

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-340

**ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТАБОЛОМНОГО ОТВЕТА ПЕРСПЕКТИВНОГО
ПРОТИВОПАРКИНСОНИЧЕСКОГО АГЕНТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА СУХИХ ПЯТЕН
КРОВИ ДЛЯ *IN VIVO* ФАРМАКОМЕТАБОЛОМНОГО АНАЛИЗА**

**INVESTIGATION OF THE METABOLOMIC RESPONSE OF A PROSPECTIVE ANTIPARKINSONIAN
AGENT USING THE DRIED BLOOD SPOT METHOD FOR *IN VIVO* PHARMACOMETABOLOMIC ASSAY**

М. К. Лысенко^{1,2}, Н. В. Басов^{1,2}, Н. Ю. Саушкин³, Ж. В. Самсонова³,
Е. Г. Морозик⁴, С. В. Аньков², А. Ю. Филиппова², А. В. Подтуркина², А. В. Павлова²,
А. Д. Рогачев^{1,2}, А. Г. Покровский¹, О. В. Ардашов², К. П. Волчо², Н. Ф. Салахутдинов²

¹Новосибирский государственный университет

²Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН

³Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

⁴Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей, Москва

М. К. Lysenko^{1,2}, N. V. Basov^{1,2}, N. Yu. Saushkin³, J. V. Samsonova³,
E. G. Morozik⁴, S. V. Ankov², A. Yu. Filippova², A. V. Podturkina², A. V. Pavlova²,
A. D. Rogachev^{1,2}, A. G. Pokrovsky¹, O. V. Ardashov², K. P. Volcho², N. F. Salakhutdinov²

¹Novosibirsk State University

²N. N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS

³Lomonosov Moscow State University

⁴National Medical Research Center for Children's Health, Moscow

✉ m.lysenko2@ngsu.ru

Аннотация

Применение стекловолоконных материалов в методе сухих пятен крови обеспечивает наибольшее метаболомное покрытие по сравнению с целлюлозными. С их помощью возможна детекция ряда нуклеотидов, которые не выявляются при использовании целлюлозных карт. При использовании материала-лидера было проведено фармакометаболомное исследование противопаркинсонического агента и установлено его влияние на митохондриальные метаболические пути.

Abstract

Using glass fiber membrane materials in the dry blood spot method (DBS) provides the highest metabolomic coverage compared to cellulose. With their use it is possible to detect a number of nucleotides that are not detected with cellulose cards. Using the leader material, a pharmacometabolomic study of an antiparkinsonian agent was performed and its effect on mitochondrial metabolic pathways was determined.

Фармакометаболомика представляет собой перспективное направление в фармакологии, позволяющее изучать метаболические изменения в ответ на действие физиоактивных веществ. Этот подход открывает новые возможности для понимания механизмов действия лекарств, выявления биомаркеров эффективности терапии и прогнозирования ответа на лечение. В частности, фармакометаболомный скрининг может способствовать раскрытию патогенетических основ нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Паркинсона, которая в настоящее время является вторым по распространенности нейродегенеративным заболеванием, а число выявлений заболевания увеличивается.

Помимо аналитических методов, метаболомное покрытие в большой степени определяется методикой пробоподготовки образцов. При этом обеспечение высококачественной пробоподготовки, которая является важнейшим аспектом метаболомных исследований, во многом определяет достоверность и воспроизводимость получаемых данных. Одним из перспективных подходов к пробоподготовке цельной крови животных является метод сухих пятен крови (СПК). Выбор мембранного материала для получения СПК определяет спектр извлекаемых и детектируемых метаболитов.

Данное исследование ставит перед собой задачи определения мембранного материала «лидера» и использования его для обнаружения биомаркеров МФТП-индуцированного паркинсонизма и маркеров эффективности перспективного противопаркинсонического агента РА-96 [1].

Для выявления материала-лидера образцы цельной крови наносили на мембранные материалы различного состава (целлюлоза, стекловолокно) и высушивали. После экстракции образца сухой крови анализировали широкий спектр метаболитов при использовании разработанного ранее подхода [2]. Метаболомное покрытие оценивали с помощью непараметрического критерия Манна — Уитни, дополнительно строили диаграммы Венна для визуализации пересечений в метаболомных профилях и уникальных метаболитов. При использовании материала-лидера были собраны образцы крови у мышей следующих групп: 1) мыши с МФТП (20 мг/кг, четырехкратно, внутрибрюшинно), получавшие РА-96 (20 мг/кг, однократно, внутривенно) через 24 ч; 2) здоровые животные, получавшие РА-96 (20 мг/кг, однократно, внутривенно). Для исследовательского и классификационного анализа применяли метод главных компонент (PCA), частичный наименьших квадратов — дискриминантный анализ (PLS-DA) и его разреженную модификацию (sPLS-DA).

По итогу скрининга мембранных материалов стекловолоконные стрипы из материалов JY-BX109 и Millipore GFCP 203000 продемонстрировали наилучшие аналитические характеристики: они обеспечивали наибольшее число детектируемых метаболитов, а также отличались наибольшим количеством уникальных метаболитов, включая нуклеотиды и их производные, такие как АТФ, АДФ, АМФ, УДФ, УМФ, дГДФ, дАМФ и аденин. Применимость стекловолоконных материалов для метаболомного скрининга обусловлена гладкой и непористой поверхностью, препятствующей проникновению жидкости внутрь и, следовательно, упрощающей вымывание метаболитов из образца сухой крови. Пористая гидрофильная структура целлюлозы, напротив, затрудняет экстракцию, поскольку образец распределяется как между волокнами, так и внутри них. Фармакометаболомный анализ подтвердил литературные данные о влиянии нейротоксина МФТП на уменьшение содержания триметиламин-N-оксида и L-карнитина в крови животных [3–5]. В настоящем исследовании впервые охарактеризована их динамика под влиянием противопаркинсонического агента РА-96 и возвращении к нормальному содержанию после 48 ч. Исходя из полученных результатов мы предполагаем, что воздействие МФТП приводило к митохондриальной дисфункции: нарушалась работа цепи переноса электронов, снижалось содержание пуриновых нуклеотидов, повышалась концентрация длинноцепочечных ацилкарнитинов. Одновременно отмечалось резкое снижение уровня сфингомиелинов через 24 ч после введения МФТП, что отражает нарушение липидного обмена. Введение РА-96 восстанавливало содержание молекул, ответственных за энергетический обмен в пределах тех же 24 ч.

Таким образом, показано, что в модели МФТП-индуцированного паркинсонизма триметиламин-N-оксид и L-карнитин подтверждены как потенциальные маркеры патологического процесса, при этом впервые показано, что их уровни нормализуются под действием РА-96. Кроме того, выявлены нарушения энергетического и липидного метаболизма под действием МФТП (снижение содержания пуриновых нуклеотидов и сфингомиелинов, накопление длинноцепочечных ацилкарнитинов), нормализуемые РА-96 в течение 24 ч.

Литература

1. Gorina D. S., Lastovka A. V., Rogachev A. D. et al. Pharmacokinetics and dose proportionality study of a novel antiparkinsonian agent, a 1H-1,2,4-triazol-3-ylthio-conjugate of protremine // *Molecules*. 2024. Vol. 29. P. 44–98.
2. Basov N. V., Rogachev A. D., Aleshkova M. A. et al. Global LC-MS/MS targeted metabolomics using a combination of HIL-IC and RP LC separation modes on an organic monolithic column based on 1-vinyl-1,2,4-triazole // *Talanta*. 2024. Vol. 267. P. 125–168.
3. Chung S. J., Rim J. H., Ji D. et al. Gut microbiota-derived metabolite trimethylamine N-oxide as a biomarker in early Parkinson's disease // *Nutrition*. 2020. Vol. 83.
4. Chen S. J., Kuo C. H., Kuo H. C. et al. The gut metabolite trimethylamine N-oxide is associated with Parkinson's disease severity and progression // *Movement Disorders*. 2020. Vol. 35. P. 2115–2116.
5. Zhao H., Wang C., Zhao N. Potential biomarkers of Parkinson's disease revealed by plasma metabolic profiling // *Journal of Chromatography B*. 2018. Vol. 1081–1082. P. 101–108.