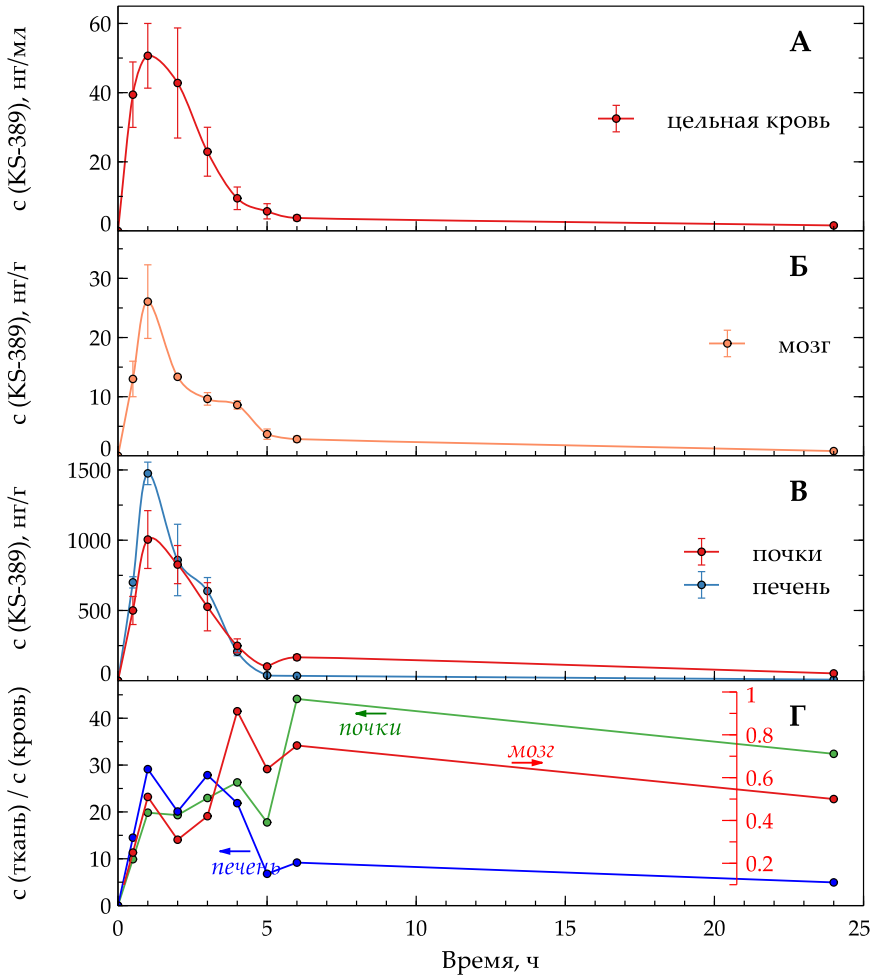


Рисунок 42. Зависимости концентрации KS-389 от времени после внутрибрюшинного введения мышам в дозе 5 мг/кг в цельной крови (А), в мозге (Б), в печени и почках (В), а также графики соотношения концентраций в тканях к цельной крови (Г). Стрелками на рис. (Г) обозначено расположение осей ординат, к которым относятся соответствующие графики.

Основные фармакокинетические параметры, рассчитанные для KS-389 после внутрибрюшинного введения, представлены в таблице 13. Несмотря на то, что внутрибрюшинное введение обеспечивает быстрое всасывание препарата и, как следствие, быструю элиминацию, препарат циркулирует в организме по меньшей мере в течение 10,5 часов, а период полувыведения составляет в среднем 13,3 часа, что может быть достаточно в качестве вспомогательной противоопухолевой терапии.

Таблица 13. Фармакокинетические параметры (среднее значение ± стандартное отклонение) KS-389 после внутрибрюшинного введения мышам (5 мг/кг).

Параметр	**Значение для крови**
$T_{1/2}$, ч	13,3±6,1
T_{max}, ч	1,25±0,61
C_{max}, нг/мл	52±11
$AUC_{0-\infty}$, нг/мл·ч	230±43
$MRT_{0-\infty}$, ч	10,5±6,1
CL, (мг/кг)/(нг/мл)/ч	$(22,4±4,4)×10^{-3}$

$T_{1/2}$ – период полувыведения, T_{max} – время достижения максимальной концентрации, C_{max} – максимальная концентрация, $AUC_{0-\infty}$ – площадь под кривой зависимости концентрации вещества в крови от времени от нуля до бесконечности, $MRT_{0-\infty}$ – среднее время нахождения вещества в организме, CL – общий клиренс.

Разброс значений концентрации как в цельной крови, так и в органах, может быть связан с половыми различиями животных, участвовавших в эксперименте [162,163]. Хотелось бы отметить, что при исследовании распределения агента по органам на каждую временную точку приходится по 2 животных. Для получения полных статистических данных для одной временной точки необходимо получить пять и более значений концентрации. Таким образом, для построения кривых для восьми временных точек потребуется не менее 40 животных, что противоречит современной тенденции сокращения использования животных моделей при разработке новых лекарственных препаратов. Дополнительным фактором, ограничивающим размер выборки в исследовании распределения агента, стала высокая стоимость эксперимента, обусловленная использованием мышиной модели с тяжелым комбинированным иммунодефицитом. Несмотря на малый объем выборки, мы полагаем, что полученные данные адекватно описывают поведение вещества при его внутрибрюшинном введении.

На рис. 42Г представлены зависимости отношения значений концентрации вещества в ткани к концентрации в цельной крови. Значения отношения концентрации в мозге к концентрации в крови находятся в диапазоне от 0 до 1, при этом максимальное значение (≈0.9) наблюдается примерно через 3-4 ч после введения вещества. Через 24 часа данный параметр снижается вдвое. Значение параметра отношения концентрации в печени к концентрации в крови достигает максимума (около 20) через 1 час после введения вещества и сохраняются на этом уровне в течение последующих 2 часов. Затем значение снижается до 7-10, и наблюдается в последующие 24 часа, вероятно, свидетельствует о равновесии концентрации вещества между кровью и печенью. Отношение концентрации в почках к концентрации в крови увеличивается в течение 6 часов после

введения вещества, достигая значения 45. Из полученных данных невозможно сделать вывод о том, является ли это значение максимальным, поскольку отсутствуют данные в промежутке между 6 и 24 часами. Принимая во внимание полученные результаты по расчету соотношения концентрации KS-389 в органах и цельной крови, можно полагать, что вещество достаточно быстро всасывается и попадает в печень, а затем выводится не только с калом, но и с мочой. В данном случае печень является основным органом метаболизма агента из-за достаточно высоких значений соотношения концентрации вещества в печени и крови.

Важно отметить, что вещество способно преодолевать гематоэнцефалический барьер, несмотря на значительное различие в значениях концентрации в мозге и остальных исследуемых органах. Это свидетельствует о возможности использования вещества KS-389 в качестве вспомогательной терапии для лечения опухолей головного мозга при совместном применении с темозоломидом.

2.3. Исследование фармакокинетики агента OL9-116, ингибитора TDP1 на основе усниновой кислоты

2.3.1. Подбор хроматографических и масс-спектрометрических условий анализа

Для масс-спектрометрической детекции соединения OL9-116 в режиме MRM анализировали раствор вещества в смеси вода-ацетонитрил (соотношение 2:8 по объему), содержащей 0.1% муравьиной кислоты. Раствор вводили с использованием встроенного шприцевого насоса непосредственно в масс-спектрометр без проведения хроматографического разделения. При введении раствора вещества в режиме сканирования без фрагментации (+Q1) наблюдалось образование молекулярного иона с m/z= 590,4 Да, соответствующего протонированной молекуле соединения OL9-116 (рис. 43).

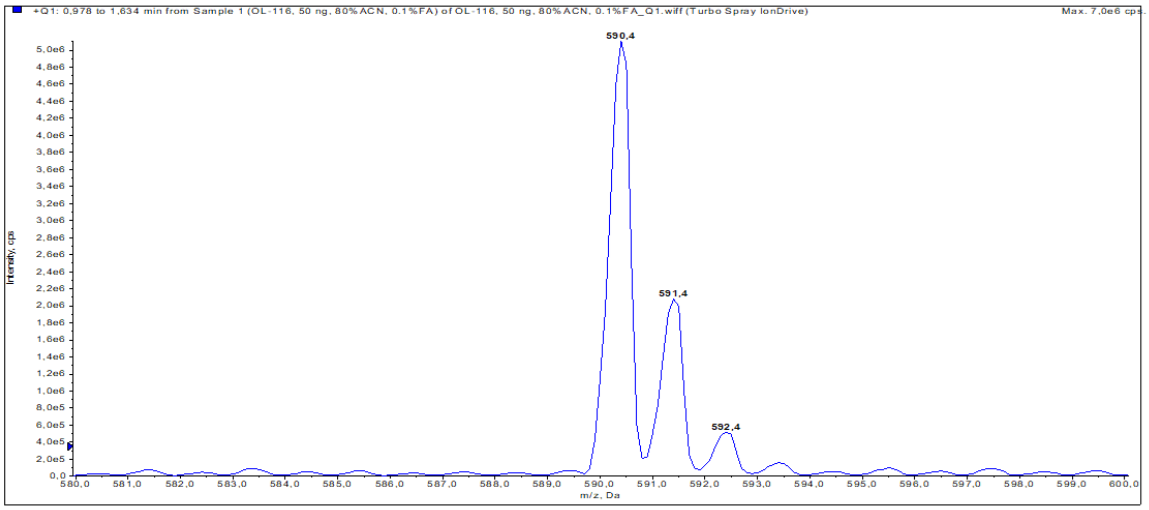


Рисунок 43. Масс-спектр образца OL9-116 в режиме сканирования молекулярных ионов без фрагментации.

При фрагментации этого иона с в режиме соударений наблюдалось образование осколочных ионов разной интенсивности (рис. 44). Для разработки метода детектирования были отобраны наиболее интенсивные ионы с m/z = 534,4, 343,4 и 219,3 Да, для которых в автоматическом режиме были оптимизированы параметры сканирования. Параметры сканирования для внутреннего стандарта (2,5-BDPO), приведенные в таблице 20, были оптимизированы ранее, что позволило использовать их при разработке метода для агента OL9-116.

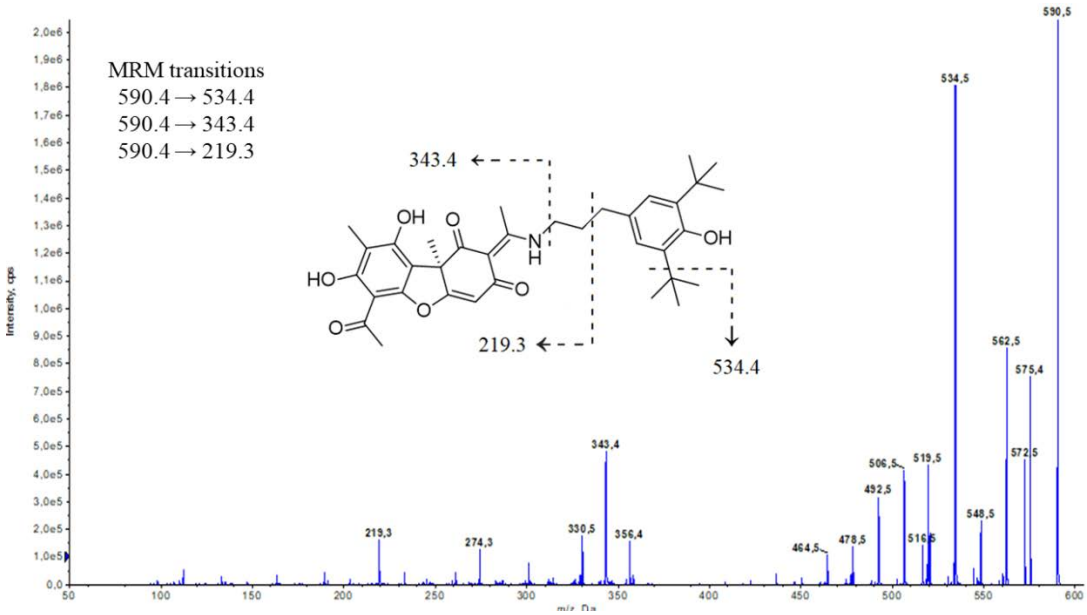


Рисунок 44. Масс-спектр агента OL9-116 в режиме фрагментации, инициированной соударениями.

Для подбора оптимальных условий хроматографического разделения соединения OL9-116 был проведен ряд анализов с использованием градиентного элюирования и различным составом элюентов. В процессе работы было обнаружено, что элюирование вещества происходит при высоком содержании органического компонента, а чувствительность разработанного метода достаточно высока: интенсивность пика вещества при анализе его в виде раствора 50 нг/мл составляет 3.4×10^4 единиц (рис. 45А). Аналогичным способом были подобраны и оптимизированы условия для внутреннего стандарта 2,5-BDPO (рис. 45Б).

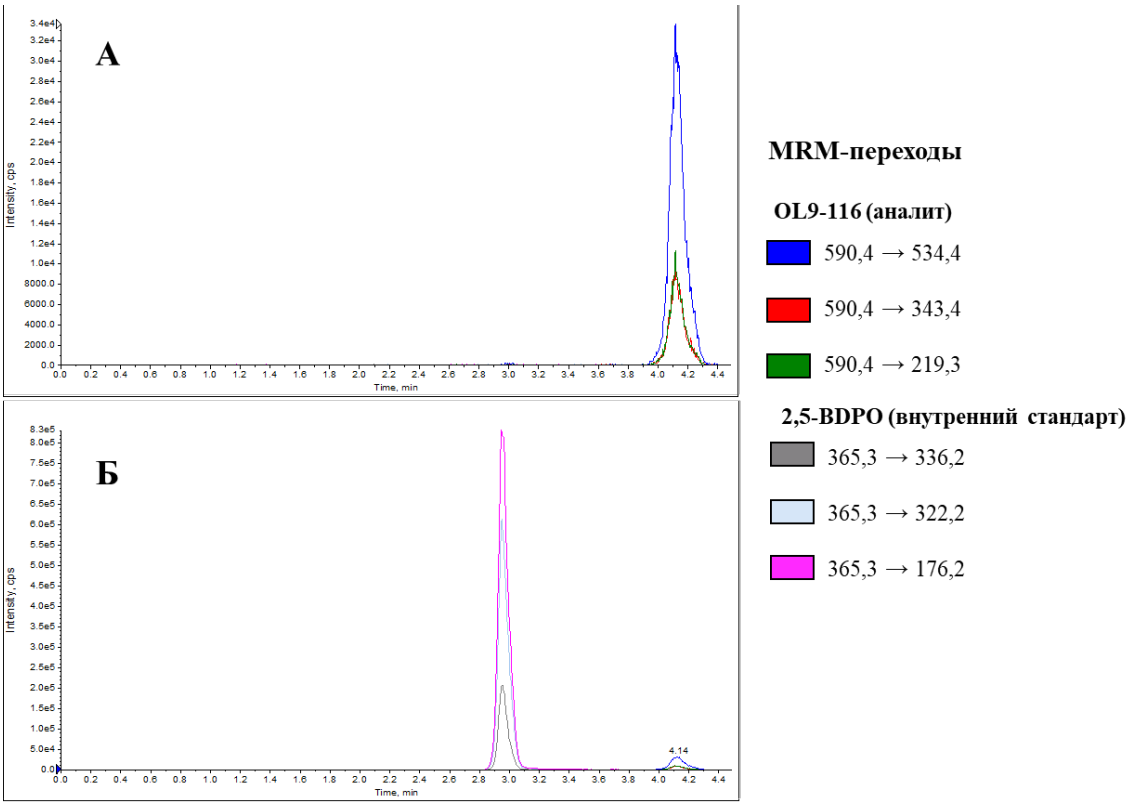


Рисунок 45. Хроматограмма раствора OL9-116 с концентрацией 50 нг/мл в разработанном профиле градиента элюирования (А), хроматограмма образца OL9-116, содержащий внутренний стандарт в концентрации 100 нг/мл (Б).

При этом было обнаружено, что более интенсивное образование молекулярных ионов происходит в системе вода – ацетонитрил с добавлением 0.1% муравьиной кислоты по сравнению с системой вода – метиловый спирт с тем же модификатором системы. Время удерживания для аналита составило 4,14 минуты, а для внутреннего стандарта 2,95 минуты, что позволяет проводить хроматографическое разделение для количественного определения OL9-116 в биологических матрицах.

2.3.2. Разработка методики пробоподготовки образцов цельной крови и исследование стабильности OL9-116 в цельной крови

Поскольку исследование фармакологических свойств агента OL9-116 планируется проводить на мышах, исследование его фармакокинетики, а также разработку метода пробоподготовки следует выполнять на мышах и цельной мышиной крови, соответственно. Использование плазмы или сыворотки крови мыши в данных экспериментах затруднительно, поскольку объем крови, отбираемой у животного, весьма ограничен. В противном случае, возникает потребность в использовании большого числа животных.

В нашей работе были исследованы различные способы пробоподготовки цельной крови мыши: осаждение смесью «метанол – водный 0.2 M $ZnSO_4$ (8:2)»; осаждение водным 0.2 M $ZnSO_4$ с последующей экстракцией ацетонитрилом; приготовление и обработка сухих пятен крови; обработка образца цельной крови смесью «ацетонитрил/ацетон/метанол (8:1:1)». Для сравнения методов пробоподготовки в каждом эксперименте обрабатывали образец цельной крови объемом 10 мкл. При проведении пробоподготовки сухих пятен крови диск вырезали полностью. На рис. 46 представлена диаграмма сравнения выбранных способов пробоподготовки для образца цельной крови, содержащей агент OL9-116 в концентрации 2000 нг/мл.

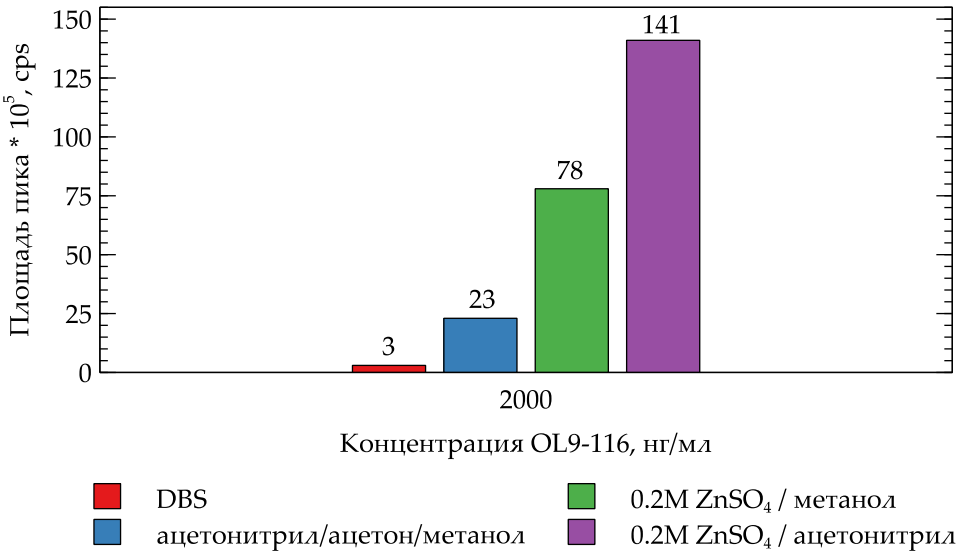


Рисунок 46. Диаграмма значений площади пика, полученных при анализе образцов цельной крови, содержащих агент OL9-116 в концентрации 2000 нг/мл, при обработке различными методами.

При обработке сухих пятен крови был получен пик низкой интенсивности, что свидетельствует о низкой степени извлечения агента из матрицы. Возможно, это связано с высокой

степенью сродства агента к целлюлозе или отсутствием предварительной обработки сухого пятна крови [164]. Осаждение образца смесью органических растворителей показала недостаточный депротеинизирующий эффект в сравнении с осаждением в присутствии сульфата цинка. В результате оптимальным с нашей точки зрения способом пробоподготовки оказалась обработка образца крови водным сульфатом цинка (0.2 М) и последующая экстракция образца ацетонитрилом.

Выбранный способ пробоподготовки был использован для изучения стабильности вещества в цельной крови мыши. На рисунке 47 приведен график зависимости относительной концентрации вещества от времени выдерживания образца. Видно снижение значений площади пика вещества в промежутке от 5 до 10 мин, которое, по всей вероятности, соответствует процессу адсорбции вещества на эритроцитах, белках и других компонентах крови. После указанного времени площади пика вещества остается неизменной, что говорит о его стабильности в цельной крови мыши и отсутствии ферментов, участвующих в биотрансформации агента.

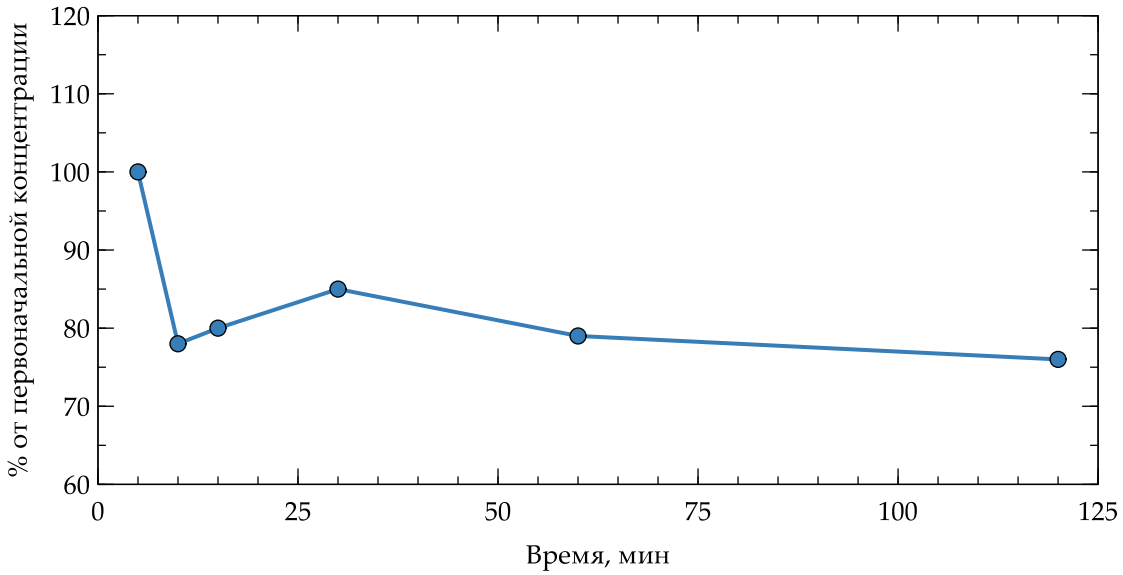


Рисунок 47. График зависимости относительной концентрации OL9-116 от времени при анализе его в образцах цельной крови мыши.

2.3.3. Валидация методики количественного определения OL9-116 в цельной крови

Валидацию методики количественного определения OL9-116 в цельной крови мыши проводили по параметрам, представленном в разделе 3.4, согласно требованиям международных регуляторных документов.

Селективность методики была показана при анализе холостых проб крови и образцов, содержащих OL9-116. Репрезентативные хроматограммы показаны на рис. 48А, Б. На хроматограмме холостого образца цельной крови (рис. 48А) показано отсутствие пиков веществ, совпадающих по времени удерживания с пиком определяемого вещества и внутреннего стандарта. Таким образом, подтверждена селективность разработанной аналитической методики, что позволяет провести количественное определение OL9-116 в присутствии других компонентов.

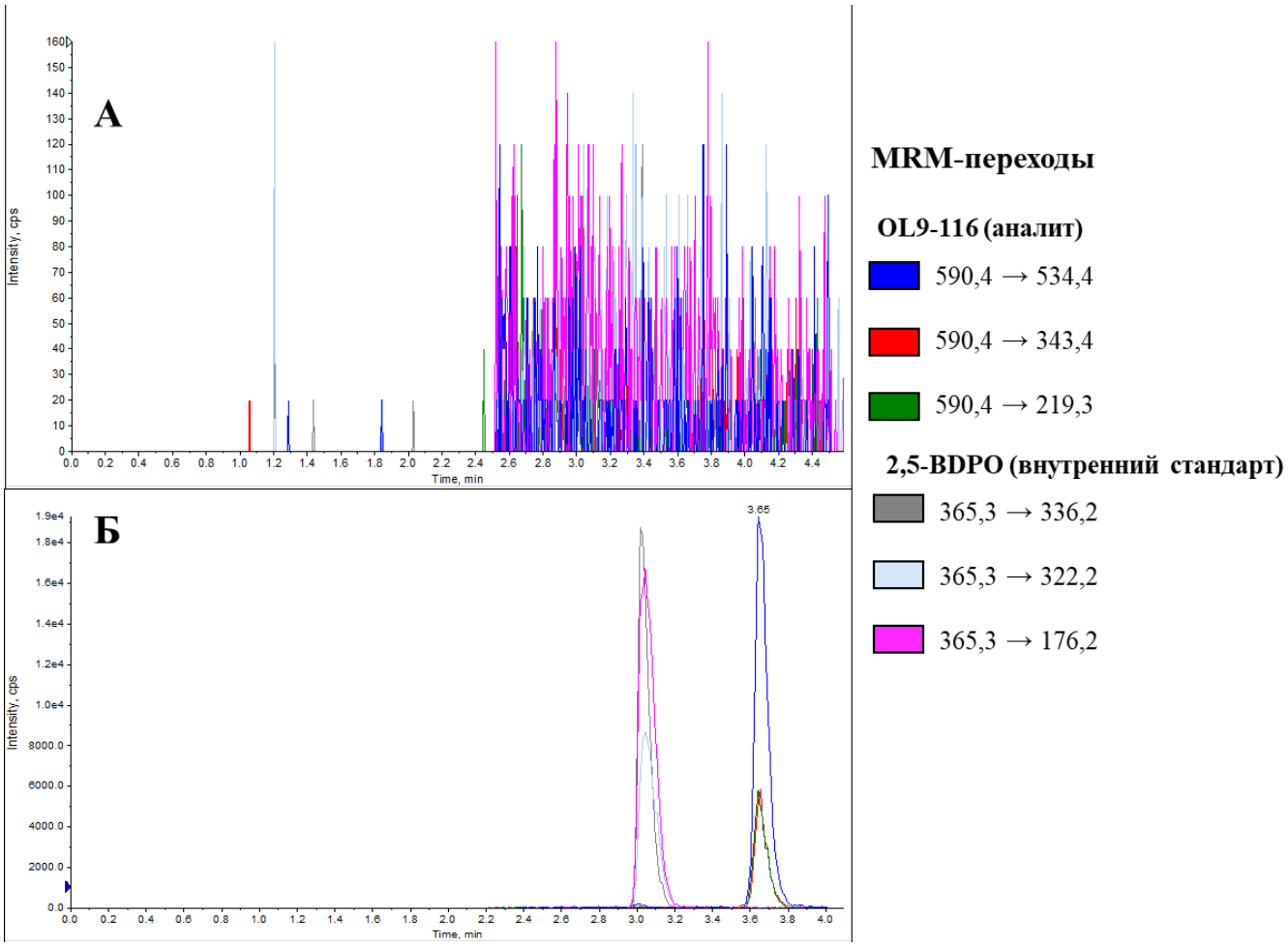


Рисунок 48. Хроматограмма холостого образца крови (А) и образца с добавлением OL9-116 в концентрации 1000 нг/мл (Б).

Для построения градуировочной зависимости использовали образцы цельной крови, содержащие агент OL9-116 в концентрации 15, 30, 100, 200, 400, 500, 1000, 2000, 5000 нг/мл. Методика позволяет количественно определить агент в диапазоне 15-5000 нг/мл. Градуировочная зависимость показала наилучшее соответствие (r^2 = 0,997) при описании уравнением линейной регрессии $y = 6{,}112\times10^{-5}x - 8{,}021\times10^{-6}$ (рис. 49).

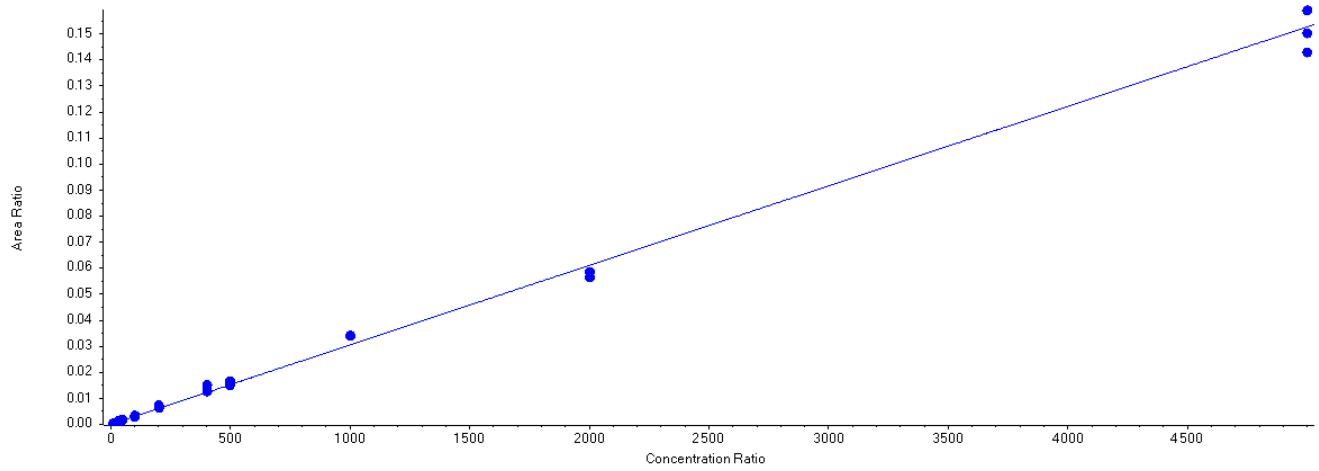


Рисунок 49. Градуировочная зависимость для количественного определения OL9-116 в цельной крови в диапазоне 15-5000 нг/мл.

Нижний предел количественного определения составил 15 нг/мл, а отклонение от теоретического значения составило ±8,6%. Результаты обратного расчета концентраций градуировочных образцов по полученной кривой приведены в таблице 14.

Таблица 14. Найденные значения концентрации OL9-116 в градуировочных образцах цельной крови.

Концентрации вещества в цельной крови, нг/мл	Найденная концентрация±SD, нг/мл n=4	Точность, %
15	13,7±1,2	91,3
30	35,5±8,3	115
100	107±7	107
200	217±15	108
400	455±37	114
500	516±39	103
1000	1125±17	112
2000	1889±46	94,43
5000	4936±262	98,72

Точность и прецизионность методик оценивалась для образцов контроля качества с низкими (QCL), средними (QCM) и высокими (QCH) значениями концентраций OL9-116 в цельной крови, не совпадающих по значению для градуировочных образцов, а также для образцов LLOQ. Результаты по оценке точности анализа образцов контроля качества для биологической матрицы,

полученные внутри и между аналитическими циклами не превышали 8,2 и 7,7 % соответственно (табл. 15). Прецизионность, измеренная как стандартное отклонение, была ниже 8,4% (внутри дневного цикла) и 8,6% (между дневными циклами), что соответствует требованиям к биоаналитическим методикам.

Таблица 15. Результаты анализа образцов контроля качества.

Тип[a)] и концентрация образца, нг/мл	Внутри дневного цикла, n=6		Между дневными циклами, n=6	
	Точность (%)	Прецизионность (CV, %)	Точность (%)	Прецизионность (CV, %)
LLOQ (15)	107,1	8,4	106,6	8,6
QCL (50)	96,9	7,5	93,8	6,8
QCM (2500)	108,2	2,5	107,7	3,2
QCH (4500)	105,2	8,0	104,6	7,5

a) QCL, QCM, QCH – образцы контроля качества в низкой, средней и высокой концентрации агента соответственно.

Значение степени извлечения OL9-116, измеренное для образцов контроля качества низкой (QCL) и высокой (QCH) концентраций, составило 61% и 69%, соответственно, что указывает на удовлетворительный депротеинизирующий эффект $ZnSO_4$ и ACN. Матричный фактор, оцененный для тех же образцов, составил 82% и 90%, соответственно.

Оценку стабильности образцов в автосамплере хроматографа проводили на образцах контроля качества. По результатам повторного анализа через 24 часа было показано, что значения площади пиков не отклоняются более чем на 15% в сравнении со свежеприготовленными образцами (рис. 50).

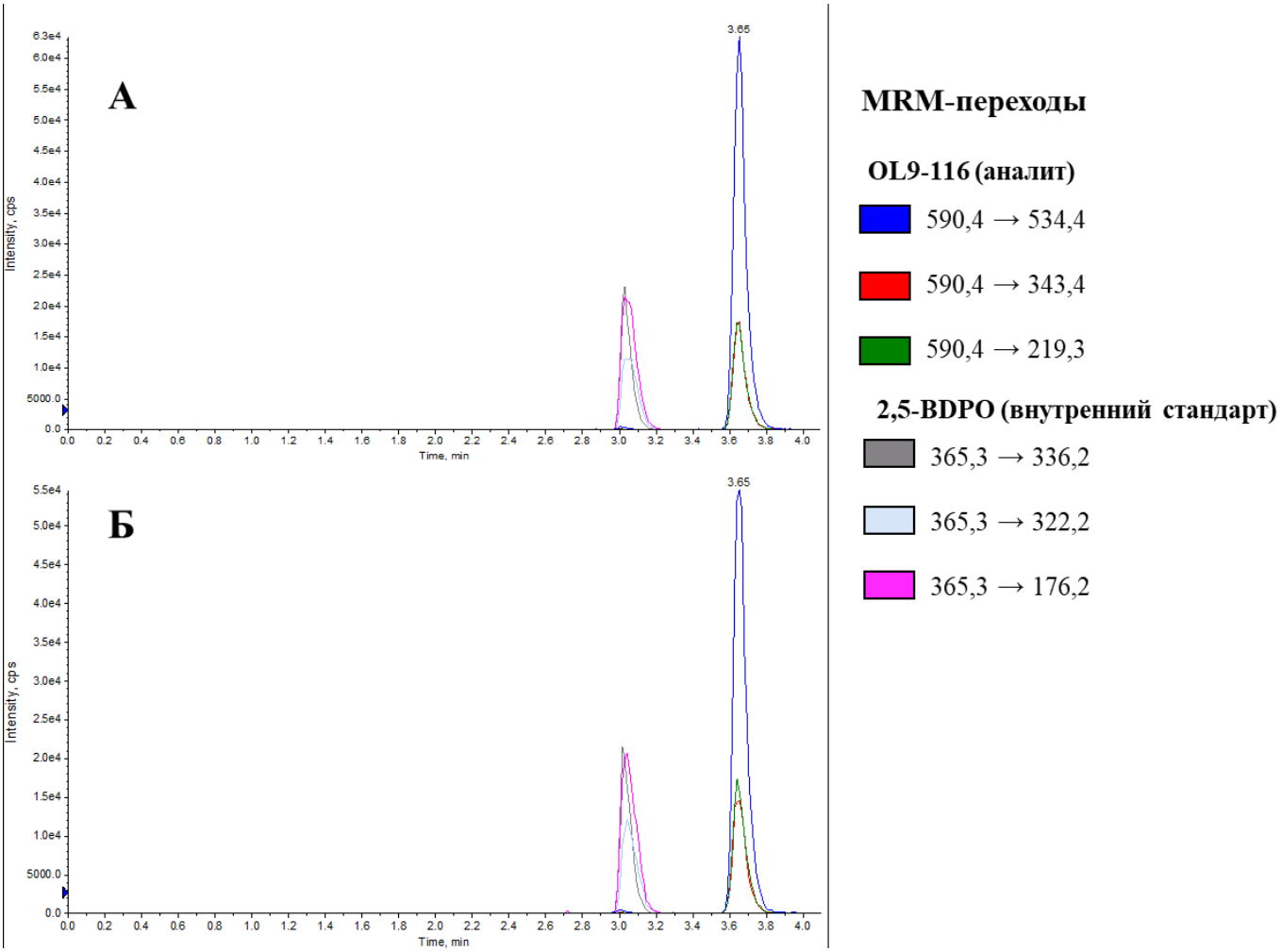


Рисунок 50. Хроматограммы образца цельной крови, содержащей OL9-116 (2500 нг/мл, QCH): А) анализ свежеприготовленного образца; Б) повторный анализ через 24 часа.

При анализе холостых образцов после измерения градуировочного образца с максимальной концентрацией (5000 нг/мл) на хроматограммах отсутствуют пики аналита, что свидетельствует об отсутствии переноса вещества в автосамплере хроматографа при анализе серии (рис. 51).

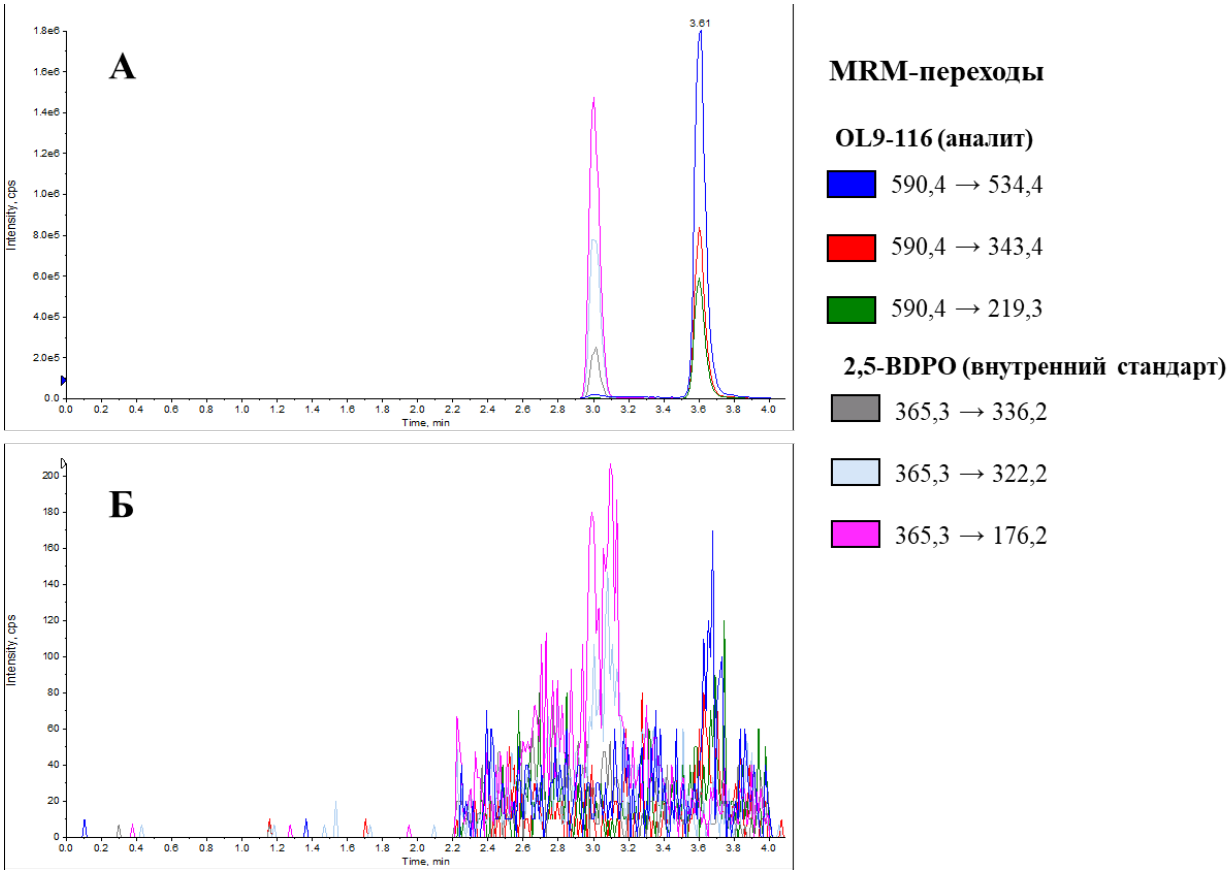


Рисунок 51. А) хроматограмма образца цельной крови, содержащей OL9-116 в концентрации 5000 нг/мл; Б) хроматограмма холостого образца цельной крови, полученная после анализа образца, содержащего 5000 нг/мл OL9-116.

Таким образом, была разработана и валидирована методика количественного определения агента OL9-116 в цельной крови мышей методом ВЭЖХ-МС/МС. Полученные результаты показывают, что методика отвечает требованиям международных регуляторных документов и пригодна для количественного определения OL9-116 в крови мышей.

2.3.4. Исследование фармакокинетики агента OL9-116

Разработанная методика была использована для изучения фармакокинетики OL9-116 при его внутрижелудочном введении мышам в дозе 150 мг/кг на группе из шести мышей. На рис. 52 представлен график зависимости концентрации вещества в крови животных от времени. На рис. 52А отражены индивидуальные графики для каждого животного, а на рис. 52Б — усредненный график по шести экспериментальным животным. Как видно из графиков, при введении вещества оно довольно быстро всасывается, что приводит к увеличению его концентрации. Группу из 6

животных можно условно разделить на две подгруппы: наблюдается, что в первой подгруппе максимальная концентрация достигалась через 1,5 часа, а во второй - через 4 часа. Максимальная концентрация OL9-116, наблюдаемая для обеих подгрупп, составляла около 4000 нг/мл. После достижения максимальной концентрации вещество постепенно выводилось из организма, однако, даже через 24 часа после введения концентрация вещества в крови была достаточно высокой и составила около 500 нг/мл.

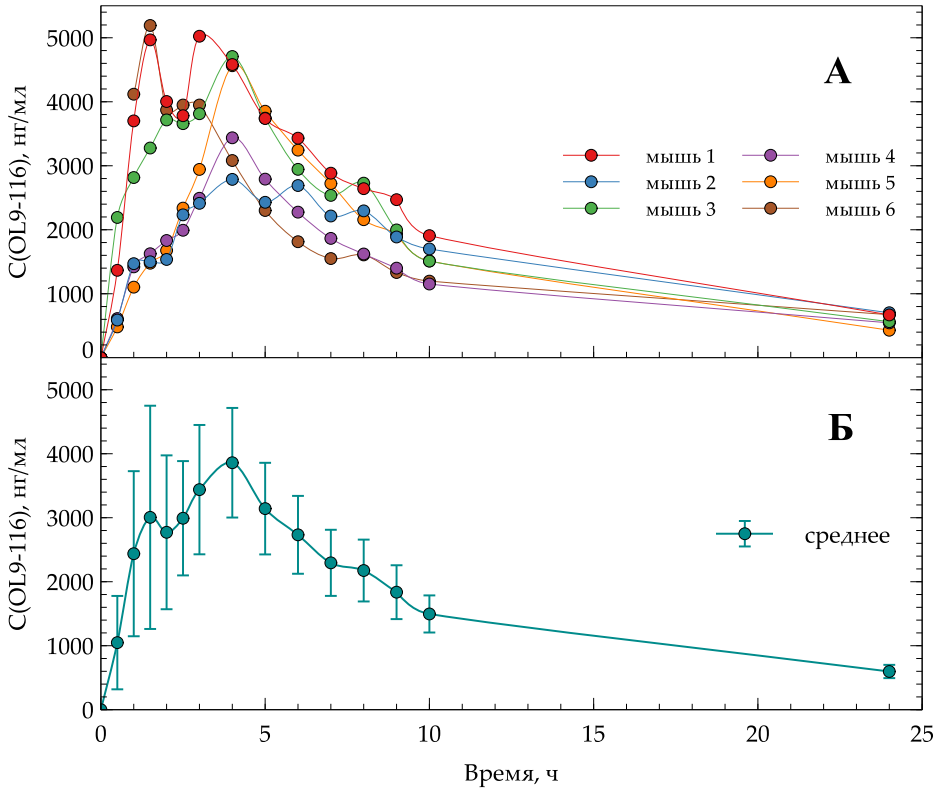


Рисунок 52. Зависимость концентрации OL9-116 в цельной крови от времени после внутрижелудочного введения в дозе 150 мг/кг: А) индивидуальные графики для каждого животного; Б) усредненные значения (представлен в виде средних значений ± стандартное отклонение).

Фармакокинетические параметры, рассчитанные для OL9-116 после внутрижелудочного введения, представлены в таблице 16. Вещество циркулирует в общем кровотоке по меньшей мере в течение 14,2 часов, а период полувыведения составляет в среднем 10,4 часа после однократного введения, что может быть достаточно для применения OL9-116 в качестве вспомогательного препарата в противоопухолевой терапии.

Таблица 16. Фармакокинетические параметры (среднее значение ± стандартное отклонение) для OL9-116 после внутрижелудочного введения мышам в дозе 150 мг/кг.

Параметр	Рассчитанное значение
$T_{1/2}$, ч	10,4 ± 3,2
T_{max}, ч	3,4 ± 1,0
C_{max}, нг/мл	4284 ± 958
$AUC_{0-\infty}$, нг/мл*ч	$(4,94 \pm 0,69)\times10^{4}$
$MRT_{0-\infty}$, ч	14,2 ± 3,4
CL, (мг/кг)/(нг/мл)/ч	$(3,09 \pm 0,43)\times10^{-3}$

$T_{1/2}$ – период полувыведения, T_{max}– время достижения максимальной концентрации, C_{max} – максимальная концентрация, $AUC_{0-\infty}$ – площадь под кривой зависимости концентрации вещества в крови от времени от нуля до бесконечности, $MRT_{0-\infty}$ – среднее время нахождения вещества в организме, CL – общий клиренс.

Полученные данные указывают на то, что биодоступность соединения OL9-116, вероятно, очень низкая, в сравнении с опубликованными данными по фармакокинетике усниновой кислоты [165], поскольку в данной работе при внутрижелудочном введении усниновой кислоты в дозе 5 мг/кг максимальная концентрация вещества в крови в среднем составляла 1126 нг/мл. При этом действие агента OL9-116 имеет пролонгированный эффект, в отличие от усниновой кислоты. Для расчета биодоступности вещества требуется изучить его фармакокинетику и рассчитать соответствующие параметры в эксперименте с его внутривенным введением, что будет целью наших дальнейших экспериментов.

При низкой биодоступности агента одним из способов увеличения концентрации в системном кровотоке является изменение способа введения вещества. Внутрибрюшинное введение относят к парентеральному пути и часто используют в качестве альтернативы внутривенному введению мышам. При внутрибрюшинном введении абсорбция вещества происходит, в первую очередь, через портальное кровообращение, богатое большой капиллярной сетью, поэтому данный способ обладает высокой биодоступностью. Основным отличием внутрибрюшинного способа введения от внутрижелудочного является то, что вещество не подвергается инактивации хлористоводородной кислотой желудочного сока, ферментами слизистой оболочки тонкой кишки, не образует невсасывающиеся комплексы и попадает в печень через воротную вену и далее в системный кровоток.

В предварительном эксперименте группе мышей (n=6) внутрибрюшинно вводили суспензию вещества в дозе 150 мг/кг (доза аналогична внутрижелудочному введению). Кровь

отбирали через 15, 30 минут 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 часа. При введении животным лекарственной формы максимальное значение концентрации составило 4,5 мг/мл, что является очень высокими значениями для работы на высокочувствительном оборудовании. Увеличение максимальной концентрации в 1000 раз при внутрибрюшинном введении в сравнении с внутрижелудочным позволило нам уменьшить дозу введения в 30 раз для данного способа введения животным.

Для исследования фармакокинетики OL9-116 при внутрибрюшинном введении группе из восьми мышей вводили лекарственную форму в дозе 5 мг/кг. На рис. 53 представлен график зависимости концентрации вещества в крови животных от времени. На рис. 53А отражены индивидуальные графики для каждого животного, а на рис. 53Б — усредненный график по семи экспериментальным животным. Как видно из графиков, при введении вещества оно довольно быстро всасывается: через 30 минут с момента введения суспензии концентрация вещества составляет 1950 нг/мл. Максимальная концентрация OL9-116 в среднем составляет 4418 нг/мл и достигается через 1,5-2,5 часа после введения. После достижения максимальной концентрации вещество постепенно выводилось из организма, однако, спустя 10 часов после введения концентрация вещества в крови была достаточно высокой и составила более 1000 нг/мл. При рассмотрении индивидуальных фармакокинетических зависимостей (рис. 53А) можно увидеть, что отсутствует стадия выведения вещества из организма для некоторых животных (мыши 2, 5). Мы предполагаем, что вещество накапливается в тканях и постепенно высвобождается в кровоток. Возможно, стадия выведения OL9-116 находится в промежутке после 10 часов с момента введения вещества.

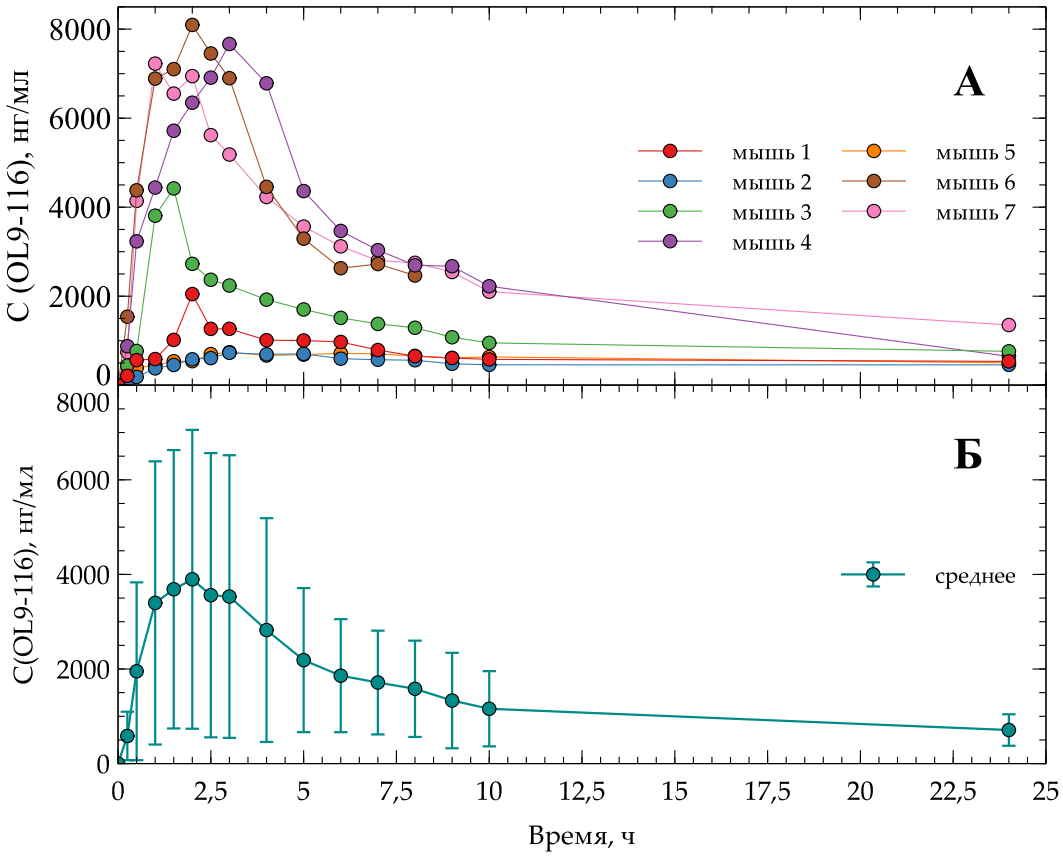


Рисунок 53. Графики зависимости концентрации OL9-116 в цельной крови от времени после внутрибрюшинного введения в дозе 5 мг/кг: А) индивидуальные графики для каждого животного; Б) усредненные значения (представлен в виде средних значений ± стандартное отклонение SD).

Фармакокинетические параметры, рассчитанные для OL9-116 после внутрижелудочного введения, представлены в таблице 17. Высокие значения стандартных отклонений для рассчитанных фармакокинетических параметров связаны с недостатком данных о концентрации на промежутке от 10 до 24 часов и высокими концентрациями вещества даже спустя 24 часа. Значение общего клиренса достаточно мало, что говорит о длительном нахождении вещества в кровотоке. Для расчета параметров с меньшей ошибкой важно исследовать фармакокинетику в течение 48 часов, что будет являться предметом дальнейшей работы.

Таблица 17. Фармакокинетические параметры (среднее значение ± стандартное отклонение) для OL9-116 после внутрибрюшинного введения мышам в дозе 5 мг/кг.

Параметр	Рассчитанное значение
$T_{1/2}$, ч	8,55±4,83
T_{max}, ч	2,21±0,75
C_{max}, нг/мл	4418±3039
$AUC_{0-\infty}$, нг/мл*ч	$(3,47±1,78)\times10^{4}$
$MRT_{0-\infty}$, ч	12±7
CL, (мг/кг)/(нг/мл)/ч	$(1,95±1,09)\times10^{-4}$

T_{max}– время достижения максимальной концентрации, C_{max}– максимальная концентрация, $AUC_{0-\infty}$ – площадь под кривой зависимости концентрации вещества в крови от времени от нуля до бесконечности, $MRT_{0-\infty}$ – среднее время нахождения вещества в организме, CL – общий клиренс.

Проводя сравнение двух фармакокинетических зависимостей и рассчитанных параметров для внутрижелудочного введения в дозе 150 мг/кг и внутрибрюшинного введения в дозе 5 мг/кг, стоит обратить внимание на то, что максимальное значение концентрации достигается через 2 и 3 часа после введения суспензий для обоих случаев соответственно. При этом максимальная концентрация вещества в крови после внутрибрюшинного введения в сниженной дозе практически совпадает с таковой, наблюдающейся при внутрижелудочном введении в дозе 150 мг/кг. Значения площадей под кривой для двух усредненных фармакокинетических зависимостей схожи по порядку величины, однако, выше при внутрибрюшинном введении. Увеличение площади под кривой может быть связано с высокой биодоступностью вещества при данном способе введения. Таким образом, было обнаружено, что внутрибрюшинное введение агента OL9-116 значительно повышает его биодоступность и позволяет снизить дозу в 30 раз.

2.3.5. Исследование противоопухолевого эффекта OL9-116 в комбинации с топотеканом в различных схемах на модели карциномы легких Льюис

Данные по исследованию противоопухолевого эффекта агента OL9-116 в сочетании с топотеканом были получены и предоставлены сотрудниками Лаборатории биоорганической химии ферментов ИХБФМ СО РАН Корниенко Т.Е., к.х.н. Захаренко А.Л. под руководством д.х.н., акад. РАН, проф. О.И. Лаврик и сотрудником ФИЦ Институт цитологии и генетики, к.б.н. Поповой Н.А. (см. приложение 1).

Чен и соавторы [166] изучали фармакокинетику топотекана при его введении внутривенно и внутрибрюшинно мышам. Было установлено, что при внутрибрюшинном введении вещества в дозе 10 мг/кг его максимальная концентрация в крови достигается менее чем через 5 минут, после чего происходит резкое снижение содержания. Падение концентрации топотекана в 2 раза происходит примерно через 1,5 часа, а через 3-4 часа наблюдается десятикратное снижение (рис. 54).

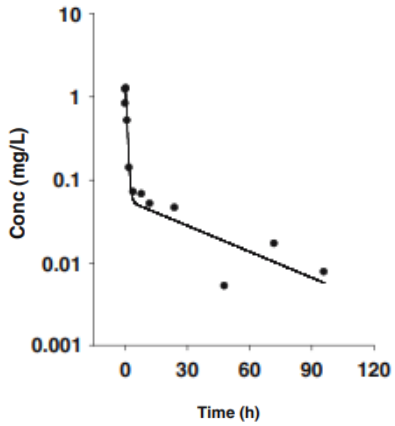


Рисунок 54. Фармакокинетический профиль топотекана в плазме крови мыши при внутрибрюшинном введении в дозе 10 мг/мг (адаптировано из [166]).

Поскольку агент OL9-116 усиливает действие топотекана, что приводит к уменьшению метастазов и размеров опухоли, нами была предложена новая схема терапии топотеканом, учитывая фармакокинетические особенности OL9-116 и топотекана. Измененная схема заключалась в последовательном введении веществ: сначала вводить животным агент OL9-116, после чего через 3 часа ввести топотекан. Таким образом, максимальное значение концентрации топотекана достигается в максимуме концентрации OL9-116, что позволит усилить действие обоих агентов.

Введение топотекана в сочетании с OL9-116 одновременно (внутрибрюшинно в дозе 5 мг/кг и внутрижелудочно 150 мг/кг) приводит к подавлению роста опухоли на 31,2% и 44,3% соответственно. Полученные значения по весу первичного опухолевого узла для группы OL9-116 150 мг/кг + топотекан (одновременно) имеют больший разброс. Таким образом, увеличение дозы OL9-116 не оказывает значительного противоопухолевого эффекта при одновременном введении с топотеканом. При введении топотекана в момент максимумальной концентрации OL9-116 общий противоопухолевый эффект был значительно выше в сравнении с результатами в группах животных, которым соединение OL9-116 и топотекан вводили одновременно или применяли

топотекан в качестве монотерапии. Комбинация OL9-116 внутрижелудочно в дозе 150 мг/кг с топотеканом, введенным через 3 часа, привела к подавлению роста опухоли на 74,5%, что вдвое выше, чем в группе, в которой OL9-116 и топотекан вводили одновременно (подавление роста опухоли на 31,2%, рис. 55). Внутрибрюшинное введение OL9-116 в дозе 5 мг/кг в сочетании с топотеканом, введенным через 2 часа, подавляет рост опухоли на 54,5%.

Кроме того, был отмечен рост антиметастатического эффекта при применении новой схемы введения OL9-116 и топотекана в сравнении с группами животных, которые получали комбинацию веществ одновременно или в качестве монотерапии.

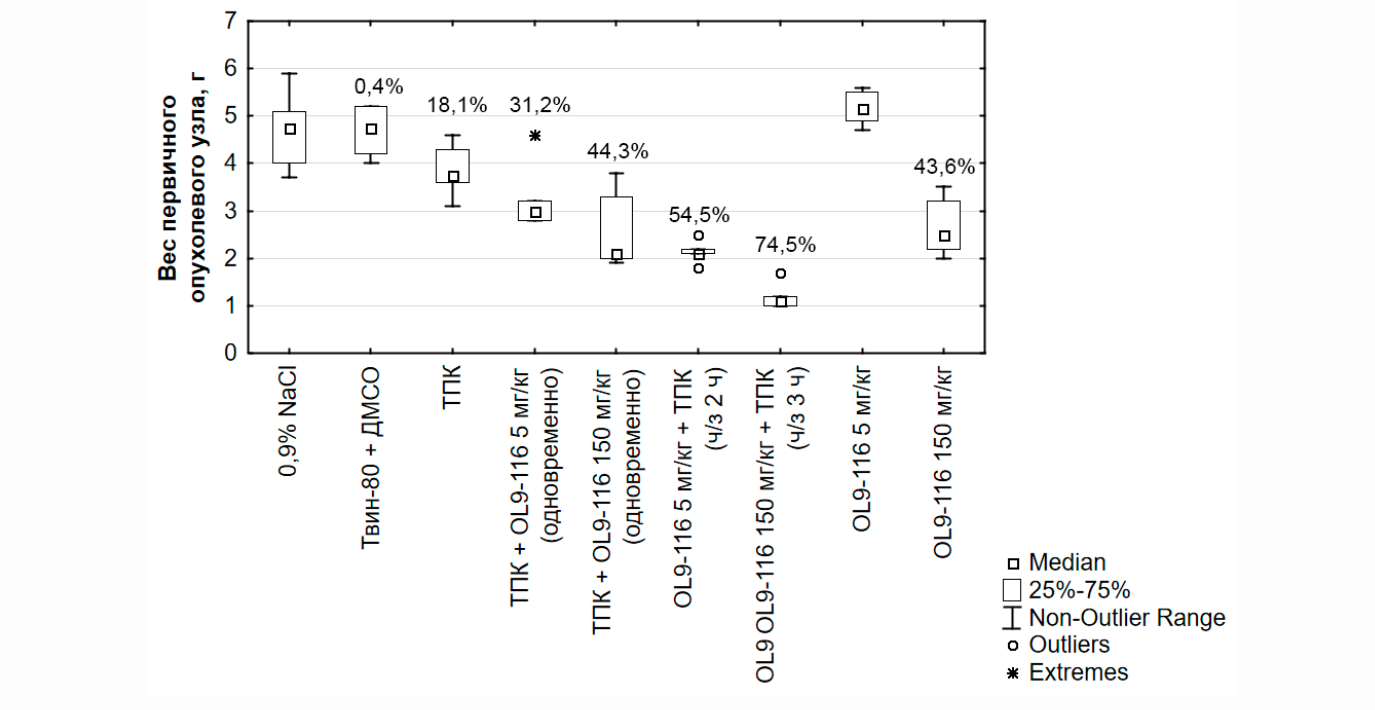


Рисунок 55. Влияние топотекана, OL9-116 и их комбинаций на массу первичного опухолевого узла у мышей на 18-ый день после внутримышечной трансплантации карциномы легких Льюиса. Значения на графике представляют % снижения массы первичного опухолевого узла.

Таким образом, исследование фармакокинетики OL9-116 позволило скорректировать схему введения терапевтического коктейля для достижения максимального терапевтического эффекта в экспериментах *in vivo*. Введение топотекана в максимальной концентрации OL9-116 в крови мышей оказалось значительно более эффективным в отношении массы первичного опухолевого узла, его размера и количества метастазов в легких, чем одновременное введение веществ и их применение в качестве монотерапии. Снижение дозы агента OL9-116 в 30 раз и изменение способа его введения оказало сопоставимый противоопухолевый эффект при применении в комбинации с

топотеканом, введенным через 2 часа, в сравнении с группой животных, которые получали ингибитор TDP1 внутрижелудочно в дозе 150 мг/кг и топотекан через 3 часа.

2.4. Исследование распределения агента OL9-116 в органах

2.4.1. Оптимизация условий хроматографического разделения

Для количественного определения OL9-116 в цельной крови был ранее разработан метод ВЭЖХ-МС/МС, описанный в разделе 2.3.1, в котором в качестве внутреннего стандарта использовался 2,5-BDPO. Однако в предварительных экспериментах с гомогенатами легких было обнаружено, что вещество дает нестабильный аналитический сигнал, что ограничивает его использование. Это, вероятно, связано с влиянием матрицы, поэтому при работе с гомогенатами тканей в качестве внутреннего стандарта был выбран гидрохлорид 2-адамантиламина (2-Ad). Изменение внутреннего стандарта потребовало оптимизации хроматографического метода для определения OL9-116.

Ранее в качестве элюента Б был выбран ацетонитрил, содержащий 0.1 об. % муравьиной кислоты. Как нами было показано ранее, использование 2-Ad в качестве внутреннего стандарта не позволяет применять его для анализа на обращенно-фазовом сорбенте без разбавления образца водой. По этой причине для данного исследования в качестве элюента Б был взят метанол, содержащий 0.1 об. % муравьиной кислоты. Предварительные эксперименты показали, что применение этого элюента как органического компонента подвижной фазы не приводит к уменьшению интенсивности пика OL9-116, более того, при анализе одного и того же образца сигнал этого вещества был выше.

Для уменьшения длительности хроматографического анализа была увеличена скорость элюирования с 250 до 300 мкл/мин. Время удерживания OL9-116 составило 5,55 минуты, а внутреннего стандарта 4,0 минуты (рис. 56). Общее время анализа, включая стадию уравновешивания хроматографической колонки, одного образца составило 8,5 минут, что ускорило время анализа на 1,5 минуты. Скорость проведения анализа одного образца является определяющим фактором при разработке хроматографического метода, поскольку сокращает длительность анализа большой серии образцов.

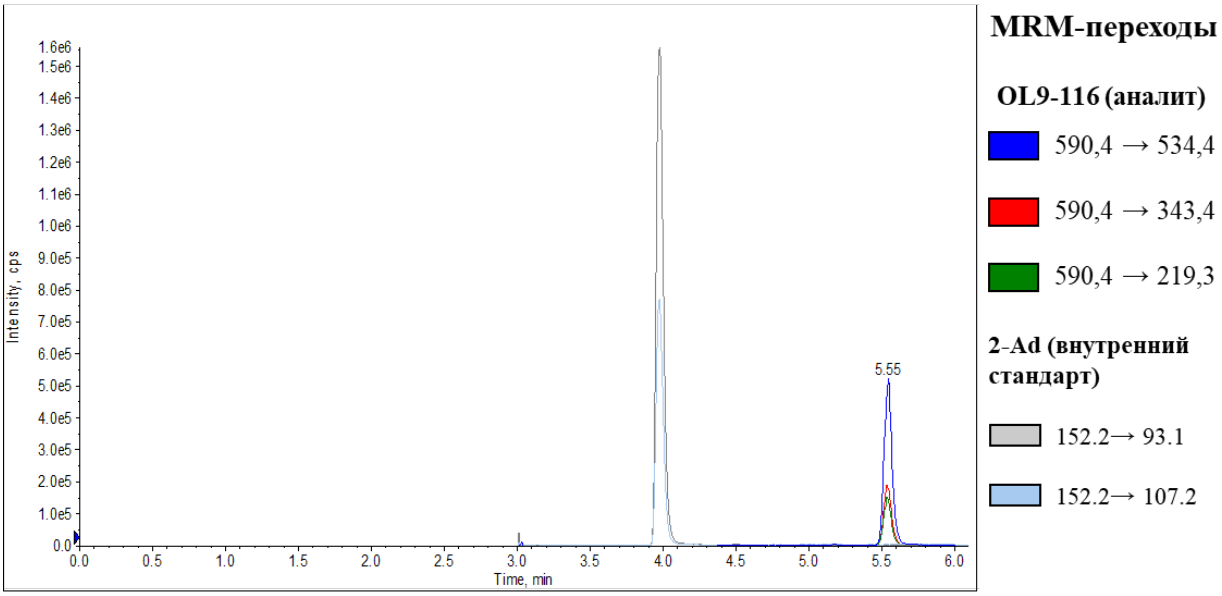


Рисунок 56. Хроматограмма образца гомогената легких мыши в оптимизированных условиях хроматографического разделения.

При анализе серии градуировочных образцов печени было обнаружено, что происходит перенос внутреннего стандарта. Проверка переноса веществ является одним из пунктов валидации биоаналитической методики. Эффект переноса может быть связан как с загрязнением растворителей, используемых при пробоподготовке, так и недостаточной промывки иглы автосамплера между отбором проб. В качестве промывочного растворителя была использована смесь вода:метанол (1:1). При замене промывочного растворителя на чистый ацетонитрил удалось снизить эффект переноса аналита и внутреннего стандарта (рис. 57).

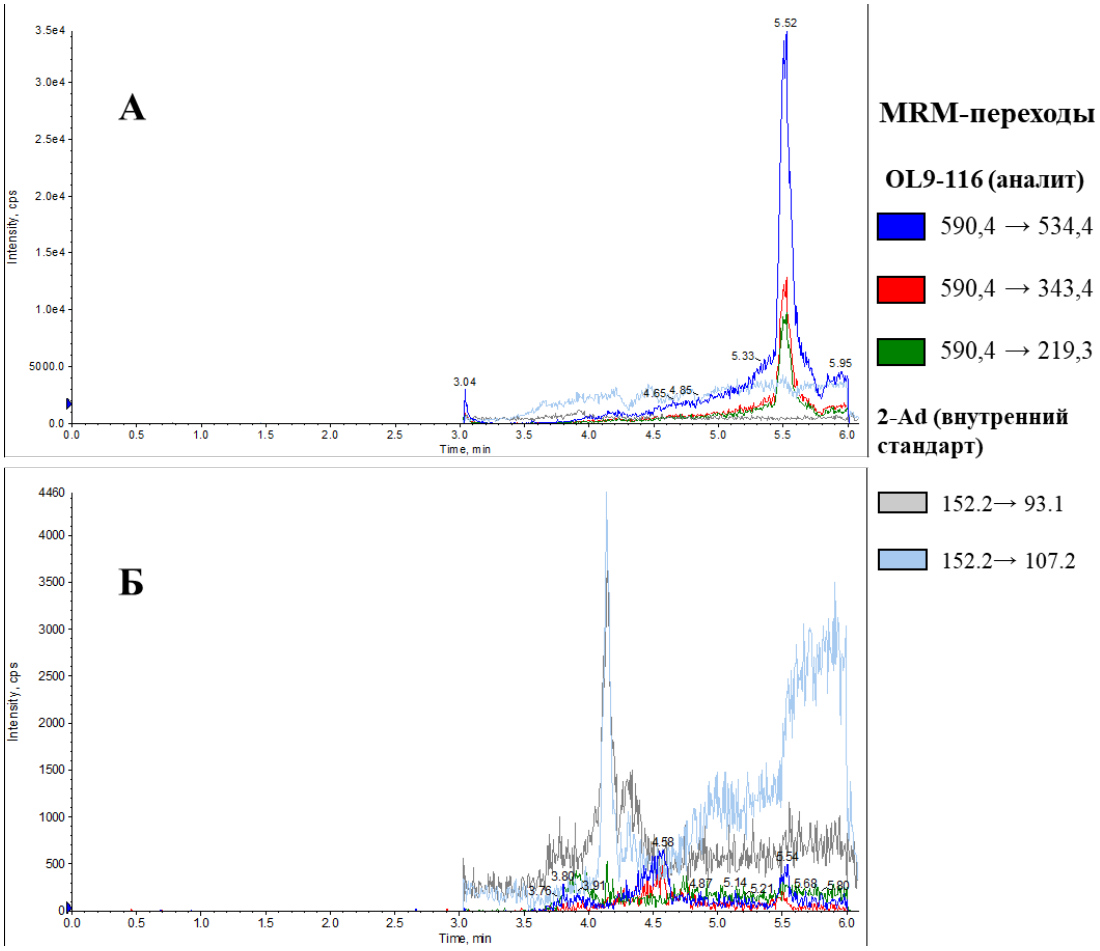


Рисунок 57. Хроматограмма холостого образца, проанализированного после градуировочной серии: А) при использовании смеси метанол-вода (1:1) в качестве промывочного растворителя; Б) при использовании ацетонитрила в качестве промывочного растворителя.

Таким образом, была оптимизирована методика хроматографического разделения для количественного определения агента OL9-116 в гомогенатах тканей с использованием 2-Ad в качестве внутреннего стандарта.

2.4.2. Разработка протокола пробоподготовки образцов тканей легких, печени, почек

На первом этапе разработки протокола пробоподготовки был выбран и оптимизирован метод гомогенизации ткани. Это необходимо для обеспечения однородности образцов, что является важным при подготовке для количественного определения ксенобиотиков. Подбор метода гомогенизации тканей осуществлялся на образцах легких мышей, так как они представляют собой наиболее сложную биологическую матрицу из исследуемых в данной работе.

В предварительных экспериментах были исследованы механическая и ультразвуковая гомогенизация. Для выбора наиболее подходящего метода четыре точные навески легочной ткани поместили в пробирки типа Эппендорф. К каждому образцу добавляли растворитель в соотношении 1:4. К образцу №1 добавляли физиологический раствор; к образцу №2 добавляли смесь воды и ацетонитрила (1:4 об.), а также крупнозернистые частицы оксида алюминия и карбида кремния. Гомогенизацию проводили с использованием механического гомогенизатора. К образцу №3 добавляли физиологический раствор и подвергали ультразвуковой гомогенизации с охлаждением на льду. К образцу №4 добавляли смесь воды и ацетонитрила (1:4 об.) и также использовали ультразвуковой гомогенизатор с охлаждением образца на льду. Однородность гомогенатов оценивали макроскопически.

Механическая гомогенизация с использованием крупнозернистых частиц оксида алюминия и карбида кремния не позволила получить однородный гомогенат: в образцах №1 и №2 присутствовали крупные частицы ткани, а из-за длительного встряхивания происходило нагревание образцов. Охлаждение образцов при механической гомогенизации было невозможным из-за конструктивных особенностей используемого оборудования. Такой способ гомогенизации подходит для пробоподготовки мягких тканей, таких как мозг, однако неприменим для органов, имеющих в своем строении большое количество соединительной ткани (легкие, печень, почки). Неравномерная гомогенизация может приводить к получению неоднородного образца и, как следствие, снижению степени извлечения аналита и увеличению разброса получаемых результатов анализа. При ультразвуковой гомогенизации образец №4 не удалось эффективно гомогенизировать, вероятно, из-за низкой вязкости системы вода – ацетонитрил. В то же время образец №3 представлял собой однородный гомогенат без крупных частиц ткани. На основании полученных данных в качестве метода гомогенизации был выбран ультразвуковой метод с использованием физиологического раствора, так как он обеспечивал наилучшую однородность гомогената.

На втором этапе разработки условий пробоподготовки был осуществлен подбор способа обработки гомогената ткани. Согласно литературным данным [132,167,168], введение стадий высаливания и твердофазной экстракции позволяет удалить мешающие компоненты матрицы. Так, в качестве пробоподготовки образца гомогената легких нами был выбран метод QuEChERS (кэтчерс). Метод заключается в обработке образца ткани смесью солей в присутствии растворителя и последующей твердофазной очисткой образца обращенно-фазным сорбентом. Совместно с высаливанием используют полярные органические растворители, совместимые с ВЭЖХ-МС/МС, такие как ацетонитрил, изопропанол, ацетон. Несмотря на то, что они хорошо смешивается с

водой, существуют методы разделения раствора на два слоя при добавлении солей и/или другого органического растворителя [127], поэтому использование метанола в качестве экстрагента не представляется возможным.

При разработке методики мы использовали коммерчески доступный набор QuEChERS. В качестве исследуемых растворителей для экстракции были использованы чистый ацетонитрил и 0,1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле. Сравнение площадей пиков OL9-116 при использовании указанных экстрагентов показало, что наличие муравьиной кислоты в составе увеличивает степень извлечения аналита в 1,56 раз, поэтому в качестве экстрагента при пробоподготовке гомогенатов органов был использован 0,1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле.

Применение ацетонитрила в качестве экстрагента осложняется при работе с выбранным нами гидрохлоридом 2-адамантиламина в качестве внутреннего стандарта. Ранее было обнаружено, что при хроматографическом анализе образцов 2-адамантиламина, растворенных в ацетонитриле, это соединение не удерживается на хроматографической колонке и выходит в области мертвого объема. Для предотвращения этого образцы необходимо было разбавлять водой в 10 и более раз, что снижало возможности аналитической методики. При использовании метанола как растворителя для приготовления образцов, так и в качестве органического элюента для хроматографии, при анализе образцов, содержащих 2-Ad, проскока вещества не происходит. По этой причине нами была введена стадия упаривания 100 мкл образца в ацетонитриле на вакуумной центрифуге без нагревания и последующего растворения его в 1 мл метанола.

При упаривании образцов в полипропиленовых пробирках на их стенках может происходить необратимая адсорбция веществ, что недопустимо в количественном анализе. По этой причине при введении в методику стадии упаривания важно, чтобы оно не оказывало влияния ни на аналит, ни на внутренний стандарт. Для проверки этого мы приготовили образцы, содержащие одинаковые количества OL9-116 и внутреннего стандарта, в чистом метаноле и в чистом ацетонитриле, соответственно. Образец в ацетонитриле упарили досуха, остаток перерастворили в эквивалентном объеме метанола и проанализировали оба образца. Сравнение площадей пиков обоих веществ после анализа показало идентичность образцов, что указывает на отсутствие необратимой адсорбции определяемых веществ на стенках полипропиленовых пробирок при упаривании образцов в вакууме. Полученные результаты свидетельствуют о том, что ацетонитрил можно использовать в качестве экстрагента при количественном определении OL9-116 в тканях в присутствии 2-адамантиламина в разработанной методике пробоподготовки.

В то же время, введение стадии упаривания увеличивает длительность пробоподготовки образцов, что может быть одним из решающих факторов при обработке большой серии, например, при изучении фармакокинетики в органах. Интенсивность аналитического сигнала и соотношение сигнал/шум (S/N) для образцов с концентрацией десятков мкг/г вещества в тканях позволяет снизить интенсивность пика аналита и внутреннего стандарта в 10-100 раз.

Для проверки гипотезы об уменьшении содержания ацетонитрила в образце без стадии упаривания был проведен следующий эксперимент: после пробоподготовки 20 мкл экстракта отбирали и разбавляли в 10 раз метанолом. Уменьшение содержания ацетонитрила в образце способствовало удерживанию внутреннего стандарта на обращено-фазовом сорбенте колонки.

Разработка протокола пробоподготовки образцов тканей включает несколько ключевых этапов, направленных на улучшение однородности образцов и эффективное извлечение аналита. При исследовании способов гомогенизации ткани была подтверждена эффективность ультразвуковой гомогенизации с использованием физиологического раствора для легочной ткани. Для пробоподготовки был выбран метод QuEChERS с применением 0,1% раствора муравьиной кислоты в ацетонитриле, что способствовало увеличению степени извлечения агента OL9-116. Также было показано, что при разбавлении полученного экстракта метанолом интенсивность сигналов аналита и внутреннего стандарта сопоставима с уровнем при упаривании экстракта в вакуумной центрифуге, что позволило разработать быструю и эффективную методику анализа агента в тканях органов.

2.4.3. Валидация методик количественного определения OL9-116 в легких, печени, почках

На следующем этапе работы разработанные методики были валидированы по параметрам, указанным в разделе 3.4, согласно требованиям регуляторных документов. Для приготовления образцов был использован объединенный гомогенат нескольких органов. Для опухолевых узлов мы показали селективность методики и построили градуировочную зависимость для оценки содержания аналита, полную валидацию методики мы не проводили в связи с недостатком биологической матрицы.

На первом этапе была продемонстрирована селективность каждой из методик. Для этого проводили анализ 3-х холостых образцов каждой из матриц (гомогенаты легких, печени, почек, опухолевых узлов) и соответствующих образцов, содержащих OL9-116. Концентрация агента в гомогенате легких составляла 5 мкг/г, в гомогенате печени и почек – 1 мкг/г, в гомогенате опухолевых узлов – 0,15 мкг/г. Методики являются селективными, поскольку при анализе холостых

образцов отсутствуют аналитические сигналы, совпадающие по времени удерживания с аналитом и внутренним стандартом. На рис. 58 приведены хроматограммы гомогенатов холостого образца почек (рис. 58А) и образца с добавлением соединения OL9-116 до концентрации 1 мкг/г после пробоподготовки с использованием внутреннего стандарта (рис. 58Б). Как видно из хроматограмм, в холостом образце отсутствуют примеси, дающие сигналы аналита и внутреннего стадарта. Аналогичная картина наблюдалась и для остальных исследованных матриц. Таким образом, подтверждена селективность разработанных аналитических методик, что позволяет провести количественное определение OL9-116 в присутствии других компонентов.

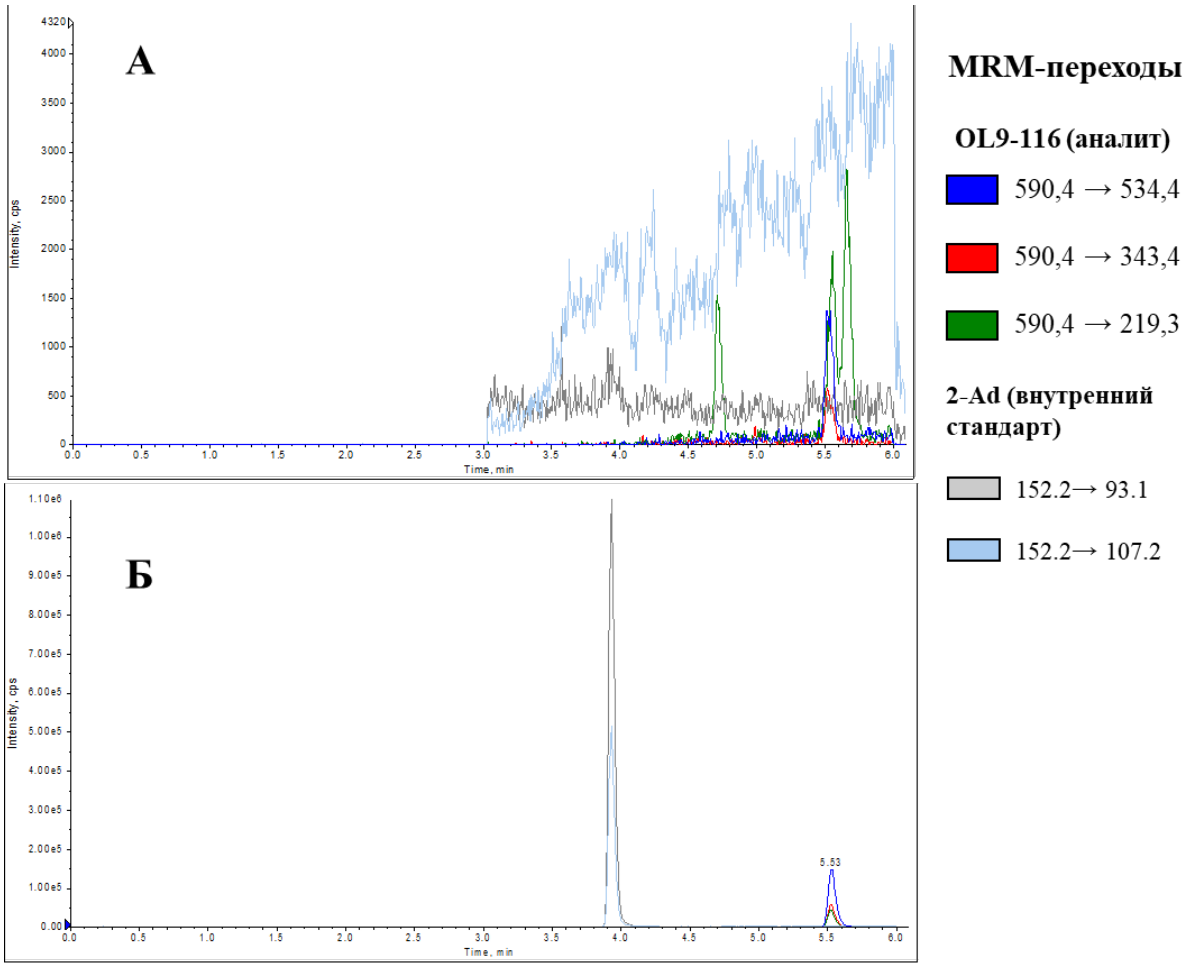
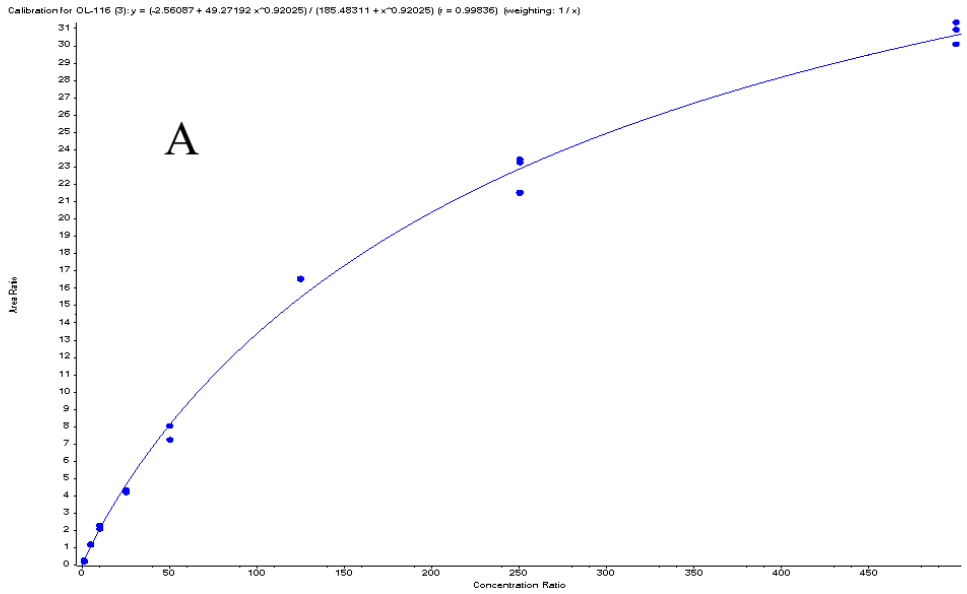
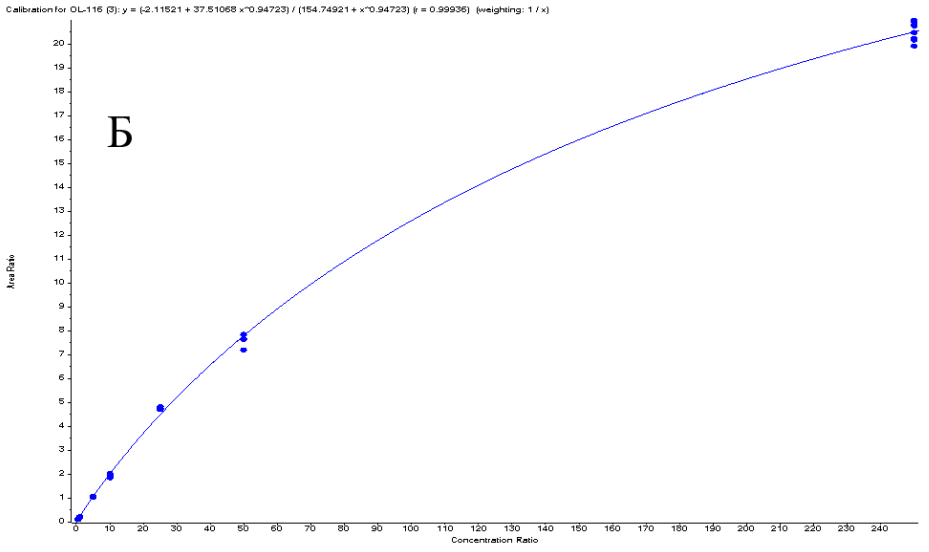


Рисунок 58. Хроматограмма холостого образца гомогената почек (А) и образца, содержащего OL9-116 в концентрации 1 мкг/г и внутренний стандарт (Б).

Для построения градуировочных зависимостей использовали образцы гомогената легких, содержащие вещество OL9-116 в концентрации 1, 5, 10, 25, 50, 125, 250, 500 мкг/г; образцы гомогената печени, содержащие вещество OL9-116 в концентрации 0,5, 1, 5, 10, 25, 50, 250 мкг/г; образцы гомогената почек, содержащие вещество OL9-116 в концентрации 0,25, 0,5, 2,5, 5, 10, 25,

50, 125, 250 мкг/г; образцы гомогената опухолевых узлов, содержащие вещество OL9-116 в концентрации 0,15, 0,25, 0,5, 1, 2,5, 10 мкг/г. Разработанные методики позволяют количественно определить OL9-116 в диапазоне концентраций 1–500 мкг/г в легких (r^2 = 0,998), 0,5–250 мкг/г в печени (r^2 = 0,999), 0,25–250 мкг/г в почках (r^2 = 0,998), 0,15-10 мкг/г в опухолевых узлах (r^2 = 0,999). Градуировочные зависимости были построены с использованием регрессии типа Хилл, позволяющей аппроксимировать результаты в широком диапазоне концентраций (рис. 59).





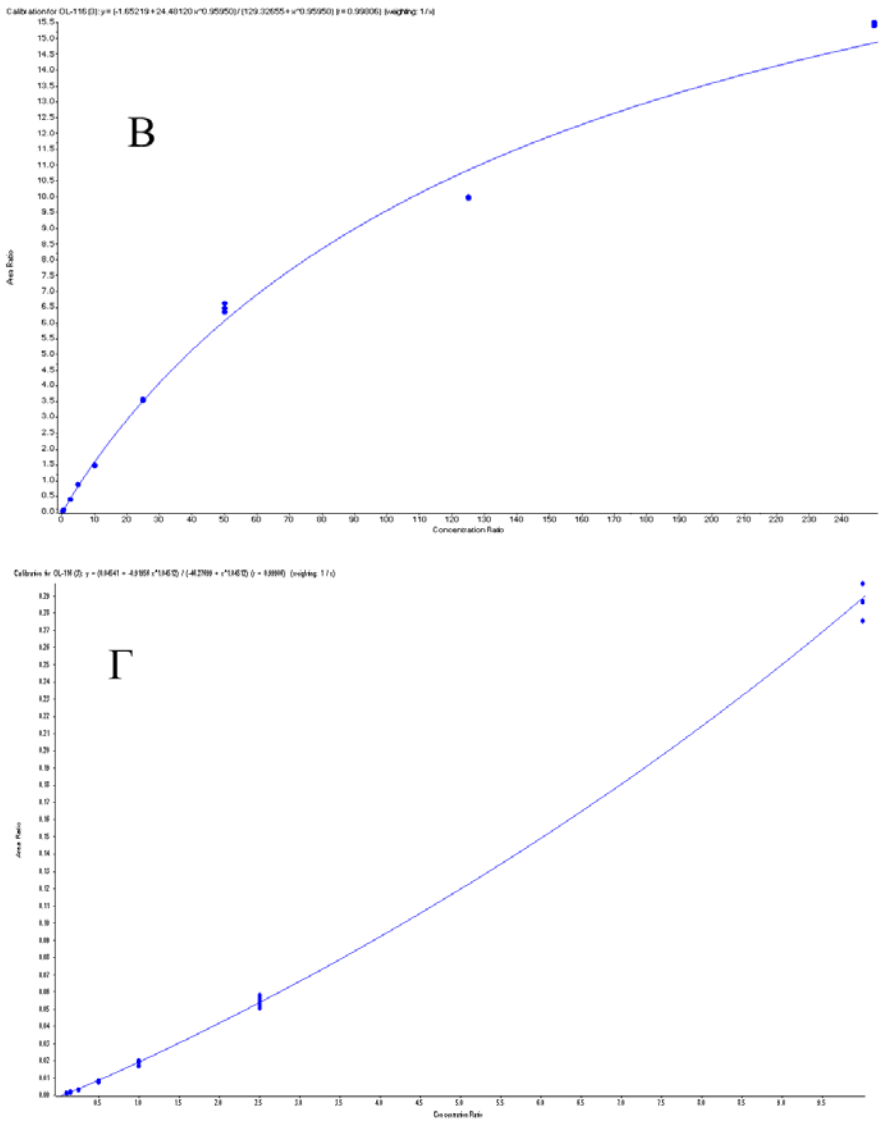


Рисунок 59. Градуировочная зависимость для количественного определения агента OL9-116: А) в гомогенатах легких в диапазоне 1-500 мкг/г; Б) в гомогенатах печени в диапазоне 0,5-250 мкг/г; В) в гомогенатах почек в диапазоне 0,25 – 250 мкг/г; Г) в гомогенатах опухолевых узлов в диапазоне 0,1-10 мкг/г.

Для градуировочных образцов был проведен обратный расчет концентраций по полученным зависимостям. Результаты обратного расчета значений концентрации аналита для каждой биологической матрицы представлены в таблице 18.

Таблица 18. Найденные значения концентрации OL9-116 в градуировочных образцах.

Матрица	Концентрация	Найденная	Относительная	Точность, %

	OL9-116, мкг/г	концентрация±SD, мкг/г n=4	погрешность, %	
Легкие	1	1,0±0,06	6,4	99,1
	5	5,3±0,13	2,4	106
	10	11±0,56	5,2	107
	25	23±0,63	2,8	90,5
	50	46±4	9,6	92,6
	125	139±0,16	0,1	111
	250	241±22	9,0	96,5
	500	510±31	6,1	102
Печень	0,5	0,5±0,04	8,0	100
	1	1,0±0,07	7,0	101
	5	4,9±0,08	1,6	98,7
	10	9,6±0,4	4,4	96,0
	25	27±0,4	1,5	107
	50	48±2,8	5,8	96,1
	250	251±11	4,5	100
Почки	0,25	0,3±0,01	4,6	101
	0,5	0,5±0,02	3,2	102
	2,5	2,4±0,03	1,2	94,7
	5	5,3±0,09	1,8	106
	10	9,3±0,08	0,9	92,7
	25	25,2±0,2	0,8	101
	50	54,8±1,7	3,1	110
	125	107,3±0,44	0,4	85,9
	250	278,7±3,07	1,1	112
Опухолевые узлы	0,15	0,17±0,004	2,3	115
	0,25	0,24±0,009	4,1	95,2
	0,5	0,46±0,02	5,3	92,3
	1	0,98±0,05	5,2	97,8
	2,5	2,49±0,11	4,4	99,7
	10	10,0±0,29	2,8	100,8

Нижний предел количественного определения составил 1 мкг/г для гомогената легких, 0,5 мкг/г для гомогената печени, 0,25 мкг/г для гомогената почек, 0,15 мкг/г для гомогената опухолевых узлов. Средние значения величин сигнал / шум по шести измерениям LLOQ удовлетворяют требованиям регуляторных документов и составляют более 10 для каждой биологической матрицы.

Отклонение результатов анализа внутри цикла и между циклами с применением разработанных методик для параметра «точность» не превышала 9,8% (табл. 19). Отклонение

результатов для параметра «прецизионность» методик было ниже и составило 8,4% (внутри аналитического цикла) и 8,5% (между аналитическими циклами).

Таблица 19. Значения точности и прецизионности для образцов контроля качества легких, печени, почек

Биологическая матрица	Тип[a)] образца и концентрация аналита, мкг/г	Внутри аналит. цикла, n=6		Между аналит. циклами, n=6	
		Точность, %	Прецизион., %	Точность, %	Прецизион., %
Легкие	LLOQ (1)	96,8	4,5	99,1	6,4
	QCL (2,5)	103	5,4	105,5	5,6
	QCM (200)	93,6	5,2	97,5	8,4
	QCH (400)	94,6	8,4	96,4	8,5
Печень	LLOQ (0,5)	99,0	6,0	100	7,3
	QCL (2,5)	104	3,8	103	4,0
	QCM (125)	104	4,3	106	6,7
	QCH (200)	109	3,4	109	5,4
Почки	LLOQ (0,25)	100	4,5	100	4,7
	QCL (1)	94,9	7,1	95,1	8,0
	QCM (100)	109	2,5	109	3,1
	QCH (200)	96,8	7,5	94,1	7,0

[a)] QCL, QCM, QCH – образцы контроля качества для низкого, среднего и высокого уровня концентраций соответственно; LLOQ – образец НПКО.

Рассчитанные значения степеней извлечения OL9-116 из гомогенатов тканей (табл. 20) демонстрируют полный депротеинизирующий эффект методики QuEChERS. Значения матричного фактора, оцененного для тех же образцов, указывает на незначительное влияние матрицы на аналит.

Таблица 20. Значения степеней извлечения (Rec) и матричного фактора (MF) для образцов контроля качества легких, печени и почек

	Легкие		Печень		Почки	
	Rec, %	MF, %	Rec, %	MF, %	Rec, %	MF, %
QCL	107	96,9	89,7	105	91,2	90,2
QCH	106	106	107	103	94,4	106

Rec – степень извлечения, MF – матричный фактор

Для оценки стабильности образцов в автосамплере использовали серии градуировочных образцов для каждой из исследуемых биологических матриц. Результат анализа образцов спустя 24 часа показал, что концентрация OL9-116 не изменяется в течение суток при нахождении образцов в автосамплере хроматографа. При анализе холостых образцов после измерения градуировочного образца с максимальной концентрацией на хроматограммах отсутствуют пики аналита, что свидетельствует об отсутствии переноса вещества в автосамплере хроматографа при анализе серии.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о пригодности использования разработанных методик для количественного определения OL9-116 в гомогенатах легких, печени и почек мыши методом ВЭЖХ-МС/МС.

2.4.4. Исследование распределения OL9-116 в легких, печени, почках здоровых животных и опухоленосителей

Разработанные методики были использованы для количественного определения вещества в органах здоровых и опухолевых мышей после однократного введения вещества. в дозе 150 мг/кг. Животные были разделены на две группы: первая группа – здоровые мыши, а вторая группа – мыши с карциномой легких Льюис на 17-й день после трансплантации опухолевых клеток. Суспензию вещества вводили двум группам животных внутрижелудочно в дозе 150 мг/кг. В группе здоровых животных органы отбирали через 30 мин, 1, 2, 4, 7, 10, 13, 16, 20, 24, 36 и 48 часов; в группе мышей с карциномой легких Льюис органы отбирали через 30 минут, 1, 3, 7, 13 часов после введения вещества. Отбор меньшего количества временных точек для мышей с карциномой легких Льюис обусловлен недостаточным количеством животных в группе, и выживаемости животных на 17-й день исследования.

Распределение вещества в организме зависит от его способности проникать через клеточную мембрану, поэтому липофильные вещества легче проникают в клетку и равномерно распределяются в организме, в сравнении с гидрофильными [169]. Установлено, что максимальная концентрация OL9-116 в органах здоровых мышей может достигать 100 мкг/г с последующим его распределением и выведением. Рассмотрим особенности изменения концентрации вещества с течением времени для каждого органа в отдельности.

Максимальная концентрация агента OL9-116 в легких здоровых животных наблюдается через 1 час и достигает 140 мкг/г (рис. 60). В единичном случае в образце легких, взятом через 30 минут после введения вещества, концентрация OL9-116 была очень высока и, по оценкам,

составила 1,9 мг/г, что лежит выше диапазона градуировочной зависимости и является выбросом по отношению к двум другим точкам.

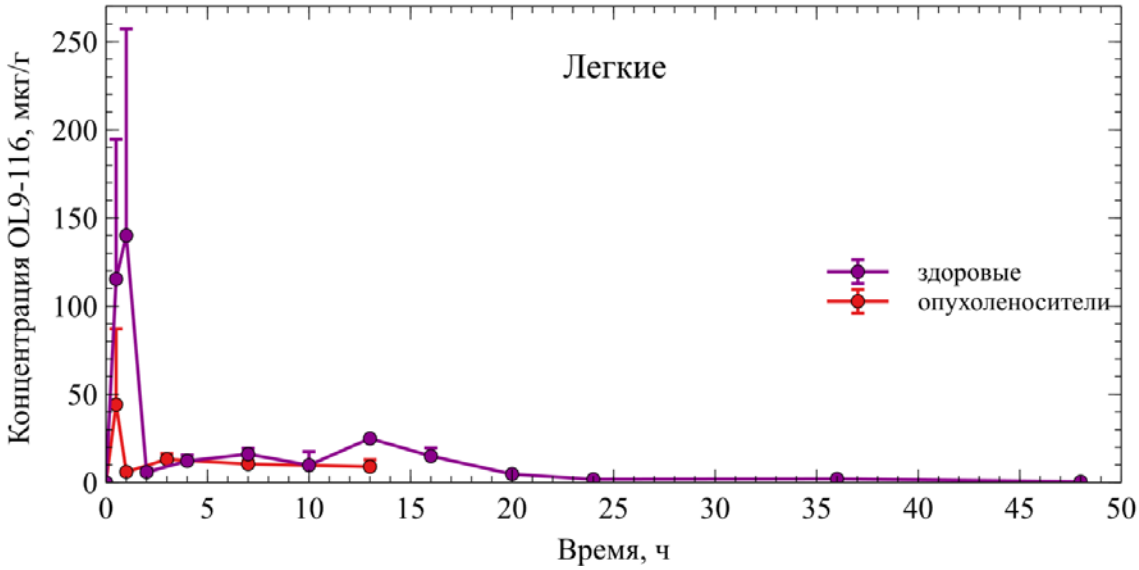


Рисунок 60. График зависимости концентрации вещества от времени в гомогенатах легких для здоровых животных (фиолетовая линия) и мышей с перевитой карциномой легких Льюис (красная линия). Представлен в виде средних значений ± стандартная ошибка среднего (SEM).

Большой разброс результатов, представленный стандартной ошибкой среднего (SEM), обусловлен небольшим количеством животных, участвующих в эксперименте, и природой ткани органа. Максимальная концентрация вещества в легких опухоленосителей достигается через 30 минут и в среднем составляет 45 мкг/г, что практически в 3 раза меньше, чем в легких группы здоровых мышей. Через 1 час после введения концентрация вещества снижалась до 6 мкг/г и выходила на плато. Общий вид зависимости концентрации от времени в легких здоровых животных и опухоленосителей схож: мы наблюдаем увеличение содержания агента в первый час с момента введения вещества, а затем резкое снижение и длительное нахождение в ткани. По-видимому, легкие, богатые липидами и имеющие большую поверхность, принимают значительную часть амфифильных и липофильных лекарственных веществ, а при падении концентрации действующего вещества в крови они медленно высвобождают вещество в кровоток [169].

При рассмотрении графика зависимости концентрации вещества от времени в печени для здоровых животных наблюдается 2 максимума (рис. 61), при этом у здоровых мышей наблюдается локальный максимум около 7 часов, затем спад содержания вещества в ткани с последующим его ростом к 13 часам. При исследовании фармакокинетики OL9-116 в цельной крови при

внутрижелудочном введении наступала стадия выведения вещества из крови через 5 часов. Мы полагаем, что причиной появления второго пика на кривой «концентрация – время» может быть кишечно-печеночная рециркуляция [170]. Значения концентрации OL9-116 в печени для здоровых мышей и опухоленосителей на промежутке от 30 минут до 3 часов численно схожи.

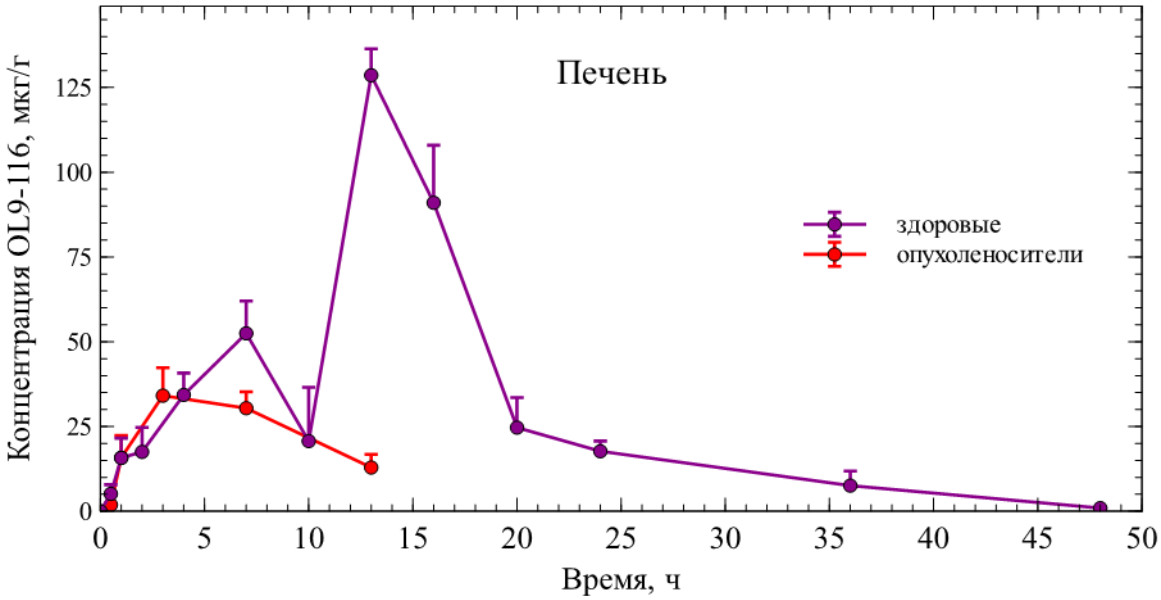


Рисунок 61. График зависимости концентрации вещества от времени в гомогенатах печени для здоровых животных (фиолетовая зависимость) и мышей с перевитой карциномой легких Льюис (красная зависимость). Представлен в виде средних значений ± стандартная ошибка среднего (SEM).

При сравнении содержания вещества в печени двух групп животных хотелось бы отметить отличие в динамике содержания вещества с течением времени. Данное различие может указывать на изменение метаболизма у животных с перевитыми опухолями относительно здоровых мышей. Возможно, у опухоленосителей также происходит рост концентрации вещества в тканях после изученного промежутка времени. Получение ответа на этот вопрос требует проведения отдельного исследования, что будет являться продолжением данной работы.

На представленной зависимости «концентрация – время» агента OL9-116 в почках здоровых мышей наблюдается 3 локальных максимума (рис. 62). Важно отметить, что два максимума приходятся на 7 и 13 часов, что схоже с фармакокинетическим профилем в печени. Максимум в точке 2 часа имеет большой разброс значений и не является достоверным результатом, поскольку усреднение значений производилось по трем животным. Несмотря на большой разброс значений концентрации вещества в точке 2 часа, высокая концентрация в почках возможна. Из-за

особенностей строения сосудистой стенки гломерулярных капилляров, растворенные в крови вещества, масса которых не превышает 5000 Да, могут беспрепятственно преодолевать почечный барьер [169]. Как и в случае для печени, для фармакокинетических зависимостей в почках здоровых и больных животных происходит изменение вида зависимости. Для больных животных отсутствуют локальные максимумы: наблюдаем постепенное увеличение концентрации в течение первого часа до 20 мкг/г с последующим снижением до 10 мкг/г и выходом на плато.

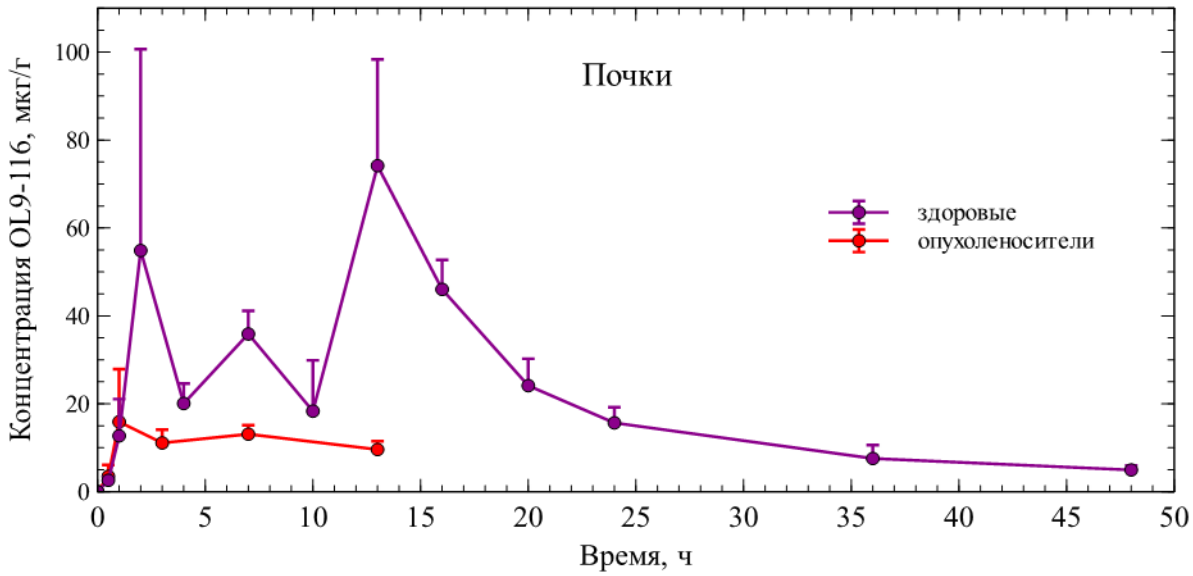


Рисунок 62. График зависимости концентрации вещества от времени в гомогенатах почек для здоровых животных (фиолетовая зависимость) и мышей с перевитой карциномой легких Льюис (красная зависимость). Представлен в виде средних значений ± стандартная ошибка среднего (SEM).

Изучение профиля «концентрация-время» для первичных опухолевых узлов являлось количественным, однако необходимо отметить, что соответствующая методика не была валидирована по всем критериям, которые требуют международные регуляторные документы. Это связано с высокой сложностью экспериментов по наработке соответствующего биоматериала (опухолевых узлов) на животных. Тем не менее, по построенной градуировочной зависимости мы можем оценить уровень концентрации OL9-116 в опухолевой ткани и проследить динамику изменения. Общий вид графиков (рис. 63) свидетельствует о нахождении вещества в опухоли по крайней мере в течение 13 часов на уровне нескольких мкг/г.

Для группы животных с перевитой опухолью мы наблюдали повышение концентрации OL9-116 в течение первого часа после введения до уровня 5-30 мкг/г в зависимости от ткани (легкие, печень, почки). Значение концентрации в каждой ткани сохранялось на этом уровне как минимум в

течение последующих 12 часов, что демонстрирует фармакокинетический профиль, явно отличающийся от профиля здоровых животных. Важно отметить, что для каждой ткани зависимость изменения концентрации имеет одинаковых вид: мы не наблюдаем локальных максимумов (за исключением гомогенатов легких), а концентрация OL9-116 в течение 12 часов практически не изменяется.

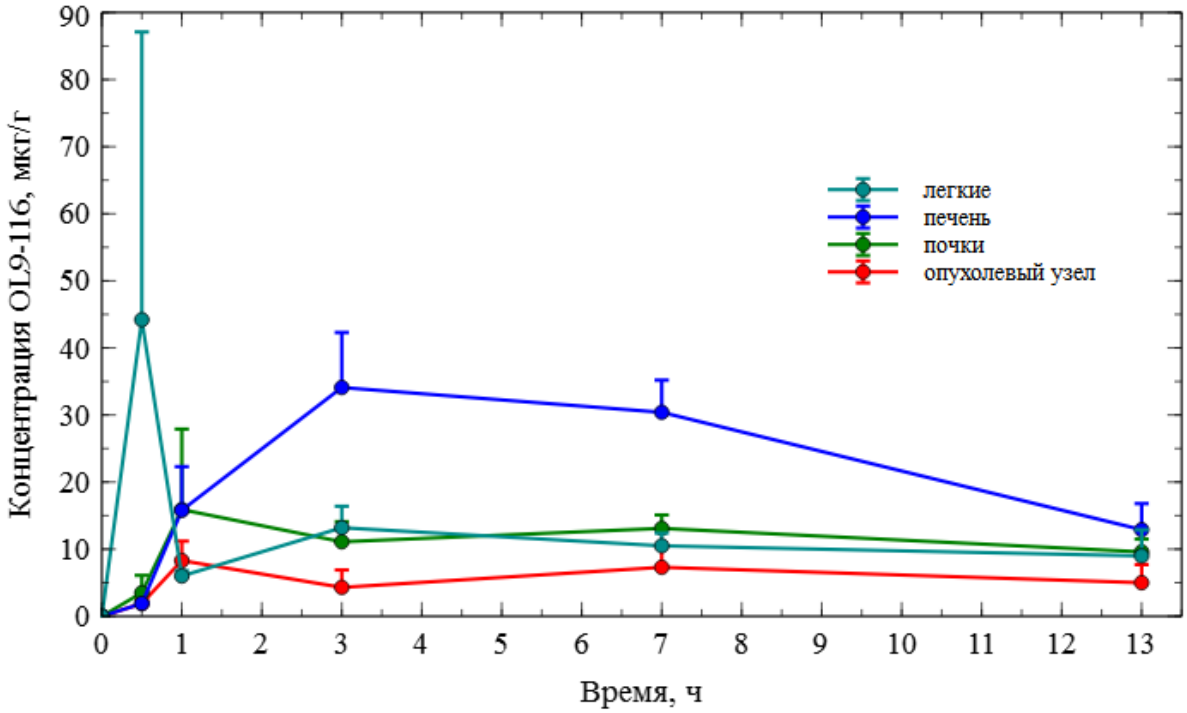


Рисунок 63. Зависимость концентрации вещества от времени в гомогенатах легких, печени, почек и первичных опухолевых узлах у мышей с перевитой карциномой легких Льюис. Представлен в виде средних значений ± стандартная ошибка среднего (SEM).

Изменение метаболизма животных с перевитыми опухолями относительно здоровых мышей может быть связано с изменением транспорта гликопротеинов, которые встречаются в опухолевых клетках. Р-Гликопротеины способны защищать клетки, тем самым вызывая их резистентность к лекарственным препаратам и изменению распределения вещества в организме [171]. Вероятно, это является причиной уменьшения биодоступности агента, в результате чего бóльшая часть вещества не абсорбируется и выводится из организма в неизменном виде.

На основании проведенного исследования установлено, что фармакокинетические профили вещества OL9-116 существенно различаются у здоровых мышей и мышей с перевитой карциномой легких Льюис, а значения максимальной концентрации вещества в органах здоровых выше, чем у опухоленосителей. При этом динамика распределения и выведения вещества в органах

животных с карциномой легких Льюис демонстрирует меньшую вариабельность и отсутствие локальных максимумов, что может быть связано с изменениями метаболизма и транспорта веществ в опухолевой ткани. Выявленные различия фармакокинетики OL9-116 между здоровыми животными и опухоленосителями могут быть обусловлены изменением процессов абсорбции, распределения и выведения вещества, связанным с изменением метаболизма, включая участие Р-гликопротеинов, которые могут снижать биодоступность вещества, препятствуя его всасыванию в желудочно-кишечном тракте, проникновению в клетки и способствуя ускоренному выведению из организма. Полученные данные подчеркивают необходимость дальнейших исследований для более глубокого понимания механизмов изменения фармакокинетического профиля вещества в условиях опухолевого процесса. Это позволит оптимизировать схемы дозирования и повысить эффективность вещества OL9-116 при использовании в терапии онкологических заболеваний совместно с топотеканом.

Глава 3. Экспериментальная часть

3.1 Материалы

3.1.1 Реагенты

Камфецин был синтезирован д.х.н., в.н.с ЛФАВ НИОХ СО РАН Яровой О. И. по методике [172] и очищен двойной перегонкой в вакууме. Чистота соединения составила более 99,5% по ГХ/МС. Агент KS-389 был синтезирован к.х.н., с.н.с. ЛФАВ НИОХ СО РАН Ковалевой К. С. в соответствии с описанной процедурой [10] и очищен методом колоночной хроматографии на силикагеле. Чистоту соединения (> 98%) определяли методом ВЭЖХ-УФ. Агент OL9-116 был синтезирован д.х.н., в.н.с. ЛФАВ НИХ СО РАН Лузиной О. А. по методике [173] и очищен колоночной хроматографией на силикагеле. Чистота соединения была более 95%, согласно данным ЯМР.

Гидрохлорид 2-адамантиламина и 2,5-бис(4-диэтиламинофенил)-1,3,4-оксадиазол, используемые в качестве внутренних стандартов, были приобретены у компании Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Миссури, США).

Для приготовления растворов, проведения пробоподготовки биологических образцов и хроматографии использовали метанол и ацетонитрил градиентной чистоты («Химмед», Москва, Россия), муравьиную кислоту («Panreac», Испания). Очищенная вода была подготовлена с использованием ультрафиолетовой системы Direct-Q 3 UV system (Millipore S. A. S., France). Сульфат цинка был приобретен в компании Merk, Германия.

Для приготовления лекарственных форм использовали диметилсульфоксид (Sigma, США), Твин-80 («Panreac», Испания), 0,9% физиологический раствор (ОАО Производственная фармацевтическая компания «Обновление», Новосибирск, Россия). Набор для пробоподготовки QuEChERS был приобретен у компании Interlab (Москва, Россия).

3.1.2 Оборудование

В работе было использовано следующее оборудование: хроматограф Shimadzu LC-20AD Prominence, снабженный охлаждаемым автосамплером, термостатом колонки и градиентным насосом (Shimadzu Corporation, Япония), масс-спектрометр 3200 QTRAP (ABSCIEX, США), масс-спектрометр 6500 QTRAP (ABSCIEX, США), хроматографические колонки с обращенно-фазовым сорбентом ProntoSil 120-5 C18 AQ (2×75 мм, 5 μм) и ProntoSil 120-5 C8 AQ (2×75 мм, 5 μм, Эконова, Новосибирск), весы аналитические Mettler Toledo, шейкер термостатируемый (Biosan), центрифуга настольная MiniSpin (Eppendorf AG, Германия), центрифуга настольная с охлаждением

до 4°C 5418R (Eppendorf AG, Германия), гомогенизатор Minilys (Bertin Technologies, Франция) для приготовления гомогенатов тканей, ультразвуковая баня (Elma Sonic, Германия), ультразвуковой гомогенизатор (Q125, QSonica LLC, США), вихревой встряхиватель Vortex (Biosan, Латвия), карточки Whatman Protein Saver 903 (Sigma-Aldrich, США) для отбора проб цельной крови, крупнозернистые частицы оксида алюминия 1,6 мм и частицы карбида кремния 1,6 мм (MP Biomedicals, Германия) для приготовления гомогенатов тканей, дозаторы одноканальные переменного объема 0,1-10 мкл, 2-20 мкл, 5-50 мкл, 10-100 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл (HTL Lab Solutions, Польша), гематологический анализатор BC-2800 Vet (Mindray, КНР).

3.1.3 Рабочие растворы

Стоковый раствор камфецина (1,0 мг/мл) был приготовлен путем растворения точной навески вещества в метаноле. Серией последовательного разбавления стокового раствора метанолом были приготовлены рабочие растворы с концентрациями 0,2, 0,5, 0,6, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 80 и 100 мкг/мл.

Стоковый раствор агента KS-389 (1,0 мг/мл) был приготовлен путем растворения точной навески вещества в смеси метанола и ацетона (8:2, по объему). Серией последовательного разбавления стокового раствора метанолом были приготовлены рабочие растворы KS-389 с концентрациями 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 600, 800 нг/мл, 1, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 20 мкг/мл.

Стоковый раствор агента OL9-116 (1,0 мг/мл) был приготовлен путем растворения точной навески вещества в ацетонитриле. Серией последовательного разбавления стокового раствора ацетонитрилом были приготовлены рабочие растворы с концентрациями 0,15, 0,25, 0,5, 1, 2, 2,5, 5, 10, 20, 25, 40, 50, 100, 250, 400, 500, 800 мкг/мл.

Для получения рабочего раствора гидрохлорида 2-адамантиламина с концентрацией 10 мкг/мл точную навеску вещества растворяли в метаноле, содержащем 0,1% муравьиной кислоты. Раствор использовали в качестве внутреннего стандарта для количественного определения камфецина в плазме крови крысы.

Для получения рабочего раствора гидрохлорида 2-адамантиламина с концентрацией 2 мкг/мл точную навеску вещества растворяли в ацетонитриле. Раствор использовали в качестве внутреннего стандарта для количественного определения OL9-116 в гомогенатах легких, печени, почек, опухолевых узлов мыши.

Точную навеску 2,5-бис(4-диэтиламинофенил)-1,3,4-оксадиазола (2,5-BDPO) растворяли в метаноле для получения стокового раствора с концентрацией 1,0 мг/мл. Серией последующих

разбавлений были получены растворы внутреннего стандарта с концентрациями 200 нг/мл (для количественного определения KS-389 в гомогенатах тканей, OL9-116 в цельной крови), 20 нг/мл (для количественного определения KS-389 в цельной крови).

Рабочие растворы хранились при температуре –18°C. Перед приготовлением образцов растворы доводили до комнатной температуры.

3.1.4 Экспериментальные животные

Для проведения исследований камфецина использовали цельную кровь самцов крыс Вистар массой 230-250 г. Исследование фармакокинетики и распределения агента OL9-116 проводили на самцах C57BL/6J (C57BL) в возрасте четырех месяцев. Животные были получены из вивария Института цитологии и генетики СО РАН. Животных содержали на опилках в пластиковых клетках, кормили стандартным рационом («Лабораторкорм», Санкт-Петербург, Россия) и водой *ad libitum*. Работа с животными проводилась в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации № 199н от 1 апреля 2016 года, правилами «Надлежащей лабораторной практики» и положениями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 года о защите животных, используемых в научных целях.

Исследование фармакокинетики и распределения агента KS-389 проводили на самцах и самках мышей SCID в возрасте 12 недель (SHO-PrkdcscidHrhr), находящихся в SPF статусе. Экспериментальные животные содержались в Центре генетических ресурсов лабораторных животных Института цитологии и генетики СО РАН (RFMEFI62119X0023) в индивидуально вентилируемых клетках семейными группами по 2-4 особи при температуре окружающей среды (22-24 °C), относительной влажности 30-60% и режиме свет/темнота 12/12 с рассветом в 02:00. Корм и вода предоставлялись *ad libitum*. Исследование было одобрено Межинститутским этическим комитетом Института цитологии и генетики СО РАН (протокол №48/2 дата одобрения 18.03.2019) и проведено проводили в соответствии с Хельсинкской декларацией 2010/63/EU.

3.1.5 Подготовка биологических образцов

Для приготовления плазмы крови крыс кровь отбирали у животных после введения анестезии в вакутейнеры с гепарином лития путем трансторакальной сердечной пункции, а затем центрифугировали для получения плазмы. Контроль гематокрита осуществляли с помощью гематологического анализатора.

Цельная кровь мышей была отобрана из ретроорбитального синуса в пробирку типа Эппендорф, содержащую ЭДТА в качестве антикоагулянта. Отобранную кровь объединяли и использовали для приготовления калибровочных растворов и образцов контроля качества.

Органы были отобраны от животных в пробирки типа Эппендорф, тщательно промыты 0,9% физиологическим раствором и заморожены в жидком азоте. Точные навески органов использовали для приготовления градуировочных образцов и образцов контроля качества. Образцы хранили при температуре –70˚С.

3.2 Эксперименты *in vitro*

3.2.1 Приготовление градуировочных образцов и образцов контроля качества для биологических жидкостей

Для построения градуировочной зависимости камфецина в образцах цельной крови образцы готовили путем добавления 50 мкл раствора камфецина к 950 мкл усредненной цельной крови. Образцы перемешивали на встряхивателе типа Vortex, а затем выдерживали при температуре +4˚С в течение 20 минут. В результате были получены образцы для построения градуировочной зависимости с концентрациями 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500 и 5000 нг/мл.

Для построения градуировочной зависимости камфецина в плазме крови образцы готовили путем добавления 50 мкл рабочего раствора камфецина к 950 мкл плазмы. Образцы перемешивали на встряхивателе типа Vortex, а затем выдерживали при комнатной температуре в течение 30 минут. В результате были получены образцы для построения градуировочной зависимости с концентрациями 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500 и 5000 нг/мл, а также образцы контроля качества с концентрациями 30 (QCL), 2500 (QCM), 4000 (QCH) нг/мл.

Для построения градуировочной зависимости KS-389 в цельной крови образцы готовили путем добавления 50 мкл рабочего раствора KS-389 к 950 мкл усредненной цельной крови. Образцы перемешивали на встряхивателе типа Vortex, а затем выдерживали при комнатной температуре в течение 30 минут. В результате были получены образцы для построения градуировочной зависимости с концентрациями 2, 5, 10, 20, 30, 100, 200, 800, 1000 и 2000 нг/мл, а также образцы контроля качества с концентрациями 6 (QCL), 1000 (QCM), 1800 (QCH) нг/мл.

Для построения градуировочной зависимости OL9-116 в цельной крови образцы готовили путем добавления 10 мкл рабочего раствора OL9-116 к 90 мкл усредненной цельной крови. Образцы перемешивали на встряхивателе типа Vortex, а затем выдерживали при комнатной температуре в течение 30 минут. В результате были получены образцы для построения

градуировочной зависимости с концентрациями 15, 25, 100, 200, 250, 500, 1000, 2000 и 5000 нг/мл, а также образцы контроля качества с концентрациями 50 (QCL), 2500 (QCM), 4500 (QCH) нг/мл.

3.2.2 Приготовление образцов при различных температурах

К 950 мкл цельной крови добавляли 50 мкл рабочего раствора камфецина. В результате были получены образцы крови с концентрациями 50, 250, 1000 и 2500 нг/мл. Образцы аккуратно перемешивали на шейкере в течение 15 минут при заданной температуре (+4°C, +25°C, +38°C), а затем центрифугировали в течение 10 минут при 1600G при той же температуре. Полученную после центрифугирования плазму отбирали и обрабатывали в соответствии с протоколом, приведенным в разделе 3.2.5.

3.2.3 Приготовление образцов с различными значениями гематокрита

Для приготовления образцов с низким значением гематокрита (HCT=24%) 1,25 мл плазмы добавляли к 1,25 мл нормальной крови (HCT=46%) и осторожно перемешивали на вихревом встряхивателе. Для получения образцов с высоким значением гематокрита (HCT=65%) 3,75 мл нормальной крови центрифугировали в течение 15 минут при 1600G. Затем из образца отбирали 1,25 мл плазмы и осторожно перемешивали для получения однородного образца. Значение гематокрита определяли с помощью гематологического анализатора.

Полученную кровь с различными значениями гематокрита использовали для приготовления образцов крови, содержащих камфецин. Для этого к 950 мкл крови добавляли 50 мкл рабочего раствора камфецина для получения образцов с концентрациями 50, 250, 1000 и 2500 нг/мл. Образцы аккуратно перемешивали на шейкере в течение 15 минут при комнатной температуру, затем центрифугировали при 1600G. Полученную после центрифугирования плазму отбирали и обрабатывали в соответствии с протоколом, приведенным в разделе 3.2.5.

3.2.4 Приготовление образцов для изучения процессов сорбции

К 950 мкл цельной крови добавляли 50 мкл рабочего раствора камфецина для получения образцов с концентрациями 50, 250, 1000 и 2500 нг/мл. Образцы аккуратно перемешивали на шейкере при комнатной температуре в течение 15 минут, затем центрифугировали в течение 10 минут при 1600G. 250 мкл плазмы отбирали и обрабатывали в соответствии с протоколом, приведенным в разделе 3.2.5. После этого к образцу, состоящему из отделенных форменных элементов крови, добавляли 250 мкл холостой плазмы и осторожно перемешивали на встяхивателе.

Образец снова перемешивали на шейкере в течение 15 минут при комнатной температуре, затем центрифугировали в течение 10 минут при 1600G. Образцы плазмы, полученные после повторной экстракции, обрабатывали в соответствии с протоколом, приведенным в разделе 3.2.5.

3.2.5 Пробоподготовка образцов плазмы крови

Для обработки образцов камфецина в плазме крови использовали метод осаждения белков. К 100 мкл образца плазмы, содержащего камфецин, добавляли 800 мкл 0,1% раствора муравьиной кислоты в метаноле и интенсивно перемешивали на Vortex до появления белого осадка. После этого к образцу добавляли 100 мкл раствора внутреннего стандарта (2-Ad, 10 мкг/мл) и перемешивали. Образцы перемешивали на шейкере в течение 15 минут со скоростью 1400 об/мин, а затем центрифугировали в течение 10 минут при 13400 об/мин (MiniSpin, Eppendorf). Супернатант отбирали в чистые пробирки. Аликвоту объемом 20 мкл смешивали с 180 мкл воды, переносили в виалы и анализировали.

3.2.6 Пробоподготовка образцов цельной крови

При пробоподготовки образцов камфецина в цельной крови использовали метод сухого пятна. Образцы цельной крови объемом 20 мкл, содержащей камфецин, наносили на бумагу Whatman Protein saver card 903 и высушивали в течение 3 часов при комнатной температуре. Сухие пятна крови вырезали полностью, помещали в индивидуальные пробирки типа Эппендорф объемом 2 мл и добавляли 400 мкл раствора 2-адамантиламина в метаноле, содержащем 0,1% муравьиной кислоты. Образцы перемешивали на шейкере в течение 30 минут при температуре 24˚С. Супернатант отбирали в чистые пробирки и центрифугировали в течение 10 минут при 13400 об/мин (MiniSpin, Eppendorf). Супернатант объемом 200 мкл переносили в виалы и анализировали.

Пробоподготовку образцов KS-389 в цельной крови проводили также методом экстракции сухого пятна. Образцы цельной крови объемом 20 мкл, содержащей KS-389, наносили на бумагу Whatman Protein saver card 903 и высушивали в течение 3 часов при комнатной температуре. Сухие пятна крови вырезали полностью, помещали в индивидуальные пробирки типа Эппендорф объемом 2 мл и добавляли 400 мкл раствора внутреннего стандарта (2,5-BDPO) с концентрацией 20 нг/мл в метаноле. Экстракцию проводили в течение 30 минут на ультразвуковой бане (Elmasonic S 10H, Германия). Супернатант переносили в чистые пробирки и центрифугировали в течение 10 минут при 13400 об/мин (MiniSpin, Eppendorf). Аликвоту образца объемом 200 мкл помещали в виалы и анализировали.

При пробоподготовке образцов OL9-116 в цельной крови использовали метод осаждения. К 10 мкл образца цельной крови добавляли 50 мкл 0.2 М водного раствора сульфата цинка, интенсивно перемешивали с помощью Vortex и выдерживали при комнатной температуре в течение 15 минут. Образцы повторно встряхивали, добавляли 100 мкл раствора внутреннего стандарта (2,5-BDPO) с концентрацией 200 нг/мл, интенсивно перемешивали до выпадения осадка и выдерживали при комнатной температуре в течение 1 часа. Образцы центрифугировали в течение 10 минут при 13400 об/мин (MiniSpin, Eppendorf). Аликвоту образца, объемом 100 мкл, переносили в виалы и анализировали.

3.2.7 Приготовление и обработка образцов гомогенатов тканей

Для приготовления гомогенатов тканей при пробоподготовке образцов KS-389 точные навески органов (печень, почки, мозг) массой 20-30 мг были отобраны и помещены в пробирки типа Эппендорф. К навескам добавляли крупнозернистые частицы оксида алюминия 1,6 мм и частицы карбида кремния 1,6 мм, MP Biomedicals, Германия, и смесь метанол-вода (1:4) из расчета 200 мкл растворителя на 10 мг ткани. Образцы гомогенизировали до получения однородной смеси с использованием механического гомогенизатора (Minilys, Bertin Technologies) на средней скорости в течение 240 секунд.

К гомогенизированным тканям добавляли рассчитанный объем рабочего раствора KS-389 для получения нужного значения концентрации. В результате были получены образцы KS-389 в гомогенатах мозга, печени и почек для построения градуировочных зависимостей, а также образцы контроля качества. Раствор внутреннего стандарта (2,5-BDPO) с концентрацией 200 нг/мл добавляли из расчета 1 мкл раствора на 1 мг ткани. Образцы встряхивали на шейкере в течение 60 минут и центрифугировали в течение 10 минут со скоростью 13400 об/мин (MiniSpin, Eppendorf). Супернатант отбирали в чистые пробирки. Аликвоту образца объемом 200 мкл помещали в виалы для анализа. Для построения градуировочной зависимости рассчитывали концентрацию вещества (нг/г ткани) индивидуально для каждого образца исходя из точной навески. Рассчитанные значения для каждой матрицы приведены в таблицах 21–23.

Таблица 21. Расчеты для обработки градуировочных образцов и образцов контроля качества мозга мыши.

Тип образца	m, мг	C (KS-389), нг/мл	V(KS-389), мкл	V (внутр. стандарта), мкл	V(смеси), мкл	C (KS-389) в гомогенате, нг/г
Градуировочный	27,30	2	13,5	27	505	1
	29,00	5	11,6	29	539	2
	27,40	20	10,0	27	511	7,3
	22,40	30	10,0	22	416	13
	26,40	50	10,0	26	492	19
	20,70	100	10,4	21	383	50
	23,10	200	10,4	23	429	90
LLOQ	22,50	2	11,2	23	416	1
	21,70		11,0	22	401	1
QCL	23,20	10	9,50	23	431	4,1
	23,70		9,60	24	441	4,1
QCM	20,60	100	9,00	21	382	44
	20,50		9,00	21	381	44
QCH	24,90	200	9,20	25	464	74
	24,70		9,10	25	460	74

Таблица 22. Расчеты для обработки градуировочных образцов и образцов контроля качества печени мыши.

Тип образца	m, мг	C (KS-389), нг/мл	V(KS-389), мкл	V (внутр. стандарта), мкл	V (смеси), мкл	C (KS-389) в гомогенате, нг/г
Градуировочный	30,80	10	16,0	31	569	5,2
	29,20	20	15,0	29	540	10
	25,90	50	10,5	26	482	20
	26,30	100	13,2	26	487	50
	32,70	200	16,4	33	605	100
	29,30	500	11,7	29	545	200
	27,40	1000	11,0	27	510	401
	26,60	2000	12,0	27	493	902
	27,90	3000	16,0	28	514	1720
	28,90	5000	15,0	29	534	2595
LLOQ	31,30	10	16,2	31	579	5,2
	31,50		16,3	32	582	5,2
	28,60		14,8	29	529	5,2
QCL	23,60	50	7,90	24	441	17
	23,20		7,80	23	433	17
	24,00		8,00	24	448	17
QCM	25,10	3000	10,8	25	466	1291
	24,10		10,3	24	448	1282
	24,80		10,6	25	461	1282
QCH	26,40	5000	10,6	26	491	2008
	27,70		11,1	28	515	2004
	28,70		11,5	29	534	2003

Таблица 23. Расчеты для обработки градуировочных образцов и образцов контроля качества почек мыши.

Тип образца	m, мг	C (KS-389), нг/мл	V (KS-389), мкл	V (внутр. стандарта), мкл	V(смеси), мкл	C (KS-389) в гомогенате, нг/г
Градуировочный	24,40	5	10	24,0	454	2
	23,30	10	11	23,0	432	4,7
	21,30	20	11,7	21,0	393	11
	26,90	50	10,8	27,0	500	20
	21,70	100	10,9	22,0	401	50
	24,40	200	11	24,0	453	90
	24,20	500	9,7	24,0	450	200
	23,60	1000	10,7	24,0	438	453
	28,40	2500	11,4	28,0	528	1004
	25,40	5000	10,2	25,0	472	2008
LLOQ	24,50	5	10	25,0	456	2
	25,60		10	26,0	476	2
QCL	23,80	20	8	24,0	444	6,7
	24,90		8,3	25,0	465	6,7
QCM	23,60	2500	9,5	24,0	439	1006
	25,80		10,4	26,0	480	1008
QCH	24,10	4000	11	24,0	447	1826
	24,30		11,1	24,0	451	1827

Для приготовления гомогенатов тканей при пробоподготовке образцов OL9-116 целый орган (легкие, печень, почки) и опухолевый узел взвешивали и гомогенизировали в физиологическом растворе (1:4, в/о) с использованием ультразвукового гомогенизатора (Q125, QSonica LLC, США) с охлаждением на льду. Массовая концентрация гомогената составляла 200 мг ткани на мл. Гомогенаты хранили при температуре -70°C. К аликвоте гомогената объемом 100 мкл добавляли 10 мкл рабочего раствора OL9-116 и перемешивали с помощью Vortex. Образец выдерживали в течение 15 минут при температуре 24˚C.

Для построения градуировочных зависимостей рассчитывали концентрацию вещества (мкг/г ткани) индивидуально для каждого образца исходя из точной навески. Рассчитанные значения для гомогенатов легких, печени и почек приведены в таблице 24.

Таблица 24. Расчеты для обработки градуировочных образцов и образцов контроля качества легких, печени, почек мыши.

Матрица	Тип образца	Концентрация р-ра OL9-116, мкг/мл	Концентрация OL9-116 **в ткани**, мкг/г
Легкие	Градуировочный	2	1
		10	5
		20	10
		50	25
		100	50
		250	125
		500	250
		1000	500
	QCL	5	2.5
	QCM	400	200
	QCH	800	400
Печень	Градуировочный	1	0,5
		2	1
		5	5
		20	10
		50	25
		100	50
		500	250

	QCL	5	2,5
	QCM	250	125
	QCH	400	200
Почки	Градуировочный	0,5	0,25
		1	0,5
		5	2,5
		10	5
		20	10
		50	25
		100	50
		250	125
		500	250
	QCL	2	1
	QCM	200	100
	QCH	400	200
Первичные опухолевые узлы	Градуировочный	0,3	0,15
		0,5	0,25
		1	0,5
		2	1
		5	2,5
		20	10

Пробоподготовку образцов проводили с использованием метода QuECheRs. К полученному образцу добавляли 30 мкл раствора внутреннего стандарта 2-аадамантиламина в ацетонитриле с концентрацией 20 мкг/мл, 440 мкл 0,1% раствора муравьиной кислоты в ацетонитриле и перемешивали на Vortex. Соль №1 из набора QuECheRs (смесь хлорида натрия и сульфата магния) массой 100 мг вносили в пробирку с образцом и встряхивали на шейкере в течение 30 минут. Образцы центрифугировали в течение 10 мин со скоростью 13400 об/мин (MiniSpin, Eppendorf). Аликвоту супернатанта объемом 300 мкл отбирали в пробирки с сорбентом №2 (этап твердофазной экстракции с сорбентом С18) массой 50 мг из набора QuECheRs. Образцы встряхивали на шейкере в течение 10 мин, затем центрифугировали течение 10 мин со скоростью 13400 об/мин (MiniSpin, Eppendorf). Аликвоту супернатанта объемом 20 мкл смешивали с 180 мкл метанола, переносили в виалы для анализа.

3.2.8 Исследование стабильности агентов

Для изучения стабильности камфецина в сухих пятнах крови были приготовлены образцы цельной крови с концентрациями 10, 100 и 1000 нг/мл. Для этого к 950 мкл цельной крови добавляли 50 мкл рабочего раствора камфецина и интенсивно перемешивали на Vortex и выдерживали при +4˚C. Образец цельной крови объемом 20 мкл наносили на бумагу Whatman Protein saver card 903 и высушивали в течение 3 часов при комнатной температуре. Карты помещали в зип-пакеты с осушителем и помещали на хранение при комнатной температуре (+24˚C), в бытовой холодильник (+4˚C), в морозильную камеру бытового холодильника (–12˚C) и в кельвинатор (–70˚C). На 7, 14 и 24 день по 4 образца крови обрабатывали согласно протоколу, описанному в пункте 3.2.6, и анализировали.

Для оценки стабильности KS-389 в цельной крови был приготовлен образец с концентрацией KS-389 1000 нг/мл в цельной крови. Для этого к 90 мкл цельной крови мыши добавляли 10 мкл рабочего раствора KS-389 с концентрацией 10 мкг/мл. Образец интенсивно перемешивали на Vortex. Аликвоты объемом 10 мкл отбирали через 5, 15, 30, 60 и 120 минут и смешивали с 50 мкл смеси 0.2 М водного раствора сульфата цинка и метанола (2:8 по объему). Образцы перемешивали на шейкере в течение 30 минут, центрифугировали в течение 10 минут со скоростью 13400 об/мин (MiniSpin, Eppendorf). Аликвоту 40 мкл отбирали и помещали в виалы для анализа.

Для оценки стабильности KS-389 в цельной крови был приготовлен образец с концентрацией KS-389 1000 нг/мл в цельной крови. Для этого к 90 мкл цельной крови мыши добавляли 10 мкл рабочего раствора KS-389 с концентрацией 10 мкг/мл. Образец интенсивно перемешивали на Vortex. Аликвоты объемом 10 мкл отбирали через 5, 15, 30, 60 и 120 минут и смешивали с 50 мкл смеси 0.2 М водного раствора сульфата цинка и метанола (2:8 по объему). Образцы перемешивали на шейкере в течение 30 минут, центрифугировали в течение 10 минут со скоростью 13400 об/мин (MiniSpin, Eppendorf). Аликвоту 40 мкл отбирали и помещали в виалы для анализа.

Для оценки стабильности OL9-116 в цельной крови был приготовлен образец с концентрацией 1000 нг/мл в цельной крови. Для этого к 90 мкл цельной крови мыши добавляли 10 мкл рабочего раствора OL9-116 с концентрацией 10 мкг/мл. Образец интенсивно перемешивали на Vortex. Аликвоты объемом 10 мкл отбирали через 5, 10, 15, 30, 60 и 120 минут, обрабатывали согласно методике, приведенной в пункте 3.2.6., и анализировали.

3.3 Аналитические методы

Анализ проводили с использованием хроматографа Shimadzu LC-20AD Prominence, снабженным охлаждаемым автосамплером и градиентным насосом. После проведения анализа хроматографическую колонку уравновешивали для выполнения следующего анализа. Масс-спектрометрическую детекцию проводили с применением ионизации электрораспылением в режиме MRM в области положительно заряженных ионов. Условия анализа для каждого из веществ представлены в соответствующих подразделах. Параметры детектирования аналитов и внутренних стандартов в режиме MRM приведены в таблице 25. Управление прибором и сбор информации осуществляли с помощью программного обеспечения Analyst 1.6.3 (AB SCIEX), обработка хроматограмм велась с использованием программы MultiQuant 2.1 (AB SCIEX).

3.3.1. Условия анализа камфецина

Для хроматографического разделения была использована колонка ProntoSil 120-5-AQ C18 (2×75 мм, 5 μм, Эконова, Новосибирск). В качестве подвижной фазы А использовали 0,1% раствор муравьиной кислоты в деионизованной воде, в качестве подвижной фазы В – 0,1% раствор муравьиной кислоты в метаноле. Хроматографическое разделение проводили в градиентном режиме элюирования: 0 мин – 3% В; 0,5 мин – 3% В, 5,5 мин - 100%В; 7,7 мин – 100% В. Уравновешивание колонки осуществлялось в течение 2 минут. Скорость потока 200 мкл/мин, объем пробы 50 мкл. Общее время анализа составило 9,8 минут.

Масс-спектрометрическую детекцию проводили на масс-спектрометре 3200 QTRAP (AB SCIEX, США). Для анализа были использованы следующие условия: CUR (газовая завеса) = 30 psi, CAD (газ для диссоциации, активированной соударениями) = Medium, IS (напряжение на источнике) = 5500 В, TEM (температура) = 400°C, GS1 (газ-распылитель) = 40 psi, GS2 (газ-осушитель) = 70 psi, EP (входной потенциал) = 12,0 В, Dwell time (время фрагментации) = 80 мс.

3.3.2. Условия анализа KS-389

Для хроматографического разделения была использована колонка ProntoSil 120-5-AQ C18 (2×75 мм, 5 μм, Эконова, Новосибирск). В качестве подвижной фазы А использовали 0,1% раствор муравьиной кислоты в деионизованной воде, в качестве подвижной фазы В – 0,1% раствор муравьиной кислоты в метаноле. Хроматографическое разделение проводили в градиентном режиме элюирования: 0 мин - 20% В; 0,5 мин - 20% В; 1 мин – 93%, 4 мин - 97% В; 8 мин - 100% В;

10 мин – 100% B. Уравновешивание колонки осуществлялось в течение 2,5 минут. Скорость потока 300 мкл/мин, объем пробы 5 мкл. Общее время анализа составило 12,5 минут.

Масс-спектрометрическую детекцию проводили на масс-спектрометре 6500 QTRAP (AB SCIEX, США). Для анализа были использованы следующие условия: CUR (газовая завеса) = 30 psi, CAD (газ для диссоциации, активированной соударениями) = Medium, IS (напряжение на источнике) = 5500 В, TEM (температура) = 300°C, GS1 (газ-распылитель) = 30 psi, GS2 (газ-осушитель) = 30 psi, EP (входной потенциал) = 10,0 В, Dwell time (время фрагментации) = 80 мс.

3.3.3. Условия анализа агента OL9-116

Для хроматографического разделения была использована колонка ProntoSil 120-5-AQ C8 (2×75 мм, 5 μм, Эконова, Новосибирск), термостатируемую при 40˚C. Для анализа образцов цельной крови в качестве подвижной фазы А использовали 0,1% раствор муравьиной кислоты в деионизованной воде, в качестве подвижной фазы В – 0,1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле. Хроматографическое разделение проводили в градиентном режиме элюирования: 0 мин - 20% В; 1 мин - 90% В; 3,7 мин – 90% В. Уравновешивание колонки осуществлялось в течение 1,7 минуты. Скорость потока 350 мкл/мин, объем пробы 10 мкл. Общее время анализа составило 5,5 минут.

Масс-спектрометрическую детекцию проводили на масс-спектрометре 6500 QTRAP (AB SCIEX, США). Для анализа были использованы следующие условия: CUR (газовая завеса) = 30 psi, CAD (газ для диссоциации, активированной соударениями) = High, IS (напряжение на источнике) = 5500 В, TEM (температура) = 250°C, GS1 (газ-распылитель) = 20 psi, GS2 (газ-осушитель) = 20 psi, EP (входной потенциал) = 10,0 В, Dwell time (время фрагментации) = 80 мс.

Для анализа образцов гомогенатов легких, печени, почек в качестве подвижной фазы А использовали 0,1% раствор муравьиной кислоты в деионизованной воде, в качестве подвижной фазы В – 0,1% раствор муравьиной кислоты в метаноле. Хроматографическое разделение проводили в градиентном режиме элюирования: 0 мин - 5% В; 2 мин - 93% В; 6 мин – 93% В. Уравновешивание колонки осуществлялось в течение 2,5 минут. Скорость потока 300 мкл/мин, объем пробы 10 мкл. Общее время анализа составило 8,5 минут.

Таблица 25. Параметры сканирования веществ в режиме MRM.

Соединение	Родительский ион (m/z)	Дочерний ион (m/z)	Потенциал декластеризации, В	Энергия соударений, В	Потенциал на выходе ячейки столкновения, В
Камфецин	196,4	122,2	61	37	8
		153,3	51	37	16
KS-389	463,5	135,1	241	75	12
		107,2	231	75	12
		93,0	241	81	10
OL9-116	590,4	534,4	231	35	10
		343,4	226	51	6
		219,3	226	57	12
2,5-BDPO (внутренний стандарт)	365,3	336,2	146	31	18
		322,2	146	35	16
		176,2	146	43	18
2-Ad (внутренний стандарт)	151,2	93,1	16	35	14
		107,2	21	37	8

3.4 Валидация методик количественного определения

Параметры валидации для подтверждения пригодности методик для количественного определения ксенобиотиков в биологических образцах определяли в соответствии с рекомендациями по валидации биоаналитических методик FDA, EMA [18,19]. В процессе валидации была доказана применимость разработанных методик: для каждого соединения оценивались критерии приемлемости, на основании которых делали вывод о пригодности разработанной методики. Пригодность методики оценивали по показателям селективности, градуировочной зависимости, нижнего предела количественного обнаружения (LLOQ), точности и прецизионности внутри и между циклами, степени извлечения, матричного эффекта, эффекта переноса, и стабильности.

3.4.1. Селективность

Селективность разработанных методик оценивали путем анализа интерференции в холостых образцах, которые сравнивали с образцами контроля качества с содержанием в них исследуемого аналита, равным нижнему пределу его количественного определения (на уровне LLOQ). Для оценки селективности использовали по 2 холостых образца биологических матриц (цельная кровь, плазма крови, гомогенаты мозга, печени, почек, первичный опухолевый узел), проанализированных в 3 повторах.

Селективность разработанной методики считали приемлемой в том случае, если в исследуемых холостых образцах отсутствовали интерферирующие пики с временем удерживания, характерным для исследуемого аналита. В холостых образцах допускалось наличие незначительной интерференции, при условии, что сигнал интерферирующего пика составлял не более 20% от нижнего предела количественного определения (уровень LLOQ) для исследуемого аналита.

3.4.2. Градуировочная зависимость и нижний предел количественного определения

Для описания зависимости отклика аналитического сигнала системы от концентрации исследуемых аналитов в соответствующем образце были построены градуировочные зависимости с использованием свежеприготовленных стандартов. Каждый из образцов был приготовлен в двух повторах. Процедуру повторяли дважды для подтверждения межсерийной сходимости.

Градуировочные зависимости были построены путем аппроксимации отношения сигналов аналит / внутренний стандарт в зависимости от номинальной концентрации вещества на основе анализа шести градуировочных образцов, каждый из которых анализировали в трех повторах. Градуировочную зависимость считают приемлемой в случае, если при построении зависимости в трех аналитических циклах коэффициент корреляции составляет не менее 0,99.

Для описания параметров градуировочных зависимостей применяли взвешенную регрессию типа Хилла, построенную методом наименьших квадратов. Для каждой из градуировочных зависимостей определяли уравнение зависимости и коэффициент корреляции.

Нижний предел количественного определения (LLOQ) был определен как самая низкая концентрация вещества в биологической матрице, которая могла быть надежно количественно определена с приемлемой правильностью и прецизионностью. Основными критериями для определения LLOQ являются точность найденной концентрации в пределах ±20% от номинального значения и соотношение сигнала аналита к фоновому шуму (не менее 10:1).

3.4.3. Точность и прецизионность

Для определения точности и прецизионности методик были использованы образцы LLOQ и контроля качества с низким (QCL), средним (QCM) и высоким (QCH) уровнями концентрации вещества. Низкий уровень концентрации определялся как трехкратное значение концентрации, соответствующей LLOQ. Средний уровень концентрации определялся как 50% от максимального значения концентрации в градуировочной зависимости. Высокий уровень концентрации

определялся как 80% от максимального значения концентрации в градуировочной зависимости. Значения концентраций образцов контроля качества не совпадали со значениями концентраций в градуировочной зависимости.

Каждый из образцов был приготовлен в двух повторах и проанализирован трижды. Процедуру повторяли в течение трех последовательных дней для оценки внутри- и межсерийной точности и прецизионности результатов. Полученные значения рассчитанных концентраций внутри и между сериями должны иметь допустимую погрешность не более 15% от номинального значения, а для образцов LLOQ – 20%. Относительное среднеквадратичное отклонение для шести повторов должно находиться в пределах ±20% для нижнего предела количественного определения, ±15% для остальных концентраций.

3.4.4. Степень извлечения и матричный фактор

Для оценки степени извлечения и матричного фактора были приготовлены, обработаны и проанализированы образцы контроля качества низких и высоких уровней концентраций в двух повторах. Значения степени извлечения и матричного фактора рассчитывали по следующим уравнениям:

$$Rec = S_1/S_2 \times 100\ \%$$

$$MF = S_2/S_3 \times 100\ \%,$$

где Rec – степень извлечения вещества, ME – матричный фактор, S_1 – площадь пика вещества в соответствующей матрице, S_2 – площадь пика вещества, добавленного после проведения всех этапов пробоподготовки холостой матрицы, S_3 – площадь пика вещества в чистом растворителе, соответствующая концентрации вещества с учетом всех этапов разбавления в течение проведения пробоподготовки.

3.4.5. Стабильность и эффект переноса

Стабильность образцов оценивали путем анализа растворов контроля качества с низкой и высокой концентрациями в трех повторах. Образцы помещали в автосамплер и выдерживали при 24°C в течение 24 часов. Спустя сутки образцы анализировали повторно и фиксировали изменение площади пика вещества. Образцы считали стабильными в случае, если средняя концентрация исследуемого аналита в образцах контроля качества после их хранения в предназначенных условиях была в пределах ±15% от их номинальных значений.

Эффект переноса оценивали путем анализа холостого образца после образца с максимальной концентрацией агента из градуировочной серии. Величину эффекта переноса считали приемлемой, если перенос в холостом образце, который хроматографировали после образца из градуировочной серии, составлял не более 20% от нижнего предела количественного определения исследуемого аналита (LLOQ).

3.5 Эксперименты *in vivo*

3.5.1 Приготовление лекарственных форм

Для изучения фармакокинетики и распределения агента KS-389 была приготовлена лекарственная форма для введения мышам. Для этого 6,5 мг вещества смешивали с 200 мкл Твин-80 и встряхивали на шейкере в течение 30 минут. К полученной смеси порционно добавляли 9,8 мл физиологического раствора и перемешивали на шейкере до получения однородной суспензии.

Для изучения фармакокинетики агента OL9-116 была приготовлена лекарственная форма. Для этого 750 мг вещества растворяли в 150 мкл ДМСО и перемешивали. К раствору добавляли 100 мкл Твин-80 и перемешивали на шейкере до получения однородной суспензии. Полученную суспензию смешивали с 750 мкл физиологического раствора при порционном добавлении и перемешивали.

3.5.2 Исследование фармакокинетики

Для проведения эксперимента по изучению фармакокинетики агента KS-389 свежеприготовленную лекарственную форму вводили внутрибрюшинно группе мышей (n=6) в дозе 5 мг/кг. Образцы крови отбирали из хвостовой вены через 30 минут, 1, 2, 3, 4, 5, 6 и 24 часа после введения вещества. Аликвоту образца цельной крови объемом 10 мкл наносили на бумагу Whatman Protein Saver Card 903. Образцы сухих пятен крови высушивали на воздухе в течение 3 часов и обрабатывали в соответствии с методикой, описанной в разделе 3.2.6.

Для исследования фармакокинетики агента OL9-116 группе мышей (n=6) вводили лекарственную форму внутрижелудочно с помощью зонда в дозе 150 мг/кг. Цельную кровь объемом 10 мкл отбирали из хвостовой вены через 30 минут, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 и 24 часа. При исследовании фармакокинетики агента OL9-116 группе мышей (n=8) вводили суспензию внутрибрюшинно в дозе 5 мг/кг. Цельную кровь объемом 10 мкл отбирали из хвостовой вены через 15, 30 минут, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 часа. Аликвоту образца крови объемом 10 мкл обрабатывали в соответствии с разработанной методикой, описанной в разделе 3.2.6.

Фармакокинетические параметры для агентов ($T_{1/2}$, T_{max}, C_{max}, $AUC_{0-\infty}$, $MRT_{0-\infty}$, CL) были рассчитаны с помощью программного обеспечения PKSolver [174]. Полученные данные представлены в виде средних значений ± стандартное отклонение (SD).

3.5.3 Исследование распределения

Для исследования распределения агента KS-389 использовали такие органы, как мозг, печень и почки. Лекарственную форму вводили внутрибрюшинно группе мышей (n=14) в дозе 5 мг/кг. После введения вещества в каждой временной точке двух животных подвергали эвтаназии, цельные органы отбирали, промывали в физиологическом растворе и замораживали в жидком азоте. Отбор органов осуществлялся через 1, 2, 3, 4, 5, 26 и 24 часа. Органы хранили при температуре –70˚C. Образцы тканей отбирали после полной разморозки и обрабатывали в соответствии с методикой, описанной в разделе 3.2.7.

Для исследования распределения агента OL9-116 использовали такие органы, как легкие, печень, почки, первичные опухолевые узлы. Лекарственную форму вводили внутрижелудочно группе здоровых мышей (n=36) в дозе 150 мг/кг. После введения вещества в каждой временной точке трех животных подвергали эвтаназии, цельные органы отбирали через 30 минут, 1, 2, 4, 7, 10, 13, 16, 20, 24, 36, 48 часов, промывали в физиологическом растворе и замораживали в жидком азоте. Группе животных (n=15) с трансплантированной карциномой легких Льюис (LLC) вводили лекарственную форму внутрижелудочно в дозе 150 мг/кг на 17 день после трансплантации. После введения вещества в каждой временной точке трех животных подвергали эвтаназии, цельные органы отбирали через 30 минут, 1, 3, 7, 13 часов, промывали в физиологическом растворе и замораживали в жидком азоте. Органы хранили при температуре –70˚C. Образцы тканей отбирали после полной разморозки и обрабатывали в соответствии с методикой, описанной в разделе 3.2.7.

Заключение

Масс-спектрометрия в сочетании с жидкостной хроматографией является практически универсальным методом для анализа ксенобиотиков в биологических матрицах. Развитие методов пробоподготовки не только биологических жидкостей, но и тканей позволяют наиболее полно извлекать аналит и устранять мешающее влияние компонентов биологической матрицы.

В работе было продемонстрировано применение различных методов пробоподготовки, описанных в литературном обзоре, таких как осаждение белков, экстракция сухого пятна крови, а также механическая гомогенизация тканей. Кроме того, в ходе работы были использованы методы твердофазной и жидко-жидкостной экстракции в рамках поиска наиболее оптимального способа пробоподготовки цельной крови. Разработанные методики количественного определения камфецина и агентов KS-389 и OL9-116 могут быть адаптированы для аналогичных исследований при проведении клинических исследований. Применимость разработанных методик была продемонстрирована в рамках проведения доклинических исследований веществ: изучения фармакокинетики, распределения и стабильности агентов *in vitro*.

Исследование стабильности камфецина в сухих пятнах крови позволяет установить срок хранения и транспортировки образцов до 5 дней при охлаждении и не более 1 месяца в условиях глубокой заморозки. В рамках проведенного исследования было показано, что камфецин обратимо сорбируется на форменных элементах крови, а его распределение между компонентами крови позволяет использовать плазму для количественного определения вещества при проведении клинических испытаний.

Исследование фармакокинетики и распределения агента KS-389, ингибитора TDP1 на основе дегидроабиетиновой кислоты, позволило доказать его проникновение через гематоэнцефалический барьер, что является важным при терапии глиомы. Дальнейшие исследования фармакологических эффектов, а также использование модели ксенотрансплантата опухолевых клеток позволят разработать применимость вещества для терапии опухолей и режим дозировки и его введения.

Последовательное исследование фармакокинетики агента OL9-116, ингибитора TDP1 на основе усниновой кислоты, позволило обоснованно снизить его дозу в 30 раз при изменении способа введения мышам. При этом сравнение фармакокинетики OL9-116 и топотекана привело к изменению схемы введения препаратов и усилению противоопухолевого эффекта на модели карциномы легких Льюис. Одним из интересных и перспективных исследований с применением масс-спектрометрических подходов является исследование фармакометаболомики агента, поскольку в настоящее время достаточно мало известно о метаболических изменениях, связанных с противоопухолевым лечением разрабатываемыми или рекомендованными препаратами *in vivo*.

Выводы

1. Разработанные методики количественного определения камфецина в плазме крови крысы, а также производных дегидроабиетиновой (агента KS-389) и усниновой (агента OL9-116) кислот в цельной крови и органах мышей полностью соответствуют критериям валидации и могут быть использованы в доклинических исследованиях.
2. Установлено, что длительное хранение образцов сухих пятен крови, содержащих камфецин, возможно только в условиях глубокой заморозки. Обнаружено, что в ходе хранения образцов при –12°C более 14 дней, а также при комнатной температуре и +4°C более 5 дней происходит их деградация, что может привести к получению некорректных результатов анализа.
3. Показано, что камфецин обратимо сорбируется на форменных элементах крови, а его распределение между компонентами крови практически не зависит от значений концентрации, температуры и гематокрита.
4. Установлены фармакокинетические параметры для агента KS-389 при внутрибрюшинном введении мышам в дозе 5 мг/кг, в частности, показано, что среднее значение максимальной концентрации вещества в крови C_{max} составляет 52 ± 11 нг/мл, а среднее время ее достижения T_{max} = 75 ± 36 мин. Обнаружено, что агент KS-389 проникает через гематоэнцефалический барьер, накапливается в печени и почках, при этом соотношение концентрации в ткани к концентрации в крови может достигать 40.
5. Показано, что внутрибрюшинное введение соединения OL9-116 позволяет снизить дозу в 30 раз для достижения значений C_{max} и AUC, аналогичных внутрижелудочному введению. На основании полученных фармакокинетических параметров OL9-116 сформулированы рекомендации по введению OL9-116 и топотекана.
6. Обнаружено, что распределение соединения OL9-116 в органах мышей с перевитой карциномой легких Льюис отличается трехкратным снижением максимальной концентрации вещества по сравнению со здоровыми животными. У опухоленосителей значения концентраций OL9-116 в гомогенатах печени, почек и первичных опухолевых узлов сохраняется в течение 12 часов.

Список литературы

1. Atanas G., Waltenberger B., Pferschy-Wenzig E.-M., Linder T., Wawrosch C., Uhrin P., Temml V., Wang L., Schwaiger S., Heiss E. H., Rollinger J. M., Schuster D., Breusse J. M., Bochkov V., Mihovilovic M. D., Kopp B., Bauer R., Dirscha V. M., Stuppner H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review // Biotechnol. Adv. – 2015. – V. 33. – Is. 8. – P. 1582–1614.
2. Newman D.J., Cragg G.M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014 // J. Nat. Prod. – 2016. – V. 79. – Is. 3. – P. 629–661.
3. Waltenberger B., Mocan A., Šmejkal K., Heiss E. H., Atanasov A. G. Natural Products to Counteract the Epidemic of Cardiovascular and Metabolic Disorders // Molecules. – 2016. – V. 21. – Is. 6. – P. 807.
4. Patridge E. et al. An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives // Drug Discov. Today. 2016. Vol. 21, № 2. P. 204–207.
5. Kola I., Landis J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? // Nat. Rev. Drug Discov. – 2004. – V. 3. – P. 711–715.
6. Sokolova A. S., Yarovaya O. I., Nefedov A. A., Salakhutdinov N. F. Development and Validation of a Method for Determination of a New Effective Inhibitor of Influenza Virus H1N1 in Blood Plasma // Pharm. Chem. J. – 2018. – V. 51. – Is. 12. – P. 1102–1105.
7. Rogachev A. D., Yarovaya O. I., Ankov S. V., Khvostov M. V., Tolstikova T. G., Pokrovsky A. G., Salakhutdinov N. F. Development and validation of ultrafast LC-MS/MS method for quantification of anti-influenza agent camphecene in whole rat blood using dried blood spots and its application to pharmacokinetic studies // J. Chromatogr. B. – 2016. – V. 1036–1037. – P. 136–141.
8. Rogachev A. D., Yarovaya O. I., Fatianova A. V., Lavrinenko V. A., Amosov E. V., Zarubaev V. V., Pokrovsky A. G., Salakhutdinov N. F. Untargeted search and identification of metabolites of antiviral agent camphecene in rat urine by liquid chromatography and mass spectrometry and studying their distribution in organs following peroral administration of the compound // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2018. – V. 161. – P. 383–392.
9. Kovaleva K., Mamontova E., Yarovaya O., Zakharova O., Zakharenko A., Lavrik O., Salakhutdinov N. Dehydroabietylamine-based thiazolidin-4-ones and 2-thioxoimidazolidin-4-ones as novel tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitors // Mol. Divers. – 2021. – V. 25. – Is. 4. – P. 2389–2397.
10. Kovaleva K., Oleshko O., Mamontova E., Yarovaya O., Zakharova O., Zakharenko A., Kononova A., Dyrkheeva N., Cheresiz S., Pokrovsky A., Lavrik O., Salakhutdinov N. Dehydroabietylamine Ureas

and Thioureas as Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 Inhibitors That Enhance the Antitumor Effect of Temozolomide on Glioblastoma Cells // J. Nat. Prod. – 2019. – V. 82. – Is. 9. – P. 2443–2450.

11. Kovaleva K., Yarovaya O., Ponomarev K., Cheresiz S., Azimirad A., Chernyshova I., Zakharenko A., Konev V., Khlebnikova T., Mozhaytsev E., Suslov E., Nilov D., Švedas V., Pokrovsky A., Lavrik O., Salakhutdinov N. Design, Synthesis, and Molecular Docking Study of New Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 (TDP1) Inhibitors Combining Resin Acids and Adamantane Moieties: 5 // Pharmaceuticals. – 2021. – V. 14. – Is. 5. – P. 422.
12. Luzina O.A., Salakhutdinov N.F. Usnic acid and its derivatives for pharmaceutical use: a patent review (2000-2017) // Expert Opin. Ther. Pat. – 2018. – V. 28. – Is. 6. – P. 477–491.
13. Luzina O., Filimonov A., Zakharenko A., Chepanova A., Zakharova O., Ilina E., Dyrkheeva N., Likhatskaya G., Salakhutdinov N., Lavrik O. Usnic Acid Conjugates with Monoterpenoids as Potent Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 Inhibitors // J. Nat. Prod. – 2020. – V. 83. – Is. 8. – P. 2320–2329.
14. Dyrkheeva N. S., Filimonov A. S., Luzina O. A., Zakharenko A. L., Ilina E. S., Malakhova A. A., Medvedev S. P., Reynisson J., Volcho K. P., Zakian S. M., Salakhutdinov N. F., Lavrik O. I. New Hybrid Compounds Combining Fragments of Usnic Acid and Monoterpenoids for Effective Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 Inhibition // Biomolecules. – 2021. – V. 11. – Is. 7. – P. 973.
15. Zakharenko A., Luzina O., Koval O., Nilov D., Gushchina I., Dyrkheeva N., Švedas V., Salakhutdinov N., Lavrik O. Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 Inhibitors: Usnic Acid Enamines Enhance the Cytotoxic Effect of Camptothecin // J. Nat. Prod. – 2016. – V. 79. – Is. 11. – P. 2961–2967.
16. Koldysheva E. V., Men’shchikova A. P., Lushnikova E. L., Popova N. A., Kaledin V. I., Nikolin V. P., Zakharenko A. L., Luzina O. A., Salakhutdinov N. F., Lavrik O. I. Antimetastatic Activity of Combined Topotecan and Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase-1 Inhibitor on Modeled Lewis Lung Carcinoma // Bull. Exp. Biol. Med. – 2019. – V. 166. – Is. 5. – P. 661–666.
17. Nikolin V. P., Popova N. A., Kaledin V. I., Luzina O. A., Zakharenko A. L., Salakhutdinov N. F., Lavrik O. I. The influence of an enamine usnic acid derivative (a tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitor) on the therapeutic effect of topotecan against transplanted tumors in vivo // Clin. Exp. Metastasis. – 2021. – V. 38. – Is. 5. – P. 431–440.
18. FDA Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. // U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. – 2018.
19. Guideline on process validation for finished products - information and data to be provided in regulatory submissions. // European Medicines Agency. – 2016.

20. Zhang L., Ge Y., Li J., Hao J., Wang H., He J., Gao X.-m., Chang Y.-x. Simultaneous determination of columbianetin-β-d-glucopyranoside and columbianetin in a biological sample by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and identification of other columbianetin-β-d-glucopyranoside metabolites by ultra high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time of flight mass spectrometry // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2018. – V. 153. – P. 221–231.
21. Wang H., Jiang Y., Ding M., Li J., Hao J., He J., Wang H., Gao X.-M., Chang Y.-X. Simultaneous determination and qualitative analysis of six types of components in Naoxintong capsule by miniaturized matrix solid-phase dispersion extraction coupled with ultra high-performance liquid chromatography with photodiode array detection and quadrupole time-of-flight mass spectrometry // J. Sep. Sci. – 2018. – V. 41. – Is. 9. – P. 2064–2084.
22. Medema M.H., Fischbach M.A. Computational approaches to natural product discovery // Nat. Chem. Biol. – 2015. – V. 11. – Is. 9. – P. 639–648.
23. Marzo A., Dal Bo L. Tandem Mass Spectrometry (LC-MS-MS): a Predominant Role in Bioassays for Pharmacokinetic Studies // Arzneim.-Forsch. (Drug Res.). – 2011. – V. 57, – Is. 02. – P. 122–128.
24. Matuszewski B.K., Constanzer M.L., Chavez-Eng C.M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS // Anal. Chem. – 2003. – V. 75, – Is. 13. – P. 3019–3030.
25. Harper L., Powell J., Pijl E.M. An overview of forensic drug testing methods and their suitability for harm reduction point-of-care services // Harm. Reduct. J. – 2017. – V. 14. – P. 52.
26. Zhu W., Smith J.W., Huang C.-M. Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics // J. Biomed. Biotechnol. – 2010. – V. 2010. – P. 840518.
27. Vaudel M., Sickmann A., Martens L. Peptide and protein quantification: a map of the minefield // Proteomics. – 2010. – V. 10, – Is. 4. – P. 650–670.
28. Ibrahim S., Lan C., Chabot C., Mitsa G., Buchanan M., Aguilar-Mahecha A., Elchebly M., Poetz O., Spatz A., Basik M., Batist G., Zahedi R. P., Borchers C. H. Precise quantitation of PTEN by immuno-MRM: a tool to resolve the breast cancer biomarker controversy // Anal. Chem. – 2021. – V. 93. – Is. 31. – P. 10816–10824.
29. Gaspar V. P., Ibrahim S., Zahedi R. P., Borchers C. H. Utility, promise, and limitations of liquid chromatography-mass spectrometry-based therapeutic drug monitoring in precision medicine // J. Mass Spectrom. – 2021. – V. 56. – Is. 11. – P. e4788.

30. Turner N.W., Subrahmanyam S., Piletsky S.A. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review // Anal. Chim. Acta. – 2009. – V. 632. – Is. 2. – P. 168–180.
31. Tsai J.S.-C., Lin G.L. Drug-Testing Technologies and Applications // Drugs of Abuse: Body Fluid Testing / ed. Wong R.C., Tse H.Y. Totowa, Humana Press. – 2005. – P. 29–69.
32. Pehlivanović B., Fetahović D., Aruković E., Žiga N., Bečić F. Animal models in modern biomedical research // Eur. J. Pharm. Med. Res. – 2019. – V. 6. – Is. 7. – P. 35–38.
33. Thomas M. A., Spencer J. F., La Regina M. C., Dhar D., Tollefson A. E., Toth K., Wold W. S. M. Syrian Hamster as a Permissive Immunocompetent Animal Model for the Study of Oncolytic Adenovirus Vectors // Cancer Res. – 2006. – V. 66. – Is.3. – P. 1270–1276.
34. Berthold E. C., Kamble S. H., Raju K. S., King T. I., Popa R., Sharma A., León F., Avery B. A., McMahon L. R., McCurdy C. R. Preclinical pharmacokinetic study of speciociliatine, a kratom alkaloid, in rats using an UPLC-MS/MS method // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2021. – V. 194. – P. 113778.
35. Mukherjee P., Roy S., Ghosh D., Nandi S. K. Role of animal models in biomedical research: a review // Lab. Anim. Res. – 2022. – V. 38. – P. 18.
36. Gibbs R.A., Weinstock G.M., Metzker M.L., Muzny D.M., Sodergren E.J., Scherer S.et al. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution // Nature. – 2004. – V. 428ю – Is. 6982. – P. 493–521.
37. Sherwood C. A., Eastham A., Lee L. W., Risler J., Mirzaei H., Falkner J. A., Martin D. B. Rapid Optimization of MRM-MS Instrument Parameters by Subtle Alteration of Precursor and Product m/z Targets // J. Proteome Res. – 2009. – V. 8. – Is. 7. – P. 3746–3751.
38. Bioavailability and Bioequivalence Studies Submitted in NDAs or INDs — General Considerations. – 2014.
39. Marzo A., Monti N.C., Vuksic D. Experimental, extrapolated and truncated areas under the concentration-time curve in bioequivalence trials // Eur. J. Clin. Pharmacol. – 1999. V. 55. – Is. 9. – P. 627–631.
40. Nelson D. R., Koymans L., Kamataki T., Stegeman J. J., Feyereisen R., Waxman D. J., Waterman M. R., Gotoh O., Coon M. J., Estabrook R. W., Gunsalus I. C., Nebert D. W. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature // Pharmacogenetics. – 1996. – V. 6. – Is. 1. – P. 1–42.
41. Kiang T.K.L., Ensom M.H.H., Chang T.K.H. UDP-glucuronosyltransferases and clinical drug-drug interactions // Pharmacol. Ther. – 2005. – V. 106. – Is. 1. – P. 97–132.

42. Ghosh C., Hossain M., Solanki J., Dadas A., Marchi N., Janigro D. Pathophysiological implications of neurovascular P450 in brain disorders // Drug Discov. Today. – 2016. – V. 21. – Is. 10. – P. 1609–1619.
43. Cerny M. A., Kalgutkar A. S., Obach R. S., Sharma R., Spracklin D. K., Walker G. S. Effective Application of Metabolite Profiling in Drug Design and Discovery // J. Med. Chem. – 2020. – V. 63. – Is. 12. – P. 6387–6406
44. Shanu-Wilson J., Evans L., Wrigley S., Steele J., Atherton J., Boer J. Biotransformation: Impact and Application of Metabolism in Drug Discovery // ACS Med. Chem. Lett. – 2020. – V. 11. – Is. 11. – P. 2087–2107.
45. Ma S., Subramanian R. Detecting and characterizing reactive metabolites by liquid chromatography/tandem mass spectrometry // J. Mass Spectrom. JMS. – 2006. – V. 41. – Is. 9. – P. 1121–1139.
46. Kalgutkar A.S. Designing around Structural Alerts in Drug Discovery // J. Med. Chem. – 2020. – V. 63. – Is. 12. – P. 6276–6302.
47. Wen, B., Zhu, M. Applications of mass spectrometry in drug metabolism: 50 years of progress // Drug Metabolism Reviews. – 2015. – V. 47. – Is. 1. – P. 71–87.
48. Abdelhafez O. H., Othman E. M., Fahim J. R., Desoukey S. Y., Pimentel-Elardo S. M., Nodwell J. R., Schirmeister T., Tawfike A., Abdelmohsen U. R. Metabolomics analysis and biological investigation of three Malvaceae plants // Phytochem. Anal. PCA. – 2020. – V. 31. – Is. 2. – P. 204–214.
49. Mussap M., Antonucci R., Noto A., Fanos V. The role of metabolomics in neonatal and pediatric laboratory medicine // Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem. – 2013. – V. 426. – P. 127–138.
50. Ganesan R., Gupta H., Jeong J.-J., Sharma S. P., Won S.-M., Oh K.-K., Yoon S. J., Kim D. J., Suk K. T. A metabolomics approach to the validation of predictive metabolites and phenotypic expression in non-alcoholic fatty liver disease // Life Sci. – 2023. – V. 322. – P. 121626.
51. Gathungu R. M., Kautz R., Kristal B. S., Bird S. S., Vouros P. The integration of LC-MS and NMR for the analysis of low molecular weight trace analytes in complex matrices // Mass Spectrom. Rev. – 2020. – V. 39. – Is. 1–2. – P. 35–54.
52. Cabarcos P., Tabernero M. J., Otero J. L., Míguez M., Bermejo A. M., Martello S., De Giovanni N., Chiarotti M. Quantification of fatty acid ethyl esters (FAEE) and ethyl glucuronide (EtG) in meconium for detection of alcohol abuse during pregnancy: Correlation study between both biomarkers // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2014. – V. 100. – P. 74–78.
53. Cederbaum A.I. Alcohol Metabolism // Clin. Liver Dis. – 2012. – V. 16. – Is. 4. – P. 667–685.

54. Finelli R., Mottola F., Agarwal A. Impact of Alcohol Consumption on Male Fertility Potential: A Narrative Review // Int. J. Environ. Res. Public. Health. – 2021. – V. 19. – Is. 1. – P. 328.
55. Pellegrini M., Marchei E., Papaseit E., Farré M., Zaami S. UHPLC-HRMS and GC-MS Screening of a Selection of Synthetic Cannabinoids and Metabolites in Urine of Consumers: 8 // Medicina. – 2020. – V. 56. – Is. 8. – P. 408.
56. Singleton C. Recent advances in bioanalytical sample preparation for LC–MS analysis // Bioanalysis. – 2012. – V. 4. – Is. 9. – P. 1123–1140.
57. Grankvist K., Gomez R., Nybo M., Lima-Oliveira G., von Meyer A. Preanalytical aspects on short- and long-term storage of serum and plasma // Diagn. Berl. Ger. – 2019. – V. 6. – Is. 1. – P. 51–56.
58. Royo F., Björk N., Carlsson H.-E., Mayo S., Hau J. Impact of chronic catheterization and automated blood sampling (Accusampler) on serum corticosterone and fecal immunoreactive corticosterone metabolites and immunoglobulin A in male rats // J. Endocrinol. – 2004. – V. 180. – Is. 1. – P. 145–153.
59. Wang X., Ren J., Zhu S., Ren G., Wang L., Chen X., Qiu Z., Zhang C. Pharmacokinetics and tissue distribution of eupatilin and its metabolite in rats by an HPLC-MS/MS method // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2018. – V. 159. – P. 113–118.
60. Şentürka R., Wang Y., Schinkel A. H., Beijnen J. H., Sparidans R. W. Quantitative bioanalytical assay for the selective RET inhibitors selpercatinib and pralsetinib in mouse plasma and tissue homogenates using liquid chromatography-tandem mass spectrometry // J. Chromatogr. B. – 2020. – V. 1147. – P. 122131.
61. Rizk M. L., Zou L., Savic R. M., Dooley K. E. Importance of Drug Pharmacokinetics at the Site of Action // Clin. Transl. Sci. – 2017. – V. 10. – Is. 3. – P. 133–142.
62. Lu M., Zhu K., Schulam P. G., Chai T. C. A non-enzymatic method for dissection of mouse bladder urothelial tissue // Nature Protocols. – 2019. – V. 14. – P. 1280–1292.
63. Ho S. Challenges of atypical matrix effects in tissue // Bioanalysis. – 2013. – V. 5. – Is. 19. – P. 2333–2335.
64. Wu Y.-T., Huang C.-M., Lin C.-C., Ho W.-A., Lin L.-C., Chiu T.-F., Tarng D.-C., Lin C.-H., Tsai T.-H. Determination of melamine in rat plasma, liver, kidney, spleen, bladder and brain by liquid chromatography-tandem mass spectrometry // J. Chromatogr. A. – 2009. – V. 1216. – Is. 44. – P. 7595–7601.
65. Ding Y., Lu C. T., Yang J., Jin X., Yang L., Wang C., Ma Z., Zhu Y. R., Ding L. K., Jia Y. Y., Wen A. D. Application of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method to the

pharmacokinetics, tissue distribution and excretion studies of felotaxel (SHR110008) in tumor-bearing mice // J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci. – 2012. – V. 887–888. – P. 61–66.

66. Aznar M., Úbeda S., Nerin C., Kabir A., Furton K. G. Fabric phase sorptive extraction as a reliable tool for rapid screening and detection of freshness markers in oranges // J. Chromatogr. A. – 2017. – V. 1500. – P. 32–42.
67. Heenaa, Malika A. K., Kabir A., Furton K. G. Development of a Fabric Phase Sorptive Extraction-High Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet Detection Method for the Analysis of Phenyltin Compounds in Environmental Water and Canned Food Sample. – 2018.
68. Zhong B., Campagne O., Salloum R., Purzner T., Stewart C. F. LC-MS/MS method for quantitation of the CK2 inhibitor silmitasertib (CX-4945) in human plasma, CSF, and brain tissue, and application to a clinical pharmacokinetic study in children with brain tumors // J. Chromatogr. B. – 2020. – V. 1152. – P. 122254.
69. Hashimoto M., Taguchi K., Ishiguro T., Kohgo S., Imoto S., Yamasaki K., Mitsuya H., Otagiri M. Pharmacokinetic properties of a novel inosine analog, 4′-cyano-2′-deoxyinosine, after oral administration in rats // PLOS ONE. – 2018. – V. 13. – Is. 6. – P. e0198636.
70. Miniewska K., Godzien J., Mojsak P., Maliszewska K., Kretowski A., Ciborowski M. Mass spectrometry-based determination of lipids and small molecules composing adipose tissue with a focus on brown adipose tissue // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2020. – V. 191. – P. 113623.
71. Kang L., Connolly T. M., Weng N., Jian W. LC–MS/MS quantification of 7α-hydroxy-4-cholesten-3-one (C4) in rat and monkey plasma // J. Chromatogr. B. – 2017. – V. 1064. – P. 49–55.
72. Martínez-Chávez A., Tibben M. M., Broeders J., Rosing H., Schinkel A. H., Beijnen J. H. Development and validation of an LC-MS/MS method for the quantitative analysis of milciclib in human and mouse plasma, mouse tissue homogenates and tissue culture medium // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2020. – V. 190. – P. 113516.
73. Ferdous S., Grossniklaus H. E., Boatright J. H., Nickerson J. M. Characterization of LSD1 Expression Within the Murine Eye // Investig. Opthalmology Vis. Sci. – 2019. – V. 60. – Is. 14. – P. 4619.
74. Liang X., Ubhayakar S., Liederer B. M., Dean B., Qin A. R. R., Shahidi-Latham S., Deng Y. Evaluation of homogenization techniques for the preparation of mouse tissue samples to support drug discovery // Bioanalysis. – 2011. – V. 3. – Is. 17. – P. 1923–1933.
75. Roy B., Das A., Bhaumik U., Sarkar A. K., Bose A., Mukharjee J., Chakrabarty U. S., Das A. K., Pal T. K. Determination of gemifloxacin in different tissues of rat after oral dosing of gemifloxacin

mesylate by LC–MS/MS and its application in drug tissue distribution study // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2010. – V. 52. – Is. 2. – P. 216–226.

76. Yu C., Penn L. D., Hollembaek J., Li W., Cohen L. H. Enzymatic Tissue Digestion as an Alternative Sample Preparation Approach for Quantitative Analysis Using Liquid Chromatography−Tandem Mass Spectrometry // Anal. Chem. – 2004. – V. 76. – Is. 6. – P. 1761–1767.
77. Sakurada K., Ohta H. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of the pyridinium aldoxime 4-PAO in brain, liver, lung, and kidney // J. Chromatogr. B. – 2010. – V. 878. – Is. 17. – P. 1414–1419.
78. DeCaprio J., Kohl T.O. Using Dounce Homogenization to Lyse Cells for Immunoprecipitation // Cold Spring Harb. Protoc. – 2019. – V. 2019. – Is. 7. – P. 551–554.
79. Savage R. E., Hall T., Bresciano K., Bailey J., Starace M., Chan T. C. K. Development and validation of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of ARQ 501 (β-lapachone) in plasma and tumors from nu/nu mouse xenografts // J. Chromatogr. B. – 2008. – V. 872. – Is. 1. – P. 148–153.
80. Clayton D.A., Shadel G.S. Isolation of mitochondria from animal tissue // Cold Spring Harb. Protoc. – 2014. – V. 2014. – Is. 10. – P. 1112–1114.
81. Trindade F., Ferreira A. F., Saraiva F., Martins D., Mendes V. M., Sousa C., Gavina C., Leite-Moreira A., Manadas B., Falcão-Pires I., Vitorino R. Optimization of a Protocol for Protein Extraction from Calcified Aortic Valves for Proteomics Applications: Development of a Standard Operating Procedure // Proteomes. – 2022. – V. 10. – Is. 3. – P. 30.
82. Jia Y., Xie H., Wang G., Sun J., Wang W., Qing H., Wang X., Yang H., Xu M., Gu Y., Yao C., Shen J. Quantitative determination of helicid in rat biosamples by liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry // J. Chromatogr. B. – 2010. – V. 878. – Is. 9. – P. 791–797.
83. Sander K. N., Hay D. P., Broughton-Pipkin F., Khan R. N., Barrett D. A. Evaluation of extraction and normalisation strategies for the analysis of lipids in placental vessels // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2018. – V. 160. – P. 297–300.
84. Roseboom I. C., Rosing H., Beijnen J. H., Dorlo T. P. C. Skin tissue sample collection, sample homogenization, and analyte extraction strategies for liquid chromatographic mass spectrometry quantification of pharmaceutical compounds // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2020. – V. 191. – P. 113590.
85. Malinsky M.D., Jacoby C.B., Reagen W.K. Determination of perfluorinated compounds in fish fillet homogenates: Method validation and application to fillet homogenates from the Mississippi River // Anal. Chim. Acta. – 2011. – V. 683. – Is. 2. – P. 248–257.

86. Hooff G. P., Volmer D. A., Wood W. G., Müller W. E., Eckert G. P. Isoprenoid quantitation in human brain tissue: a validated HPLC–fluorescence detection method for endogenous farnesyl- (FPP) and geranylgeranylpyrophosphate (GGPP) // Anal. Bioanal. Chem. – 2008. – V. 392. – Is. 4. – P. 673–680.
87. Lehner A., Johnson M., Simkins T., Janis K., Lookingland K., Goudreau J., Rumbeiha W. Liquid chromatographic–electrospray mass spectrometric determination of 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP +) in discrete regions of murine brain // Toxicol. Mech. Methods. – 2011. – V. 21. – Is. 3. – P. 171–182.
88. Valiulin S. V., Onischuk A. A., Pyryaeva A. P., An'kov S. V., Baklanov A. M., Shkil N. N., Nefedova E. V., Ershov K. S., Tolstikova T. G., Dultseva G. G. Aerosol Inhalation Delivery of Ag Nanoparticles in Mice: Pharmacokinetics and Antibacterial Action // Antibiotics. – 2023. – V. 12. – Is. 10. – P. 1534.
89. Valiulin S. V., Onischuk A. A., Baklanov A. M., Dubtsov S. N., Dultseva G. G., An'kov S. V., Tolstikova T. G., Belogorodtsev S. N., Schwartz Y. Sh. Studies of the Specific Activity of Aerosolized Isoniazid against Tuberculosis in a Mouse Model // Antibiotics. – 2022. – V. 11. – Is. 11. – P. 1527.
90. Usatov M. S., Dobrynin S. A., Polienko Y. F., Morozov D. A., Glazachev Y. I., An'kov S. V., Tolstikova T. G., Gatilov Y. V., Bagryanskaya I. Yu., Raizvikh A. E., Bagryanskaya E. G., Kirilyuk I. A. Hydrophilic Reduction-Resistant Spin Labels of Pyrrolidine and Pyrroline Series from 3,4-Bis-hydroxymethyl-2,2,5,5-tetraethylpyrrolidine-1-oxyl // Int. J. Mol. Sci. – 2024. – V. 25. – Is. 3. – P. 1550.
91. Scheidweiler K.B., Barnes A.J., Huestis M.A. A validated gas chromatographic–electron impact ionization mass spectrometric method for methamphetamine, methylenedioxymethamphetamine (MDMA), and metabolites in mouse plasma and brain // J. Chromatogr. B. – 2008. – V. 876. – Is. 2. – P. 266–276.
92. Ladenheim B., Krasnova I. N., Deng X., Oyler J. M., Polettini A., Moran T. H., Huestis M. A., Cadet J. L. Methamphetamine-Induced Neurotoxicity Is Attenuated in Transgenic Mice with a Null Mutation for Interleukin-6 // Mol. Pharmacol. – 2000. – V. 58. – Is. 6. – P. 1247–1256.
93. Valiulin S. V., Onischuk A. A., Baklanov A. M., An'kov S. V., Dubtsov S. N., Alekseev A. A., Shkil N. N., Nefedova E. V., Plokhotnichenko M. E., Tolstikova T. G., Dolgov A. M., Dultseva G. G. Aerosol Inhalation Delivery of Ceftriaxone in Mice: Generation Procedure, Pharmacokinetics, and Therapeutic Outcome // Antibiotics. – 2022. – V. 11. – Is. 10. – P. 1305.
94. Melnik E. V., Petukhov A. E., Kozin S. V., Pomerantseva T. Ya., Ramenskaya G. V. Validated HPLC-MS/MS method for quantification of ethylmethylhydroxypyridine succinate in rat brain and its application to a pharmacokinetic study // J. Chromatogr. B. – 2018. – V. 1096. – P. 180–186.

95. DiPerna D. M., Prakapenka A. V., Chung E. P., Sirianni R. W. Non-Enzymatic Tissue Homogenization for Biodistribution Analysis // Targeted Drug Delivery. – 2018. – V. 1831. – P. 191–199.
96. Nirogi R., Padala N. S. P., Boggavarapu R. K., Kalaikadhiban I., Ajjala D. R., Bhyrapuneni G., Muddana N. R. Skin Sample Preparation by Collagenase Digestion for Diclofenac Quantification Using LC–MS/MS After Topical Application // Bioanalysis. – 2016. – V. 8. – Is. 12. – P. 1251–1263.
97. Moreda-Piñeiro A., Bermejo-Barrera A., Bermejo-Barrera P., Moreda-Piñeiro J., Alonso-Rodríguez E., Muniategui-Lorenzo S., López-Mahía P., Prada-Rodríguez D. Feasibility of Pressurization To Speed Up Enzymatic Hydrolysis of Biological Materials for Multielement Determinations // Anal. Chem. – 2007. – V. 79. – Is. 5. – P. 1797–1805.
98. Barton S., Bullock C., Weir D. The effects of ultrasound on the activities of some glycosidase enzymes of industrial importance // Enzyme Microb. Technol. – 1996. – V. 18. – Is. 3. – P. 190–194.
99. Fernandez-Torres R., Bello Lopez M. A., Olias Consentino M., Callejon Mochon M., Perez-Bernal J. L. Application of enzymatic probe sonication extraction for the determination of selected veterinary antibiotics and their main metabolites in fish and mussel samples // Anal. Chim. Acta. – 2010. – V. 675. – Is. 2. – P. 156–164.
100. Chambers E., Wagrowski-Diehl D. M., Lu Z., Mazzeo J. R. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses // J. Chromatogr. B. – 2007. – V. 852. – Is. 1–2. – P. 22–34.
101. Ferreiro-Vera C., Priego-Capote F., Luque De Castro M.D. Comparison of sample preparation approaches for phospholipids profiling in human serum by liquid chromatography–tandem mass spectrometry // J. Chromatogr. A. – 2012. – V. 1240. – P. 21–28.
102. Liakh I., Pakiet A., Sledzinski T., Mika A. Modern Methods of Sample Preparation for the Analysis of Oxylipins in Biological Samples // Molecules. – 2019. – V. 24. – Is. 8. – P. 1639.
103. Sun H., Zhang Q., Zhang Z., Tong J., Chu D., Gu J. Simultaneous quantitative analysis of polyethylene glycol (PEG), PEGylated paclitaxel and paclitaxel in rats by MS/MSALL technique with hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2017. – V. 145. – P. 255–261.
104. Xu Q., Qian Y., Yuan Y., Shao Q., He X., Qiao H. A Quantitative LC-MS/MS Method for Determination of Liposomal Amphotericin B in Rat Plasma and Tissues and its Application to a Toxicokinetic and Tissue Distribution Study // Curr. Pharm. Anal. – 2020. – V. 16. – Is. 7. – P. 880-891.

105. Gupta A., Jansson B., Chatelain P., Massingham R., Hammarlund-Udenaes M. Quantitative determination of cetirizine enantiomers in guinea pig plasma, brain tissue and microdialysis samples using liquid chromatography/tandem mass spectrometry // Rapid Commun. Mass Spectrom. – 2005. – V. 19. – Is. 12. – P. 1749–1757.
106. Ge Y., Li Z., Zhang L., Li J., He J., Hao J., Gao X., Chang Y. Pharmacokinetics and tissue distribution study of bisabolangelone from Angelicae Pubescentis Radix in rat using LC–MS/MS // Biomed. Chromatogr. – 2019. – V. 33. – Is. 3. – P. e4433.
107. Dürig W., Kintzi A., Golovko O., Wiberg K., Ahrens L. New extraction method prior to screening of organic micropollutants in various biota matrices using liquid chromatography coupled to high-resolution time-of-flight mass spectrometry // Talanta. – 2020. – V. 219. – P. 121294.
108. Gullick D. R., Bruckner J. V., White C. A., Chen C., Cummins B. S., Bartlett M. G. Quantitation of Deltamethrin in Rat Liver and Muscle Homogenates Using Dispersive Solid-Phase Extraction with GC-NCI-MS // J. AOAC Int. – 2016. – V. 99. – Is. 3. – P. 813–820.
109. Li Y., Guang C., Zhao N., Feng X., Qiu F. LC–MS/MS Method for Simultaneous Determination of Linarin and Its Metabolites in Rat Plasma and Liver Tissue Samples: Application to Pharmacokinetic and Liver Tissue Distribution Study After Oral Administration of Linarin // Molecules. – 2019. – V. 24. – Is. 18. – P. 3342.
110. Hajkova K., Jurasek B., Sykora D., Palenicek T., Miksatkova P., Kuchar M. Salting-out-assisted liquid–liquid extraction as a suitable approach for determination of methoxetamine in large sets of tissue samples // Anal. Bioanal. Chem. – 2016. – V. 408. – Is. 4. – P. 1171–1181.
111. Li M., Wang H., Huan X., Cao N., Guan H., Zhang H., Cheng X., Wang C. Simultaneous LC-MS/MS bioanalysis of alkaloids, terpenoids, and flavonoids in rat plasma through salting-out-assisted liquid-liquid extraction after oral administration of extract from Tetradium ruticarpum and Glycyrrhiza uralensis: a sample preparation strategy to broaden analyte coverage of herbal medicines // Anal. Bioanal. Chem. – 2021. – V. 413. – Is. 23. – P. 5871–5884.
112. Ostermann A. I., Willenberg I., Schebb N. H. Comparison of sample preparation methods for the quantitative analysis of eicosanoids and other oxylipins in plasma by means of LC-MS/MS // Anal. Bioanal. Chem. – 2015. – V. 407. – P. 1403–1414.
113. Wu Y.-R., Liu H.-Y., Lin S.-L., Fuh M.-R. Quantification of 7-aminoflunitrazepam in human urine by polymeric monolith-based capillary liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry // Talanta. – 2018. – V. 176. – P. 293–298.

114. Prabu S. L., Suriyaprakash T. N. K. Extraction of Drug from the Biological Matrix: A Review // Applied Biological Engineering - Principles and Practice. – 2012.
115. Kole P. L., Venkatesh G., Kotecha J., Sheshala R. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods // Biomed. Chromatogr. – 2011. – V. 25. – Is. 1–2. – P. 199–217.
116. Moein M.M., El Beqqali A., Abdel-Rehim M. Bioanalytical method development and validation: Critical concepts and strategies // J. Chromatogr. B. – 2017. – V. 1043. – P. 3–11.
117. Rogeberg M., Malerod H., Roberg-Larsen H., Aass C., Wilson S. R. On-line solid phase extraction–liquid chromatography, with emphasis on modern bioanalysis and miniaturized systems // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2014. – V. 87. – P. 120–129.
118. Elaine A.A., Krisyanto S.I., Hasanah A.N. Dual-Functional Monomer MIPs and Their Comparison to Mono-Functional Monomer MIPs for SPE and as Sensors // Polymers. – 2022. – V. 14. – Is. 17. – P. 3498.
119. Solid Phase Extraction (SPE) - Cartridges, Well Plates, Sorbents [Электронный ресурс]. URL: https://www.agilent.com/en/product/sample-preparation/solid-phase-extraction-spe (дата обращения: 04.03.2024).
120. Three Kinds of SPE Cartridges [Электронный ресурс] // Hawach. 2019. URL: https://www.hawach.com/news/three-kinds-of-spe-cartridges.html (дата обращения: 04.03.2024).
121. Ramírez Fernández M. del M., Wille S. M. R., Samyn N., Wood M., López-Rivadulla M., De Boeck G. High-Throughput Analysis of Amphetamines in Blood and Urine with Online Solid-Phase Extraction-Liquid Chromatography—Tandem Mass Spectrometry // J. Anal. Toxicol. – 2009. – V. 33. – Is. 9. – P. 578–587.
122. CHRONECT is a versatile (U)HPLC system for fast and reliable performance [Электронный ресурс] // Spark Holland. URL: https://www.sparkholland.com/system/chronect-symbiosis/ (дата обращения: 01.08.2024).
123. Cui C., Chen R., Jiang J., Liu R., Wang W., Zhao Q., Hu P. Simultaneous determination of FLZ and its metabolite (M1) in human plasma and urine by UHPLC-MS/MS: Application to a pharmacokinetic study // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2019. – V. 164. – P. 32–40.
124. Zhang X., Iraneta P. C., Chambers E. E., Fountain K. J. Advantages of Ostro Pass-through Sample Preparation Versus Solid Supported Liquid Extraction (SSLE) // Waters Application note 720005199EN.

125. Zhang Z., Zhang Y., Yin J., Li Y. An integrated strategy for the rapid extraction and screening of phosphatidylcholines and lysophosphatidylcholines using semi-automatic solid phase extraction and data processing technology // J. Chromatogr. A. – 2016. – V. 1461. – P. 192–197.
126. De Baere S., Devreese M., Watteyn A., Wyns H., Plessers E., De Backer P., Croubels S. Development and validation of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the quantitative determination of gamithromycin in animal plasma, lung tissue and pulmonary epithelial lining fluid // J. Chromatogr. A. – 2015. – V. 1398. – P. 73–82.
127. Liu J., Jiang M., Li G., Xu L., Xie M. Miniaturized salting-out liquid–liquid extraction of sulfonamides from different matrices // Anal. Chim. Acta. – 2010. – V. 679. – Is. 1. – P. 74–80.
128. QuEChERS: онлайн-каталог. [Электронный ресурс]. URL: https://www.quechers.eu/ (accessed: 04.03.2024).
129. Derwand D., Rzeppa S., Voss S. C., Zschiesche A., Keiler A. M. QuEChERS as alternative extraction procedure in doping analyses // Drug Test. Anal. – 2024. – V. 16. – Is. 9. – P. 936–941.
130. Jin C., Wang T., Zhao T., Jiang W., Zhen X., Li H. Determination of nine cardiovascular drugs in human plasma by QuEChERS-UPLC-MS/MS // Heliyon. – 2023. – V. 9. – Is. 12. – P. e22543.
131. Wang T., Jin C., Jiang W., Zhao T., Xu Y., Li H. Determination of five mTOR inhibitors in human plasma for hepatocellular carcinoma treatment using QuEChERS-UHPLC-MS/MS // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2023. – V. 235. – P. 115652.
132. Usui K., Murata T., Fujita Y., Kamijo Y., Hanazawa T., Yoshizawa T., Funayama M. Direct detection of the psychoactive substance MT-45 in human tissue samples by probe electrospray ionization-tandem mass spectrometry // Drug Test. Anal. – 2018. – V. 10. – Is. 6. – P. 1033–1038.
133. Jiang W., Zhao T., Zhen X., Jin C., Li H., Ha J. Rapid Determination of 9 Tyrosine Kinase Inhibitors for the Treatment of Hepatocellular Carcinoma in Human Plasma by QuEChERS-UPLC-MS/MS // Front. Pharmacol. – 2022. – V. 13. – P. 920436.
134. Orfanidis A., Gika H., Theodoridis G., Mastrogianni O., Raikos N. Development of a UHPLC-MS/MS method for the determination of 84 pharmaceuticals and drugs of abuse in human liver // J. Chromatogr. B. – 2020. – V. 1151. – P. 122192.
135. Filippou O., Bitas D., Samanidou V. Green approaches in sample preparation of bioanalytical samples prior to chromatographic analysis // J. Chromatogr. B. – 2017. – V. 1043. – P. 44–62.
136. Kommalapati H.S., Pilli P., Samanthula G. Green Sample Preparation in Bioanalysis: Where Are We Now? // Bioanalysis. – 2023. – V. 15. – Is. 7. – P. 363–366.

137. Salve S., Bahiram Y., Jadhav A., Rathod R., Tekade R.K. Nanoplatform-Integrated Miniaturized Solid-Phase Extraction Techniques: A Critical Review // Crit. Rev. Anal. Chem. – 2023. – V. 53. – Is. 1. – P. 46–68.
138. Castillo-García M.L., Aguilar-Caballos M.P., Gómez-Hens A. Nanomaterials as tools in chromatographic methods // Trends Anal. Chem. – 2016. – V. 82. – P. 385–393.
139. Ghorbani M., Aghamohammadhassan M., Ghorbani H., Zabihi A. Trends in sorbent development for dispersive micro-solid phase extraction // Microchem. J. – 2020. – V. 158. – P. 105250.
140. Marć M., Wieczorek P.P. Chapter One - Introduction to MIP synthesis, characteristics and analytical application // Compr. Anal. Chem. – 2019. – V. 86. – P. 1–15.
141. Ahmadi M., Elmongy H., Madrakian T., Abdel-Rehim M. Nanomaterials as sorbents for sample preparation in bioanalysis: A review // Anal. Chim. Acta. – 2017. – V. 958. – P. 1–21.
142. Płotka-Wasylka J., Marć M., Szczepańska N., Namieśnik J. New Polymeric Materials for Solid Phase Extraction // Crit. Rev. Anal. Chem. – 2017. – V. 47. – Is. 5. – P. 373–383.
143. Liu Q., Shi J., Sun J., Wang T., Zeng L., Jiang G. Graphene and Graphene Oxide Sheets Supported on Silica as Versatile and High-Performance Adsorbents for Solid-Phase Extraction // Angew. Chem. Int. Ed. – 2011. – V. 50. – Is. 26. – P. 5913–5917.
144. Millington D. S., Norwood D. L., Kodo N., Roe C. R., Inouet F. Application of fast atom bombardment with tandem mass spectrometry and liquid chromatography/ mass spectrometry to the analysis of acylcarnitines in human urine, blood, and tissue // Anal. Biochem. – 1989. – V. 180. – Is. 2. – P. 331–339.
145. Jacques A. L. B., Santos M. K., Gorziza R. P., Limberger R. P. Dried matrix spots: an evolving trend in the toxicological field // Forensic Sci. Med. Pathol. – 2022. – V. 18. – Is. 1. – P. 86–102.
146. Chen J., Hsieh Y. Stabilizing Drug Molecules in Biological Samples // Ther. Drug Monit. – 2005. – V. 27. – Is. 5. – P. 617.
147. Wagner M., Tonoli D., Varesio E., Hopfgartner G. The use of mass spectrometry to analyze dried blood spots // Mass Spectrom. Rev. – 2016. – V. 35. – Is. 3. – P. 361–438.
148. Koster R. A., Alffenaar J.-W. C., Greijdanus B., Uges D. R. A. Fast LC-MS/MS analysis of tacrolimus, sirolimus, everolimus and cyclosporin A in dried blood spots and the influence of the hematocrit and immunosuppressant concentration on recovery // Talanta. – 2013. – V. 115. – P. 47–54.
149. Wilhelm A. J., den Burger J. C. G., Swart E. L. Therapeutic Drug Monitoring by Dried Blood Spot: Progress to Date and Future Directions // Clin. Pharmacokinet. – 2014. – V. 53. – P. 961–973.

150. Samsonova J. V., Saushkin N. Yu., Osipov A. P. Dried Blood Spots technology for veterinary applications and biological investigations: technical aspects, retrospective analysis, ongoing status and future perspectives // Vet. Res. Commun. – 2022. – V. 46. – Is. 3. – P. 655–698.
151. Kabir A., Furton K.G. Fabric phase sorptive extractors // Патент США № US9283544B2.
152. Locatelli M., Kabir A., Innosa D., Lopatriello T., Furton K. G. A fabric phase sorptive extraction-High performance liquid chromatography-Photo diode array detection method for the determination of twelve azole antimicrobial drug residues in human plasma and urine // J. Chromatogr. B. – 2017. – V. 1040. – P. 192–198.
153. Locatelli M., Tinari N., Grassadonia A., Tartaglia A., Macerola D., Piccolantonio S., Sperandio E., D'Ovidio C., Carradori S., Ulusoy H. I., Furton K. G., Kabir A. FPSE-HPLC-DAD method for the quantification of anticancer drugs in human whole blood, plasma, and urine // J. Chromatogr. B. – 2018. – V. 1095. – P. 204–213.
154. Samanidou V., Galanopoulos L.-D., Kabir A., Furton K. G. Fast extraction of amphenicols residues from raw milk using novel fabric phase sorptive extraction followed by high-performance liquid chromatography-diode array detection // Anal. Chim. Acta. – 2015. – V. 855. – P. 41–50.
155. Alampanos V., Samanidou V. An overview of sample preparation approaches prior to liquid chromatography methods for the determination of parabens in biological matrices // Microchem. J. – 2021. – V. 164. – P. 105995.
156. Goutelle S., Maurin M., Rougier F., Barbaut X., Bourguignon L., Ducher M., Maire P. The Hill equation: a review of its capabilities in pharmacological modelling // Fundam. Clin. Pharmacol. – 2008. – V. 22. – Is. 6. – P. 633–648.
157. Castellini M. A., Baskurt O., Castellini J. M., Meiselman H. J. Blood Rheology in Marine Mammals // Front. Physiol. Frontiers. – 2010. – V. 1.
158. Uchimura T., Kato M., Saito T., Kinoshita H. Prediction of human blood-to-plasma drug concentration ratio // Biopharm. Drug Dispos. – 2010. – V. 31. – Is. 5–6. – P. 286–297.
159. Fisar Z., Fuksová K., Sikora J., Kalisová L., Velenovská M., Novotná M. Distribution of antidepressants between plasma and red blood cells // Neuro Endocrinol. Lett. – 2006. – V. 27. – Is. 3. – P. 307–313.
160. Xu Y., Her C. Inhibition of Topoisomerase (DNA) I (TOP1): DNA Damage Repair and Anticancer Therapy // Biomolecules. – 2015. – V. 5. – Is. 3. – P. 1652–1670.

161. Geier F.M., Want E.J., Leroi A.M., Bundy J.G. Cross-Platform Comparison of *Caenorhabditis elegans* Tissue Extraction Strategies for Comprehensive Metabolome Coverage // Anal. Chem. – 2011. – V. 83. – Is. 10. – P. 3730–3736.
162. Jakutiene E., Grikiniene J., Vaitkevicius A., Tschaika M., Didziapetriene J., Stakisaitis D. Sodium valproate stimulates potassium and chloride urinary excretion in rats: gender differences // BMC Pharmacol. – 2007. – V. 7. – P. 9.
163. Liu Z., Martin J., Orme L., Seddon B., Desai J., Nicholls W., Thomson D., Porter D., McCowage G., Underhill C., Cranswick N., Michael M., Zacharin M., Herschtal A., Sivasuthan J., Thomas D. M. Gender differences in doxorubicin pharmacology for subjects with chemosensitive cancers of young adulthood // Cancer Chemother. Pharmacol. – 2018. – V. 82. – Is. 5. – P. 887–898.
164. Le J., Peng R., Yang S.-L., Chen J.-L., Cheng J.-R., Li Y., Wang S.-T. Quantification of immunosuppressants from one 3.2 mm dried blood spot by a novel cold-induced phase separation based LC-MS/MS method // Anal. Chim. Acta. – 2022. – V. 1210. – P. 339889.
165. Wang H., Yang T., Cheng X., Kwong S., Liu C., An R., Li G., Wang X., Wang C. Simultaneous determination of usnic, diffractaic, evernic and barbatic acids in rat plasma by ultra-high-performance liquid chromatography-quadrupole exactive Orbitrap mass spectrometry and its application to pharmacokinetic studies // Biomed. Chromatogr. – 2018. – V. 32. – Is. 3.
166. Chen J., Lu Q., Balthasar J.P. Mathematical modeling of topotecan pharmacokinetics and toxicodynamics in mice // J. Pharmacokinet. Pharmacodyn. – 2007. – V. 34. – Is. 6. – P. 829–847.
167. Boggs A.S.P., Schock T.B., Schwacke L.H., Galligan T.M., Morey J.S., McFee W.E., Kucklick J.R. Rapid and reliable steroid hormone profiling in Tursiops truncatus blubber using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) // Anal. Bioanal. Chem. – 2017. – V. 409. – Is. 21. – P. 5019–5029.
168. Zhang X., Wang S., Chen Y., Gu J., Wang M., Dai Y., Zhao K., Wang Y., Wurita A., Hasegawa K. Postmortem distribution of ropivacaine and its metabolite in human body fluids and solid tissues by GC–MS/MS using standard addition method //Forensic Toxicol. – 2024. – V. 43. – P. 163–171.
169. Люльман Х., Мор К., Хайн Л. Наглядная фармакология: Пер. с нем. – М.: Мир, 2008. – 383 с.: ил. – (Наглядная медицина).
170. Godfrey K.R., Arundel P.A., Dong Z., Bryant R. Modelling the Double Peak Phenomenon in pharmacokinetics // Comput. Methods Programs Biomed. – 2011. – V. 104. – Is. 2. – P. 62–69.

171. Kim M.S., Haney M.J., Zhao Y., Mahajan V., Deygen I., Klyachko N.L. et al. Development of Exosome-encapsulated Paclitaxel to Overcome MDR in Cancer cells // Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med. – 2016. – V. 12. – Is. 3. – P. 655–664.
172. Sokolova A.S., Yarovaya O.I., Shernyukov A.V., Gatilov Y.V., Razumova Y.V., Zarubaev V.V., Tretiak T.S., Pokrovsky A.G., Kiselev O.I., Salakhutdinov N.F. Discovery of a new class of antiviral compounds: Camphor imine derivatives // Eur. J. Med. Chem. – 2015. – V. 105. – P. 263–273.
173. Tazetdinova A. A., Luzina O. A., Polovinka M. P., Salakhutdinov N. F., Tolstikov G. A. Amino-derivatives of usninic acid // Chem. Nat. Compd. – 2009. – V. 45. – Is. 6. – P. 800–804.
174. Zhang Y., Huo M., Zhou J., Xie S. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel // Comput. Methods Programs Biomed. – 2010. – V. 99. – Is. 3. – P. 306–314.

Приложение 1. Исследование противоопухолевого эффекта OL9-116 в комбинации с топотеканом

Данные по исследованию противоопухолевого эффекта агента OL9-116 в сочетании с топотеканом были получены и предоставлены сотрудниками Лаборатории биоорганической химии ферментов ИХБФМ СО РАН Корниенко Т. Е., к.х.н. Захаренко А.Л. под руководством д.х.н., акад. РАН, проф. О.И. Лаврик.

В исследовании использовались самки мышей C57BL с массой тела ~19-21 г. Мыши содержались в пластиковых клетках с подстилкой из древесной стружки и имели свободный доступ к воде и пище. В качестве экспериментальных моделей опухолей использовали карциному легкого Льюиса (LLC). Трансплантируемая опухоль была получена из банка клеток Института цитологии и генетики (Новосибирск, Россия). Модель мыши LLC является наиболее распространенной моделью рака легкого; клетки LLC остаются туморигенными и способны метастазировать в легкое у мышей линии C57BL. Перед трансплантацией опухолевую ткань измельчали и ресуспендировали в 0,9% NaCl. LLC вводили в правое бедро мышей в количестве 800 000 клеток в 0,2 мл на мышь. Все эксперименты с мышами проводились в соответствии с протоколами, утвержденными Межинститутской комиссией по биоэтике Института цитологии и генетики СО РАН № 21.11 от 30 мая 2014 г., и директивой 2010/63/EU. Противоопухолевые и антиметастатические эффекты агента OL9-116, используемого в качестве монотерапии или в комбинации с топотеканом в модели LLC Животных разделили на 7 групп по 6-7 особей в каждой, лечение проводили один раз через 7 дней после пересадки опухоли. Лечение проводили однократно через 7 дней после трансплантации опухоли:

- Группа 1 – (intact control) - мышам этой группы инокулировали опухоль, вводили 0,2 мл физиологического раствора внутрибрюшинно;

- Группа 2 – (DMSO-Tween-80) мышам вводили однократно внутрижелудочно с помощью зонда 200 мкл раствора, содержащего физраствор, Tween-80 (10%) и DMSO (15%), растворитель для 7;

- Группа 3-(Трс)-мышам однократно внутрибрюшинно вводили 200 мкл водного раствора топотекана в разовой дозе 1 мг/кг;

- Группа 4- (Трс + OL9-116 5 mg/kg simultaneously) -мыши получали топотекан однократно, как описано для группы 3, и соединение OL9-116 в виде 200 мкл суспензии (Tween-80 (10%) и DMSO (15%) в физиологическом растворе) однократно внутрибрюшинно в дозе 5 мг/кг. Вещества вводились одновременно;

- Группа 5 – (Трс + OL9-116 150 mg/kg simultaneously) -мыши получали топотекан однократно, как описано для группы 3, и соединение OL9-116 в виде 200 мкл суспензии (Tween-80 (10%) и DMSO (15%) в физиологическом растворе) однократно внутрижелудочно в дозе 150 мг/кг. Вещества вводились одновременно;

- Группе 6 – (OL9-116 5 mg/kg + Трс after 2h) -мыши получали соединение OL9-116 в виде 200 мкл суспензии (Tween-80 (10%) и DMSO (15%) в физиологическом растворе) однократно внутрибрюшинно в дозе 5 мг/кг и спустя 2 часа топотекан, как описано для группы 3;

- Группа 7 – (OL9-116 150 mg/kg + Трс after 3h) -мыши получали соединение OL9-116 в виде 200 мкл суспензии (Tween-80 (10%) и DMSO (15%) в физиологическом растворе) однократно внутрижелудочно в дозе 150 мг/кг и спустя 3 часа топотекан, как описано для группы 3;

- Группа 8 – (OL9-116 5 мг/кг) -мышам вводили только соединение OL9-116, как описано для группы 4;

- Группа 9 – (OL9-116 150 мг/кг) -мышам вводили только соединение OL9-116, как описано для группы 5.

Вещества вводили в виде однократной инъекции в объеме 0,2 мл на 13-й день после пересадки опухоли. Противоопухолевый эффект оценивали Действие препаратов оценивали по размеру опухолевых узлов в течение эксперимента (измерения проводила на 7, 9, 12, 14, 16 день после трансплантации опухолевых клеток при помощи штангенциркуля), весу опухоли (на 18 день после эвтаназии животных), печени и селезёнки, в том числе подсчитали количество метастазов в лёгких всех животных. Метастазы подсчитывали после фиксации в 10% формалине под микроскопом МБИ-3 (ЛОМО, Санкт-Петербург, СССР) при трехкратном увеличении.

Приложение 2. Разрешение на проведение клинических испытаний

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

РАЗРЕШЕНИЕ № 160

на проведение клинических исследований

от 17 апреля 2020 г.

Настоящим разрешается проведение клинических исследований

Камфецин

(наименование лекарственного препарата)

Организация, осуществляющая организацию проведения клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения:

разработчик лекарственного препарата ООО «Липерон», Россия, уполномоченное лицо: ООО «ИФАР», Россия, 634021, г. Томск, ул. Елизаровых д. 79/4.

Лекарственная форма и дозировка лекарственного препарата для медицинского применения: **капсулы, 20 мг.**

Наименование протокола клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения: **№ KFC-2019-11 «Двойное, слепое, одноцентровое, сравнительное, плацебо-контролируемое, с эскалацией дозы, клиническое исследование по изучению безопасности, переносимости и фармакокинетики лекарственного препарата Камфецин, капсулы 20 мг (ООО «Липерон», Россия) для приема внутрь здоровыми добровольцами».**

Цель клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения: **изучение безопасности, переносимости и фармакокинетики лекарственного препарата Камфецин у здоровых добровольцев.**

Сроки проведения клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения: **с 01.06.2020 по 01.03.2021 г.**

Количество пациентов, принимающих участие в клиническом исследовании лекарственного препарата для медицинского применения: **30 человек (из них рандомизированных 25).**

Перечень медицинских организаций, в которых будет проводиться клиническое исследование лекарственного препарата для медицинского применения: **согласно приложению № 1 на 1 л.**

Данное разрешение действительно в течение всего срока проведения клинических исследований.

008580

Приложение № 1
к Разрешению на проведение
клинического исследования
№ 160 от **17.04.2020** г.

Перечень медицинских организаций, в которых будет проводиться клиническое исследование лекарственного препарата для медицинского применения:

1. **Федеральное государственное бюджетное учреждение «Сибирский федеральный научно-клинический центр Федерального медико-биологического агентства», 636035, Томская обл., г. Северск, ул. Мира, д. 4.**

Директор Департамента
государственного регулирования
обращения лекарственных средств Ф.А. Романов