

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК МЕТАБОЛИТОВ НОВЫХ ПСИХОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ С ПОМОЩЬЮ *IN VIVO* И *IN VITRO* МЕТОДОВ

Никитин Е.В., Григорьев А.М., Грибкова С.Е., Калашников В.А., Родин И.А.
 Институт криминалистики Центра специальной техники ФСБ России
 ГБУЗ Московской области «Бюро судебно-медицинской экспертизы»
 Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Ввиду многообразия синтетических наркотиков, постоянной модификации их структур и динамике выявления новых соединений в незаконном обороте наркотических средств (НС) и психотропных веществ (ПВ), особую актуальность приобретают обнаружение метаболитов новых психоактивных веществ (НПВ) и определение их хромато-масс-спектрометрических характеристик для создания методики химико-токсикологического анализа биожидкостей. Применение лабораторных крыс для решения данной задачи имеет ряд ограничений, связанных со значительными различиями метаболических профилей НС и ПВ у крыс и у людей. Поэтому актуальным является поиск и изучение альтернативных способов получения метаболитов НПВ для установления исходного токсиканта при отравлениях.

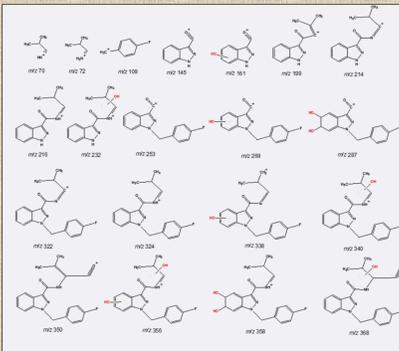
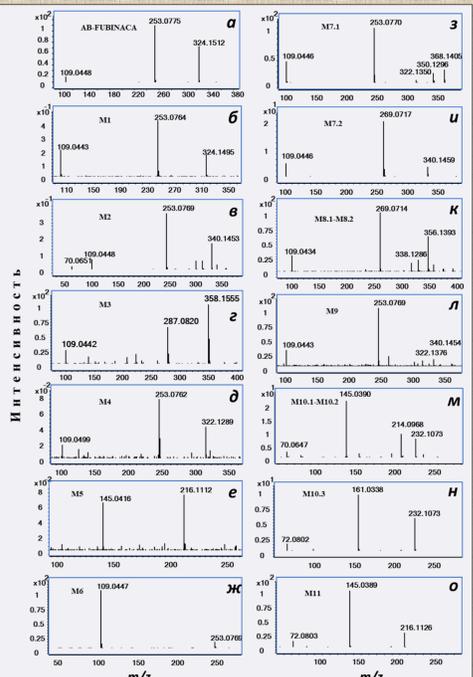
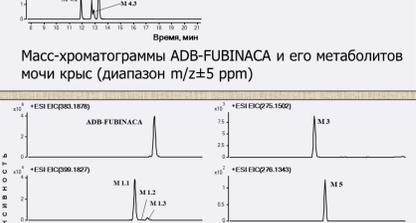
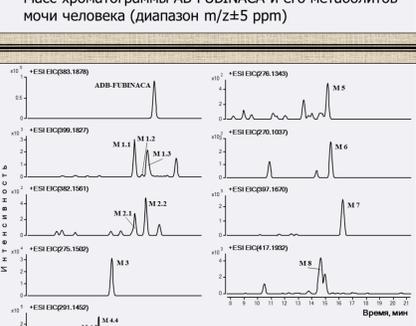
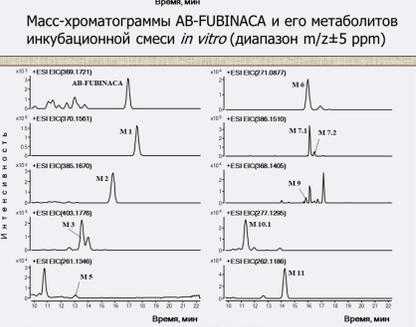
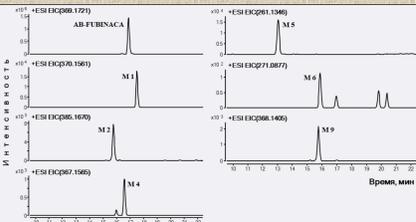
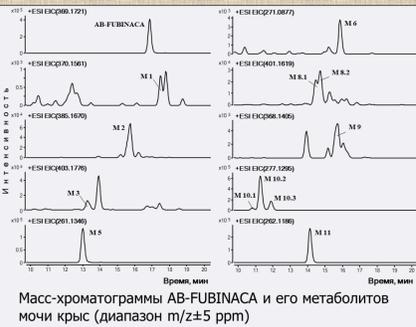
Оборудование и условия эксперимента
 Для поиска метаболитов и определение их структурных особенностей применяли ВЭЖХ-МС/МС BP 6540 QTOF фирмы Agilent Technologies. Разделение: колонка ZORBAX Eclipse Plus C18 (100×2.1 мм, 1.8 мкм); Источник ионизации: электрораспыление; Детектирование: Auto MS/MS и Target MS/MS масс-спектры регистрировали в диапазонах 100–1000 m/z (MC¹) и 50–1000 m/z (MC²) при CE 20 эВ.

Объекты анализа
 1. продукты ферментации исследуемых соединений с фракцией S9 человеческой печени;
 2. образцы сыворотки крови и мочи лабораторных животных, полученные в ходе соответствующих экспериментов;
 3. образцы биологических жидкостей установленных потребителей АВ-FUBINACA и АDB-FUBINACA, из экспертных исследований.

Прогнозирование и поиск метаболитов проводили с учетом известных метаболических преобразований подобных ксенобиотиков в организме и характерных ионов-продуктов, а также на основании масс-спектров, полученных в информационно-зависимом (Auto MS/MS) и целевом (Target MS/MS) режимах из рассчитанных точных масс ионов-предшественников для предполагаемых метаболитов.

Получение метаболитов методом *in vitro*
 Метаболиты АВ-FUBINACA и АDB-FUBINACA получали инкубацией в *in vitro* системе в течение 90 минут при температуре 37°C и постоянной встряхивании (400 об./мин). Состав 100мкл аликвоты *in vitro* системы: 26,7 мкМ исследуемого соединения; 200 мкг субклеточной фракции S9 печени человека; 5,72 мМ НАДФ*⁺; 32,8 мМ ДГФФ; 1,6 Ед/мл Г6ФДГ; 10,0 мМ хлорида магния в 100 мМ растворе фосфатного буфера (рН 7.4). В качестве отрицательного контроля использовали *in vitro* систему без субклеточной фракции S9 печени человека. Остановку *in vitro* системы проводили добавлением к реакционной смеси «ледяного» ацетонитрила.

Получение биологических жидкостей, содержащие метаболиты исследуемых НС и ПВ методом *in vivo* (на лабораторных крысах)
 В экспериментальном моделировании интоксикации лабораторных животных были использованы 2 группы белых беспородных крыс-самцов со средней массой тела 180–220 г. Животным 1-й группы (опытная группа) вводили исследуемые НС и ПВ, животным 2-й группы (контрольная группа) вводили только растворитель. После в/м введения растворов исследуемых веществ животных помещали в метаболические камеры при свободном доступе к воде. Мочу опытных групп животных отбирали через 3, 6 и 24 часа после введения раствора. На следующие сутки производили повторную интоксикацию при тех же условиях и через час животных забивали методом декапитации, отбирали кровь в биохимические пробирки с активатором свертывания для получения сыворотки крови.



Сводные данные по установленным метаболитам АВ-FUBINACA у крыс, людей и фракции печени S9 человека

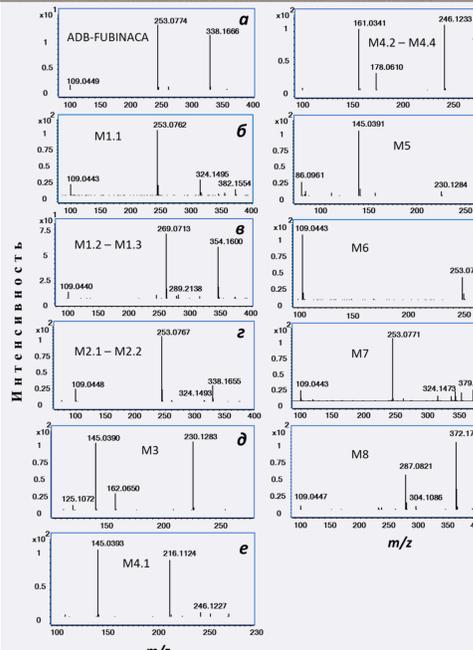
Название соединения	<i>in vivo</i> биожидкости лабораторных крыс	<i>in vitro</i> фракция печени S9 человека	<i>in vivo</i> биожидкости человека
АВ-FUBINACA	+	+	+
M1	+	+	+
M2	+	+	+
M3	+	н.о.	+
M4	н.о.	+	н.о.
M5	+	+	+
M6	+	+	+
M7.1	н.о.	н.о.	+
M7.2	н.о.	н.о.	н.о.
M8.1	+	н.о.	н.о.
M8.2	+	н.о.	н.о.
M9	+	+	н.о.
M10.1	+	н.о.	+
M10.2	+	н.о.	н.о.
M10.3	+	н.о.	н.о.
M11	+	н.о.	+

н.о. – соединение не обнаружено.
 * – выделены метаболиты, являющиеся основными для используемого способа их получения.



Сравнивая результаты исследования метаболизма, полученные с помощью методов *in vivo* и *in vitro* с референсными, полученными на реальной моче потребителя АВ-FUBINACA следует отметить, что:
 - два основных метаболита M1 (гидролизированный) и M2 (гидроксильный) были получены обоими методами в достаточном количестве для определения их ХМС характеристик и внесения в базу данных;
 - получить дигидродиол АВ-FUBINACA (M3), являющимся основным метаболитом у людей, и установить его ХМС характеристики с использованием метода *in vitro* не удалось; в моче лабораторных крыс он был обнаружен в качестве минорного метаболита;
 - с использованием лабораторных крыс был получен ряд дигидроксилированных метаболитов (M8.1 и M8.2) и дезалкилированных метаболитов, не характерных для человеческого организма;
 - получить гидролизированный метаболит АВ-FUBINACA с последующим гидроксилированием метилтанового фрагмента (M7.1), являющимся основным метаболитом у людей, ни одним из методов не удалось.

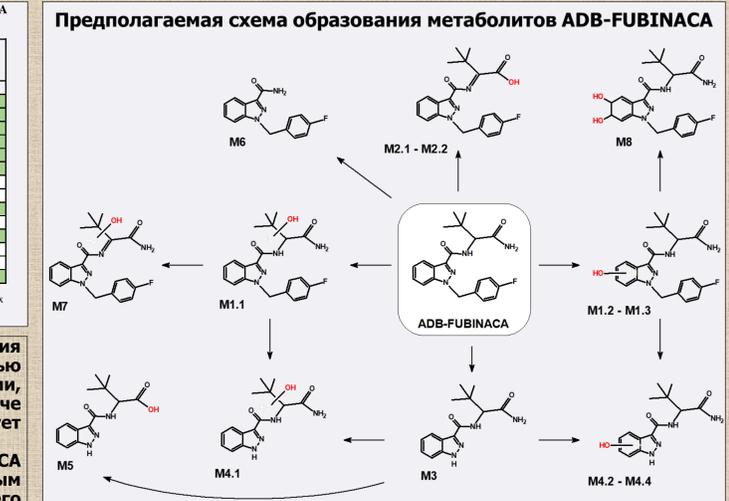
В случае АВ-FUBINACA применение обеих модельных систем как по-отдельности, так и в совокупности не позволило в полном объеме установить и охарактеризовать все 4 важных метаболита, выявленных в моче человека. Обе системы продемонстрировали схожую эффективность, применение лабораторных крыс позволило получить важный метаболит (M3), не полученный методом *in vitro*, однако в минорном количестве, что затрудняет работу по получению достоверных масс-спектров. С другой стороны, *in vivo* подход, в отличие от *in vitro*, дал ряд не информативных или не встречающихся у человека метаболитов, работа по определению которых не привела к практически важным результатам, что делает *in vivo* метод более трудоемким. Тем не менее, трех установленных *in vitro* метаболитов уже достаточно для подтверждения АВ-FUBINACA при химико-токсикологическом анализе мочи людей.



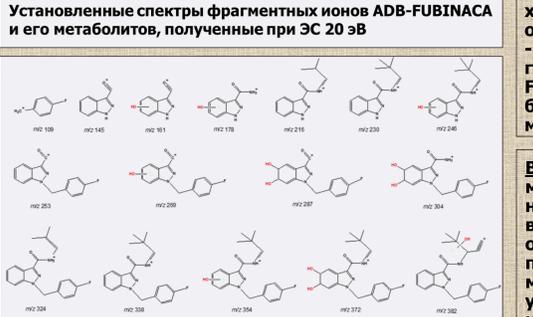
Сводные данные по установленным метаболитам АDB-FUBINACA у крыс, людей и фракции печени S9 человека

Название соединения	<i>in vivo</i> биожидкости лабораторных крыс	<i>in vitro</i> фракция печени S9 человека	<i>in vivo</i> биожидкости человека
АDB-FUBINACA	+	+	+
M1.1	+	+	+
M1.2	+	+	+
M1.3	+	+	+
M2.1	+	+	+
M2.2	+	+	+
M3	+	+	+
M4.1	+	н.о.	+
M4.2	+	н.о.	+
M4.3	+	н.о.	+
M4.4	+	н.о.	+
M5	+	+	+
M6	+	+	+
M7	+	н.о.	+
M8	+	н.о.	+

н.о. – соединение не обнаружено.
 * – выделены метаболиты, являющиеся основными для используемого способа их получения.



В целом оба метода показали сходную эффективность, однако *in vitro* система позволила получить важные метаболиты в большем количестве, что упростило работу по их определению. С другой стороны, *in vitro* система не позволила получить важный метаболит M8 (дигидродиол АDB-FUBINACA), выявленный в *in vivo* системе, пусть и в минорном количестве. Как и с описанным ранее веществом *in vivo* система (на лабораторных крысах) производит большее количество малоинформативных, в силу их значительной метаболической конверсии, а также не пригодных для химико-токсикологического анализа метаболитов, специфических только для крыс, что делает подход более трудоемким.



Выводы. В отличие от людей, метаболические профили лабораторных крыс характеризуется большей степенью модификации исходной структуры (полигидроксилирование и дезалкилирование). Это означает, что из большого набора метаболитов, найденных в биожидкостях крыс, лишь часть является пригодной для дальнейшего их выявления в биообъектах человека. Метаболиты, полученные методом *in vitro*, являются продуктами, в основном, одно- и двух-стадийных трансформаций исходных СК (моно- и дигидроксилирование, карбоксилирование), и их предполагаемые структуры в меньшей степени отличаются от структур исходных СК. При этом, набор данных метаболитов гораздо ближе к метаболическому профилю, наблюдаемому для людей. Однако, методом *in vitro* не удалось выявить ряд важных дигидродиольных метаболитов, характерных для людей. Таким образом, целесообразно совместное применение обоих методов получения метаболитов: *in vivo* (на лабораторных крысах) и *in vitro* (на субклеточных фракциях), что позволяет более полно исследовать метаболизм НПВ на экспериментальных моделях.