

**Горбунов Александр Юрьевич**

**МИКРОРЕАКТОРНОЕ УСТРОЙСТВО, ИНТЕГРИРУЮЩЕЕ ФОТОКАТАЛИ-  
ТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ БИОТРАНСФОРМАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ  
И ПРОБОПОДГОТОВКУ В ФОРМАТЕ  
«ЛАБОРАТОРИЯ НА МИШЕНИ»**

Специальность: 1.3.2. – приборы и методы экспериментальной физики  
1.4.2 – аналитическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата технических наук

**Работа выполнена** в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт аналитического приборостроения Российской академии наук и Федеральном государственном унитарном предприятии "Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека" Федерального медико-биологического агентства

Научные руководители:

**Подольская Екатерина Петровна** – кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник ИАП РАН;

**Бабаков Владимир Николаевич** – кандидат биологических наук, зав. лабораторией молекулярной токсикологии и экспериментальной терапии ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России.

**Официальные оппоненты:**

**Егоров Владимир Валерьевич**, доктор биологических наук, заведующий лабораторией биомедицинской и фармацевтической масс-спектрометрии Федерального государственного бюджетного научного учреждения Институт экспериментальной медицины

**Поволоцкий Алексей Валерьевич**, доктор физико-математических наук, доцент Института химии, кафедры лазерной химии и лазерного материаловедения Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе Российской академии наук.

Защита состоится «24» марта 2023 года в 11:00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.029.01 на базе Института аналитического приборостроения РАН (ИАП РАН) по адресу: 198095, Санкт-Петербург, улица Ивана Черных, д. 31-33, лит. А. С диссертацией можно ознакомиться в научно-технической библиотеке ИАП РАН по тому же адресу или на сайтах: [www.iairas.ru](http://www.iairas.ru) и [www.iai.rssi.ru](http://www.iai.rssi.ru). Отзывы на диссертацию и автореферат направлять по адресу: 190103, Санкт-Петербург, Институт аналитического приборостроения РАН, а/я 207.

Автореферат разослан « \_\_\_\_\_ » 2023 года.

Ученый секретарь диссертационного совета, доктор физико-математических наук



А.Л. Буляница

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы

Масс-спектрометрия (МС) в сочетании с матрично- и поверхностно-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ/ПАЛДИ) характеризуется высокой эффективностью ионизации и позволяет осуществлять высокопроизводительный анализ как низкомолекулярных аналитов, так и соединений пептидной природы. Однако, необходимость последовательного переноса образцов при многостадийной пробоподготовке приводит к значительной потере целевых соединений, может влиять на корректность полученных результатов, а также снижает производительность анализа. Решением этой проблемы может являться интегрирование последовательных этапов пробоподготовки непосредственно на МАЛДИ-мишени за счет функционализации поверхности МАЛДИ-мишени и/или путём использования дополнительных устройств, обратимо закрепляемых на ней. Для обозначения такого подхода был предложен термин "лаборатория на мишени" (lab-on-plate). "Лаборатория на мишени" позволяет осуществлять не только рутинные процедуры пробоподготовки, такие как очистка и концентрирование образцов, но и параллельно проводить различные химические реакции с последующим МС анализом полученных продуктов. Микрореакторные устройства на основе МАЛДИ-мишени особенно актуальны для приложений, требующих высокопроизводительного анализа продуктов химических взаимодействий, таких как скрининг кандидатных соединений на раннем этапе разработки лекарственных средств (ЛС).

Биологические свойства ЛС в значительной степени определяются их метаболическими превращениями в организме (биотрансформацией). Преобразование ЛС в химически реактивные метаболиты (биоактивация) рассматривается как основной механизм побочных токсических эффектов, таких как идиосинкратическая гепатотоксичность. Моделирование биотрансформации при разработке ЛС позволяет предсказать побочные токсические эффекты в ходе ранних доклинических исследований и исключить из дальнейшего рассмотрения кандидатные соединения с нежелательным метаболизмом.

Традиционные методы моделирования с использованием биологических систем (микросомы печени, гепатоциты, клеточные и органные модели печени, лабораторные животные) позволяют получить наиболее полную картину биотрансформации исследуемого ЛС, но при этом достаточно сложны и трудоёмки. Поскольку в значительном большинстве случаев биоактивация ЛС происходит за счёт окислительных реакций фазы I, таких как дегидрогенирование и гидроксילирование, были предложены несколько простых, быстрых и сравнительно недорогих методов неферментативного моделирования окислительной биотрансформации ЛС, которые являются чисто инструментальными и не требуют использования биоматериалов. Наибольшее распространение получили методы, основанные на электрохимическом окислении (ЭХО) и УФ-индуцированном фотокаталитическом окислении в присутствии наночастиц  $\text{TiO}_2$  (УФ/ $\text{TiO}_2$ -ФКО), которые представляются перспективными, так как позволяют достаточно полно имитировать окислительный метаболизм ЛС *in vivo*. Реакционная способность полученных продуктов окисления может быть оценена по образованию ковалентных аддуктов с модельными биомолекулами (например, конъюгатов с глутатионом или белками).

Совмещение простоты и эффективности фотокаталитического моделирования окислительной биотрансформации ЛС с высокой чувствительностью и скоростью ЛДИ-МС-анализа позволяет повысить производительность и снизить себестоимость предва-

рительного скрининга кандидатных ЛС на предмет образования реактивных метаболитов в ходе ранних доклинических исследований. Таким образом, разработка высокопроизводительной платформы на основе МАЛДИ-мишени, интегрирующей моделирование биотрансформации ЛС и дальнейшую пробоподготовку в формате «лаборатория на мишени», является актуальной задачей.

Соответственно, **цель работы** – разработка микрореакторного устройства, интегрирующего фотокаталитическое моделирование окислительной биотрансформации ксенобиотиков и последующую пробоподготовку в рамках одной высокопроизводительной платформы на основе МАЛДИ-мишени.

#### **Задачи исследования:**

1. Разработать прототип фотокаталитического микрореакторного устройства, позволяющего последовательно проводить моделирование метаболизма исследуемых соединений, образование аддуктов белков с продуктами окисления, ферментативный гидролиз модифицированных белков и концентрирование образцов непосредственно на МАЛДИ-мишени.

2. Разработать метод формирования гидрофобного фотокаталитического покрытия на основе  $TiO_2$  для использования в качестве эмиттера ионов при поверхностно-активированной лазерной десорбции/ионизации (ПАЛДИ) ксенобиотиков и продуктов их окисления.

3. Исследовать УФ/ $TiO_2$ -ФКО ряда модельных ЛС, сопоставить полученные продукты окисления с известными метаболитами.

4. Апробировать прототип устройства для моделирования окислительной биотрансформации ксенобиотиков и последующей пробоподготовки.

5. Разработать методики идентификации продуктов окисления ксенобиотиков и их аддуктов с белками на примере глобина человека методами ЛДИ-МС.

#### **Научная новизна**

Предложено научное обоснование нового технического решения, позволяющего проводить высокопроизводительное моделирование окислительной биотрансформации ксенобиотиков в формате «лаборатория на мишени». Разработана методика фотокаталитического окисления исследуемых соединений, образования их аддуктов с белком и последующей пробоподготовки в лунках-микрореакторах непосредственно на МАЛДИ мишени.

Установлено, что электрофоретическое осаждение наночастиц  $TiO_2$  позволяет получать высококачественное многофункциональное покрытие с воспроизводимыми характеристиками, которое может быть эффективно использовано как в качестве фотокатализатора при УФ/ $TiO_2$ -ФКО, так и в качестве эмиттера ионов при ПАЛДИ-МС анализе. Показано, что использование в качестве эмиттера ионов при ПАЛДИ гидрофобного композитного покрытия, полученного путём ЭФО  $TiO_2$  с последующей поверхностной модификацией полидиметилсилоксаном, обеспечивает формирование протонированных молекул аналита  $[M+H]^+$  при отсутствии катионированных аддуктов  $[M+Na]^+$  и  $[M+K]^+$ .

Разработана методика функционализации поверхности МАЛДИ-мишени металл-аффинным сорбентом на основе стеарата лантана (монослой Ленгмюра). Показано, что стадия металл-аффинной экстракции пептидных аддуктов с метаболитами хлорсодержащих ксенобиотиков может быть успешно включена в предложенную методику как дополнительный этап пробоподготовки.

Идентифицированы аддукты глобина человека с продуктами окисления амодиахина по остаткам  $\alpha$ Cys104,  $\beta$ Cys93 и  $\beta$ Cys112, которые могут использоваться как потенциальные биомаркеры интоксикации. На примере аддуктов глобина человека с продуктами окисления амодиахина показана возможность их селективной экстракции методом металл-аффинной хроматографии.

### **Практическая значимость**

Полученные результаты были внедрены и используются в лаборатории молекулярной токсикологии и экспериментальной терапии ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, а также в лабораториях химической и токсикологической диагностики и медицинских проблем химической безопасности ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России.

Разработанная экспериментальная установка может быть использована в фармацевтических компаниях и научно-исследовательских учреждениях для моделирования окислительной биотрансформации и доклинической оценки потенциальной токсичности препаратов-кандидатов, а также для разработки аналитических методик идентификации метаболитов и их аддуктов с долгоживущими белками при ретроспективной диагностике интоксикаций.

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

1. УФ/TiO<sub>2</sub>-ФКО позволяет моделировать окислительную биотрансформацию диклофенака (ДФ) и обеспечивает высокий выход двух основных метаболитов, образующихся *in vivo* - 5-ОН-ДФ и 4'-ОН-ДФ. По сравнению с электрохимическим окислением, УФ/TiO<sub>2</sub>-ФКО более полно воспроизводит окислительный метаболизм ДФ и характеризуется значительно большей степенью конверсии.

2. Электрофоретическое осаждение наночастиц TiO<sub>2</sub> приводит к формированию однородного и механически стабильного слоя наночастиц, прочно связанного с поверхностью подложки. Дополнительное силосилирование придаёт покрытию сверхгидрофобные свойства и значительно увеличивает эффективность ПАЛДИ-МС анализа низкомолекулярных соединений при сохранении фотокаталитических свойств.

3. Предложенный прототип 96-луночного фотокаталитического микрореакторного устройства позволяет последовательно осуществлять на МАЛДИ-мишени УФ/TiO<sub>2</sub>-ФКО ксенобиотиков, получение аддуктов белков с продуктами ФКО, ферментативный гидролиз модифицированных белков, концентрирование и сокристаллизацию пептидов с матрицей для последующей идентификации полученных продуктов путём ПАЛДИ/МАЛДИ-МС анализа.

4. Продукты окисления ДФ, полученные путём УФ/TiO<sub>2</sub>-ФКО непосредственно на МАЛДИ-мишени и полученные путём стандартного УФ/TiO<sub>2</sub>-ФКО в суспензии, хорошо согласуются между собой как по профилю, так и по относительному выходу. Глобин человека образует ковалентные аддукты с биологически значимыми реактивными продуктами окисления амодиахина, полученными путём УФ/TiO<sub>2</sub>-ФКО.

5. Металл-аффинный сорбент на основе образованных стеаратом лантана монослоев Ленгмюра (FLa) может быть получен непосредственно на МАЛДИ-мишени. Функционализация поверхности МАЛДИ-мишени FLa позволяет осуществлять селективную металл-аффинную экстракцию галогенсодержащих аддуктов как дополнительный этап пробоподготовки при использовании РСμR96, что обеспечивает значительное повышение чувствительности последующего МАЛДИ-МС анализа.

### **Апробация работы**

Результаты диссертационной работы докладывались и обсуждались на следующих международных и всероссийских конференциях: 43-м Конгрессе ФЕБС (FEBS) (Прага, Чехия, 2018); Всероссийской молодежной медицинской конференции «Алмазовские чтения» (Санкт-Петербург, 2018); Всероссийской научной конференции молодых ученых «Медико-биологические аспекты химической безопасности» (Санкт-Петербург, 2018); 7-й ежегодной конференции Analytix (Берлин, Германия, 2019); Республиканской конференции с международным участием «Физико-химическая биология как основа современной медицины» (Минск, Беларусь, 2020), Международной научно-практической конференции «Системы контроля окружающей среды» (Севастополь, 2021), десятом съезде ВМСО «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» IX всероссийская конференция с международным участием.

### **Публикации**

Основные результаты диссертационной работы изложены в 12 публикациях, из них 1 статья в научных журналах, рекомендованных ВАК, 5 статей в изданиях, индексируемых базами цитирования SCOPUS и Web of Science, 6 тезисов докладов научно-практических конференций.

### **Личный вклад автора**

Настоящая диссертация обобщает результаты научной деятельности автора в лаборатории молекулярной токсикологии и экспериментальной терапии ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России и лаборатории биомедицинской масс-спектрометрии ИАП РАН. Все эксперименты, разработка методов и прототипов с последующим изготовлением проводились лично автором диссертации. Автор диссертации принимал непосредственное участие в постановке задач и обсуждении новых научных данных, а также в подготовке публикаций по результатам диссертационного исследования. Обработка экспериментальных результатов осуществлялась лично автором.

### **Структура диссертации**

Диссертация состоит из введения, трех разделов, заключения, списка литературы и приложения. Она изложена на 143 страницах и включает 65 рисунков, 9 таблиц, 211 наименований списка литературы.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Во введении** обоснованы актуальность темы диссертационной работы, выбор направлений исследований, сформулирована цель работы и решаемые задачи для её реализации. Во введении также определена научная новизна и практическая значимость полученных результатов, изложены защищаемые положения.

**Первый раздел** представляет собой обзор литературы, посвященный биотрансформации ксенобиотиков, моделированию биотрансформации ксенобиотиков и методам идентификации продуктов биотрансформации на основе масс-спектрометрии. Описаны различные методы моделирования биотрансформации ксенобиотиков, отмечены преимущества ферментативных инструментальных методов. Отдельно рассмотрено моделирование окислительной биотрансформации путём ЭХО и УФ/TiO<sub>2</sub>-ФКО. Отмечена перспективность УФ/TiO<sub>2</sub>-ФКО как метода моделирования окислительной биотрансформации ЛС для быстрого предварительного скрининга кандидатных ЛС в ходе ранних доклинических исследований. Описаны полупроводниковые свойства TiO<sub>2</sub>, обеспечивающие эффективность наноструктурированного покрытия TiO<sub>2</sub> в качестве фотоката-

лизатора при УФ/ $\text{TiO}_2$ -ФКО и в качестве эмиттера ионов при ПАЛДИ. Подробно рассмотрено ЭФО наночастиц как простой и технологически гибкий метод получения фотокаталитических покрытий  $\text{TiO}_2$ . Описаны методы ионизации МАЛДИ и ПАЛДИ, отдельно обсуждается проблема ЛДИ-МС анализа низкомолекулярных аналитов. Обосновывается актуальность создания системы формата "лаборатория на мишени", обеспечивающей инструментальное сопряжение фотокаталитического моделирования биотрансформации с последующим масс-спектрометрическим анализом полученных продуктов.

Во **втором разделе** описаны условия проведенных экспериментов и способам обработки полученных данных. Представлены: а) методика проведения электрохимического окисления диклофенака; б) методика проведение УФ/ $\text{TiO}_2$ -ФКО диклофенака в суспензии; в) методика ВЭЖХ/МС/МС анализа продуктов окисления диклофенака; г) методика ИЦР ПФ анализа продуктов окисления диклофенака в режиме прямого ввода; д) методика проведения УФ/ $\text{TiO}_2$ -ФКО на модифицированной  $\text{TiO}_2$  МАЛДИ-мишени; е) методика получение покрытия  $\text{TiO}_2$  с использованием метода «сухих капель»; ж) методика получения покрытия  $\text{TiO}_2$  с использованием метода электрофоретического осаждения; з) методики характеристики полученных покрытий; и) методика УФ/ $\text{TiO}_2$ -ФКО на МАЛДИ-мишени, модифицированной  $\text{TiO}_2$ ; к) методики проведения ПАЛДИ/МАЛДИ-МС анализа; л) приведено описание прототипа многоручного фотокаталитического микрореакторного устройства; м) методика моделирования светового потока; н) методики УФ/ $\text{TiO}_2$ -ФКО ЛС; о) методики получения аддуктов глобина человека с продуктами окисления ЛС; п) методика ферментативного гидролиза в присутствии трипсина.

В **третьем разделе** представлены и обсуждены результаты работы.

### **Выбор метода моделирования окислительной биотрансформации**

На первом этапе исследования нами был выполнен сравнительный анализ эффективности ЭХО и УФ/ $\text{TiO}_2$ -ФКО для моделирования окислительной биотрансформации ксенобиотиков. Установлено, что УФ/ $\text{TiO}_2$ -ФКО более полно моделирует окислительный метаболизм ДФ, по сравнению с ЭХО, и приводит к образованию двух основных биологически значимых метаболитов ОН-ДФ. Кроме того, УФ/ $\text{TiO}_2$ -ФКО обеспечивает значительно более высокий выход продуктов окисления. В связи с этим, для дальнейших экспериментов по моделированию окислительной биотрансформации использовали УФ/ $\text{TiO}_2$ -ФКО.

### **Проведение УФ/ $\text{TiO}_2$ -ФКО на МАЛДИ-мишени**

Общепринятый способ проведения УФ/ $\text{TiO}_2$ -ФКО (в перемешиваемой суспензии) предполагает удаление наночастиц  $\text{TiO}_2$  перед анализом продуктов окисления, что увеличивает время пробоподготовки и может приводить к потере целевых соединений за счёт адсорбции на твёрдой фазе. Нами было сделано предположение, что УФ/ $\text{TiO}_2$ -ФКО возможно проводить непосредственно на МАЛДИ-мишени, модифицированной  $\text{TiO}_2$ . Исходя из этого, мы предложили технологическую схему, при которой УФ/ $\text{TiO}_2$ -ФКО проводится непосредственно на МАЛДИ-мишени с последующим ПАЛДИ-МС анализом. В этом случае нанопорошок  $\text{TiO}_2$  последовательно выполняет функции фотокатализатора при ФКО и поверхности-эмиттера ионов при ПАЛДИ-МС анализе, что исключает необходимость использования МАЛДИ-матрицы.

## Применение электрофоретически модифицированной $\text{TiO}_2$ МАЛДИ-мишени для ПАЛДИ-МС

Модификацию МАЛДИ-мишени  $\text{TiO}_2$ -покрытием осуществляли путём электрофоретического осаждения (ЭФО) наночастиц Aeroxide P25. С целью оптимизации условий ЭФО, в серии предварительных экспериментов с использованием модельных стальных пластин варьировали напряжение (15-60 В) и длительность осаждения (30-180 с). Проведение ЭФО в течение 90 с при 30 В обеспечивало формирование наиболее однородных  $\text{TiO}_2$ -покрытий с оптимальной механической стабильностью. Однако, гидрофильность  $\text{TiO}_2$ , дополнительно усиленная шероховатостью покрытия, приводит к значительному растеканию образца по поверхности  $\text{TiO}_2$ -модифицированной МАЛДИ-мишени. Также наблюдается снижение эффективности УФ/ $\text{TiO}_2$ -ФКО и/или выхода продуктов окисления при повторном использовании покрытия, что связано, по-видимому, с адсорбцией аналитов и блокированием каталитических центров на поверхности  $\text{TiO}_2$ -покрытия. В связи с этим  $\text{TiO}_2$ -покрытие было дополнительно модифицировано гидрофобным слоем полидиметилсилоксана (ПДМС).

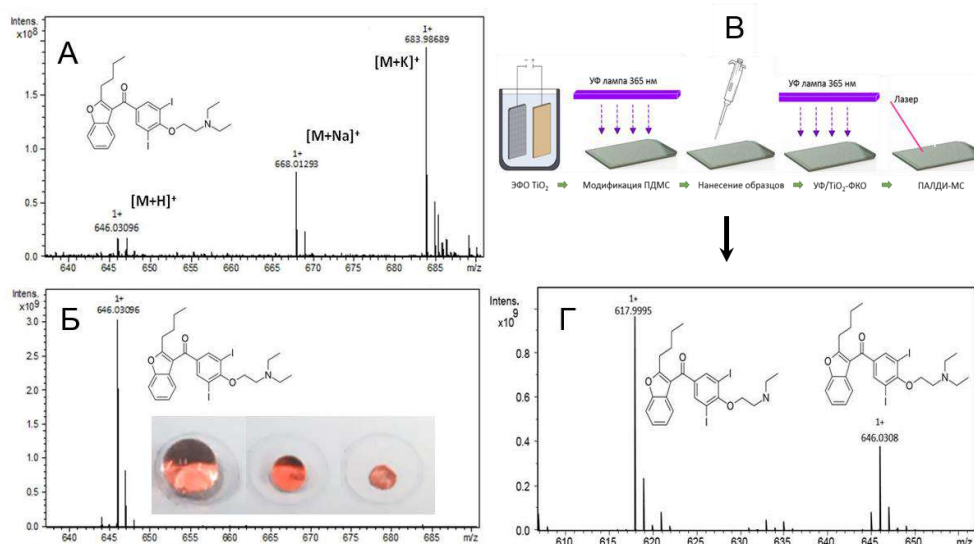


Рисунок 1 – ПАЛДИ-масс-спектр амиодарона (10 нг/мл). А –  $\text{TiO}_2$  нанесен методом «сухих капель»; Б – ЭФО покрытие  $\text{TiO}_2$  модифицированное ПДМС; В – схема проведения УФ/ $\text{TiO}_2$ -ФКО амиодарона; Г - УФ/ $\text{TiO}_2$ -ФКО амиодарона на МАЛДИ-мишени

Полученное ПДМС-модифицированное  $\text{TiO}_2$ -покрытие демонстрировало высокую гидрофобность при сохранении фотокаталитических свойств и ЛДИ-активирующей способности. ПДМС-модификация существенно повышала выход продуктов УФ/ $\text{TiO}_2$ -ФКО и функциональную долговечность фотокаталитического  $\text{TiO}_2$ -покрытия при его повторном использовании.  $\text{TiO}_2$ /ПДМС-модификация МАЛДИ-мишени обеспечивала формирование очень компактных пятен образцов (менее 1 мм в диаметре), что существенно повышало чувствительность ПАЛДИ-МС анализа низкомолекулярных аналитов, таких как ЛС и их метаболиты. При этом  $\text{TiO}_2$ /ПДМС-покрытие обеспечивало практически исключительное образование ионов  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , тем самым устраняя интерферирующий эффект аналитически избыточных аддуктов  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  и  $[\text{M}+\text{K}]^+$  (рисунок 1А, Б).

Для оценки чувствительности анализа на полученное ПАЛДИ-покрытие наносили по 1 мкл растворов амиодарона ( $m/z$  646,0309) в диапазоне концентраций 1 – 100 фг/мкл. При минимальном количестве амиодарона (1 фг на ячейку) был зарегистрирован сигнал с соотношением сигнал/шум более 10:1, что свидетельствует о высокой эффек-



тивности полученного ПАЛДИ-покрытия. Для сравнения, предел детектирования амиодарона при проведении десорбции/ионизации на коммерчески доступных чипах с кремниевыми наностолбиками составляет 1 пг на ячейку.

При исследовании возможности применения ПДМС-модифицированного  $\text{TiO}_2$ -покрытия для проведения УФ/ $\text{TiO}_2$ -ФКО на МАЛДИ-мишени было выявлено, что в результате ФКО амиодарона происходит образование моно-N-дезэтиламиодарона  $m/z$  617,9992 (рисунок 1В, Г), который является основным метаболитом, идентифицированным в плазме крови человека. При этом степень конверсии амиодарона составила более 50%.

### **96-луночное УФ/ $\text{TiO}_2$ -фотокаталитическое микрореакторное устройство (РС $\mu$ R96)**

Разработанный и изготовленный прототип устройства РС $\mu$ R96 позволяет объединить моделирование биотрансформации ЛС и последующую пробоподготовку непосредственно на МАЛДИ-мишени. РС $\mu$ R96 (рисунок 2) состоит из МАЛДИ-мишени (1), перфорированной эластомерной прокладки (2), микрореакторной насадки с 96 коническими отверстиями ( $\mu$ RD) (3) и охлаждаемого УФ-светодиодного модуля (4). Конические отверстия  $\mu$ RD и МАЛДИ-мишень функционализированы гидрофобным фотокаталитическим композитным  $\text{TiO}_2$ /ПДМС-покрытием, что позволяет проводить УФ/ $\text{TiO}_2$ -ФКО и  $\text{TiO}_2$ -ПАЛДИ-МС, соответственно. Перфорированная прокладка и  $\mu$ RD соответствуют стандартной МАЛДИ-мишени микропланшетного формата (МТР) от Bruker Daltonics по размеру и по положению 96 ячеек из 384.  $\mu$ RD обратимо закрепляется на МАЛДИ-мишени с помощью перфорированной прокладки, которая обеспечивает герметичную фиксацию благодаря своим эластомерным свойствам. Таким образом, формируется 96-луночный планшет с МАЛДИ-мишенью в качестве основания –  $\mu$ РС96 (5). Благодаря микропланшетному формату,  $\mu$ РС96 совместим со стандартными термошейкерами для микропланшетов, центрифужными концентраторами и роботизированными системами дозирования жидкостей. Для проведения УФ/ $\text{TiO}_2$ -ФКО поверх  $\mu$ РС96 устанавливается УФ-светодиодный модуль (4). Компоненты 1-4 в сборе образуют фотокаталитическое микрореакторное устройство РС $\mu$ R96 (6).

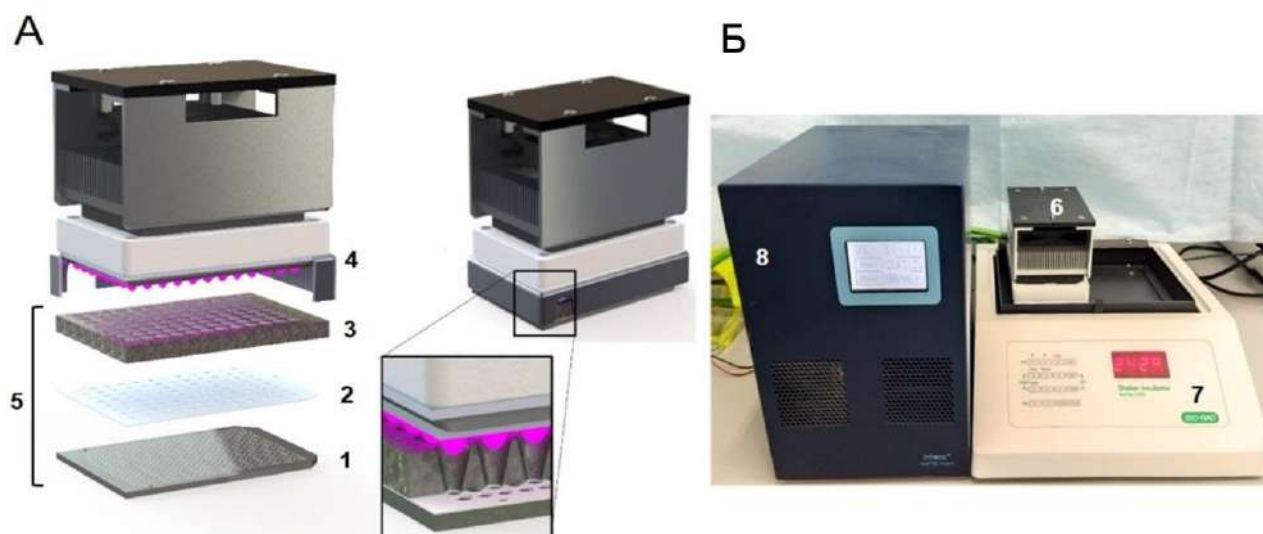


Рисунок 2 – 96-луночный УФ/ $\text{TiO}_2$ -ФКО микрореактор (PC $\mu$ R96). (А) 3D-модель PC $\mu$ R96 (слева) и собранная установка (справа). В разрезе показано положение УФ-светодиодов относительно лунок  $\mu$ RC96. (Б) Собранная установка PC $\mu$ R96 (6) на шейкере-инкубаторе (7). Охлаждение модуля УФ-светодиодов управляется блоком управления ТЕС (8)

Модификацию лунок  $\mu$ RC96 и МАЛДИ-мишени  $\text{TiO}_2$ -покрытием осуществляли путём ЭФО наночастиц Aeroxide P25. Стоит отметить, что в различных лунках  $\mu$ RD могут быть получены различные фотокаталитические покрытия для их последующей сравнительной оценки, причём светодиодный модуль может быть оснащён светодиодами с разной длиной волны без изменения конструктивной схемы установки.

Предлагаемое устройство позволяет последовательно проводить на МАЛДИ-мишени УФ/ $\text{TiO}_2$ -ФКО ксенобиотиков, инкубацию продуктов ФКО с биомолекулами (например, с глутатионом или белками), ферментативный гидролиз белковых аддуктов и концентрирование образцов. Кроме того, в случае необходимости в лунках микрореактора также может осуществляться сокристаллизация белков и пептидов с разбавленными органическими матрицами. Концентрирование образцов на всех этапах пробоподготовки достигается испарением растворителя из лунок путём инкубации на термошейкере или центрифугирования в вакуумном концентраторе. После окончания всех этапов пробоподготовки и демонтажа  $\mu$ RC96 в ячейках МАЛДИ-мишени остаются пятна образцов, готовые для дальнейшего ЛДИ-МС анализа.

#### *Оптимизация геометрии лунок микрореактора*

В устройстве PC $\mu$ R96 используются УФ-светодиоды, поскольку они обеспечивают направленный поток света и достаточно компактны, чтобы помещаться в лунки микрореакторной насадки. Для достижения высокого выхода продуктов УФ/ $\text{TiO}_2$ -ФКО необходимо оптимизировать геометрию лунок микрореактора таким образом, чтобы обеспечить максимальное поглощение УФ-излучения фотокаталитическим покрытием. Оптимизацию осуществляли путём моделирования распределения светового потока в лунках различной геометрии с помощью Zemax OpticStudio. Для УФ-светодиода NCSU276A с углом распределения  $50^\circ$ , расположенного на расстоянии 6 мм от дна лунки, оптимальными оказались угол раствора конуса  $15^\circ$  при глубине лунки 10 мм (рисунок 3).

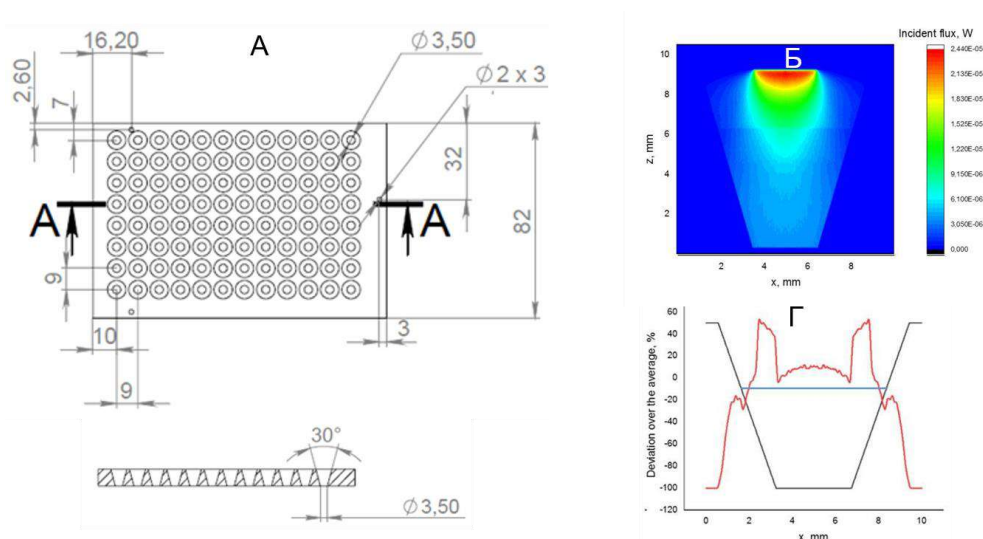


Рисунок 3 – Распределение света в лунке РС $\mu$ R96 с оптимизированной геометрией. А – чертеж микрореакторной насадки с 96 коническими отверстиями; Б – распределение падающего потока для продольного сечения лунки микрореактора; Г – отклонение от среднего значения для света, поглощенного поверхностью лунки микрореактора. Показаны геометрия лунки (серая линия) и уровень воды (синяя линия). Максимальный поглощенный поток соответствует фотокаталитической поверхности ниже уровня воды

#### *Последовательные этапы пробоподготовки*

Процесс моделирования и анализа биотрансформации с использованием РС $\mu$ R96 включает симуляцию окислительного метаболизма ЛС, получение ковалентных аддуктов продуктов окисления с глутатионом или белками и последующий ЛДИ-МС анализ. Последовательные этапы пробоподготовки показаны на рисунке 4. Водный раствор ксенобиотика (например, кандидатного ЛС) наносится в лунку микрореактора  $\mu$ РС96, на микрореактор устанавливается охлаждаемый УФ-светодиодный модуль и собранное фотокаталитическое устройство помещается на микропланшетный шейкер-инкубатор для проведения УФ/TiO<sub>2</sub>-ФКО при постоянном перемешивании. По окончании ФКО, УФ-светодиодный модуль снимается. Для проведения ПАЛДИ-МС анализа раствор, содержащий продукты окисления, может быть сконцентрирован путём упаривания (а). Для оценки реакционной способности продуктов окисления к раствору аналита глутатион или модельный белок. Модифицированный белок либо концентрируют и сокристаллизуют с матрицей для анализа методом МАЛДИ-МС (б), либо проводят ферментативный гидролиз в той же лунке. Триптические пептиды концентрируют совместно с матрицей и анализируют методом МАЛДИ-МС/МС для идентификации модифицированных аминокислотных остатков (в).

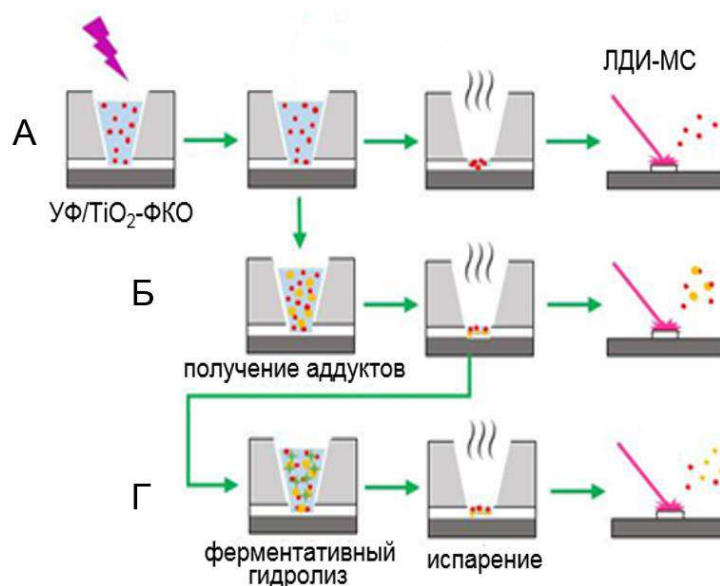


Рисунок 4 – Аналитический процесс с использованием РСμR96: А – УФ/TiO<sub>2</sub>-ФКО с последующим ПАЛДИ-МС анализом (красными точками показаны ЛС и продукты окисления); Б – образование аддуктов продуктами окисления ЛС с модельным белком с последующим МАЛДИ-МС анализом полноразмерных белков (оранжевыми точками показаны белковые аддукты); Г – ферментативный гидролиз белковых аддуктов с последующим МАЛДИ-МС анализом триптических пептидов (зелеными звездочками показан трипсин, оранжевыми - триптические пептиды)

#### *Моделирование окислительного метаболизма амодиахина*

Для имитации окислительного метаболизма при УФ/TiO<sub>2</sub>-ФКО с использованием устройства РСμR96 в качестве модельного ЛС был выбран амодиахин (AQ) – противомалярийное лекарственное средство. Известно, что окислительная биотрансформация AQ приводит к образованию реактивных метаболитов, что считается причиной нежелательных побочных эффектов AQ - идиосинкратической гепатотоксичности и агранулоцитоза. Брутто-формулы продуктов окисления AQ (*m/z* 356,1524) были определены путём точного измерения масс, на основании данных ПАЛДИ-МС/МС анализа. Было идентифицировано 6 продуктов окисления (табл.1), которые соответствуют описанным в литературе продуктам окислительной биотрансформации AQ.

Таблица 1 – Продукты окисления амодиахина

Обозначение	Брутто формула [M+H] <sup>+</sup>	<i>m/z</i> теоретический	Наблюдаемый <i>m/z</i>	Ошибка, ppm
AQ	C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>3</sub> O	356,15241	356,15242	0,02
M1	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> ClN <sub>3</sub> O	354,13676	354,13678	0,05
M2	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>3</sub> O	326,10546	326,10551	0,15
M3	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> ClN <sub>3</sub> O	328,12111	328,12119	0,24
M4	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	299,05818	299,05832	0,46
M5	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	315,05309	315,05310	0,3
M6	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	370,13168	370,13169	0,02

### Получение аддуктов с глобином

Ковалентная модификация белков играет важную роль в фармакологической активности широкого спектра ЛС. Так, установлено, что образование аддуктов белков с реакционноспособными метаболитами может служить причиной иммунотоксичности лекарственного средства за счет индукции нежелательного иммунного ответа и реакций гиперчувствительности. В качестве модельного белка был выбран глобин человека, который обладает несколькими нуклеофильными центрами, способными связывать алкилирующие агенты. Глобин инкубировали с продуктами ФКО АQ и анализировали методом МАЛДИ-МС в линейном режиме детектирования. В полученном масс-спектре были детектированы сигналы как соответствующие интактным  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицам глобина, так и смещенные в область больших масс, что свидетельствовало об образовании ковалентных аддуктов (рисунок 5).

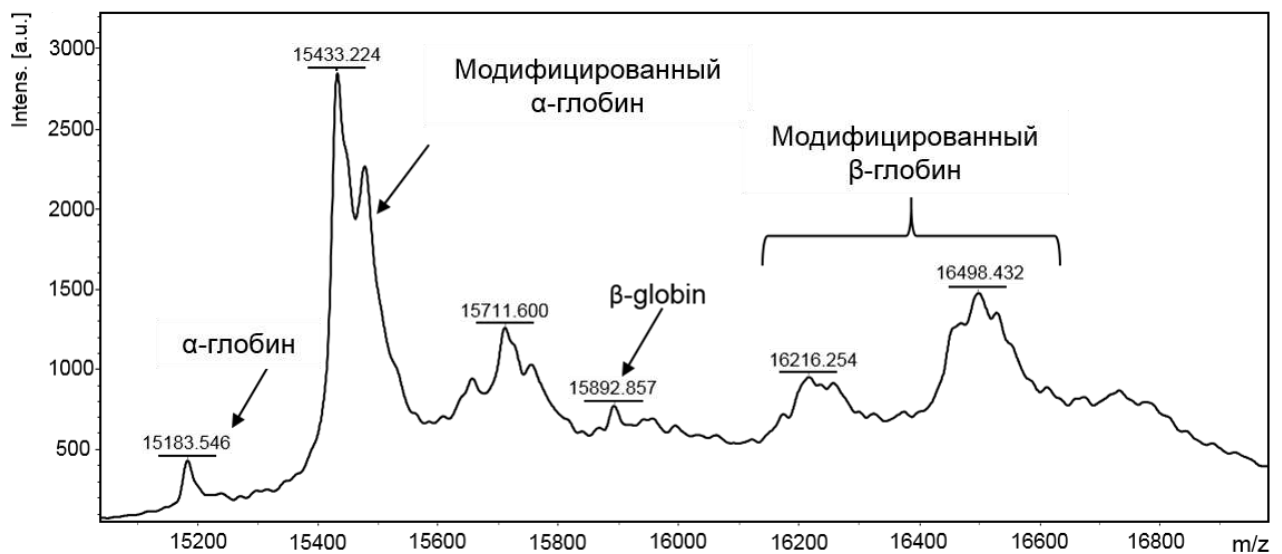


Рисунок 5 – Масс-спектр глобина после инкубации с продуктами окисления АQ

Для идентификации аминокислотных остатков, модифицированных продуктами окисления АQ, был проведён МАЛДИ-МС анализ триптического гидролизата. Нами был обнаружен ряд сигналов с  $m/z$  1701,5; 1718,4; 1999,9; 2016,1 предположительно принадлежащих модифицированным пептидам GTFATLSELHCDK ( $m/z$  1421,3) и LLGNVLVCVLANNFGK ( $m/z$  1719,6), входящим в состав  $\beta$ -субъединицы глобина и содержащим остатки цистеина в положениях 93 и 112 ( $\beta$ Cys93 и  $\beta$ Cys112), соответственно (рисунок 7). Увеличение значений  $m/z$  на 280 и 296 соответствует присоединению хинонимина М1 с учётом нейтральной потери диэтиламина (73 Да), и альдегидного продукта М4, соответственно.

Для каждого идентифицированного аддукта был проведен МАЛДИ-МС/МС анализ и на основе масс-спектров фрагментных ионов были восстановлены аминокислотные последовательности модифицированных пептидов и определены сайты модификации. Полученные результаты свидетельствуют об образовании остатками  $\beta$ Cys93 и  $\beta$ Cys112 ковалентных аддуктов с продуктами окисления амодиахина.

Следует отметить, что триптический гидролизат модельного белка, ковалентно модифицированного реактивными метаболитами, представляет собой достаточно сложную многокомпонентную смесь, причём содержание целевых пептидных аддуктов может быть достаточно низким. Даже в случае практически полной модификации  $\beta$ -субъединицы глобина метаболитами амодиахина в масс-спектре гидролизата сигналы

целевых аддуктов обладают низкой интенсивностью. Соответственно, возникла необходимость введения в методику дополнительной стадии пробоподготовки, позволяющей повысить чувствительность анализа хлорсодержащих аддуктов.

### **Металл-аффинная экстракция галогенсодержащих аддуктов глобина человека в формате «лаборатория на мишени»**

Метод металл-аффинной хроматографии хорошо зарекомендовал себя как способ селективной экстракции хлорсодержащих соединений из водных образцов. Обогащение образца модифицированными пептидами повышает чувствительность масс-спектрометрического анализа и облегчает интерпретацию полученных масс-спектров. Недавно было предложено использовать в качестве металл-аффинных сорбентов монослои Ленгмюра, формирующиеся на границе раздела фаз при нанесении раствора стеариновой кислоты (HSt) в н-гексане на водную субфазу, содержащую ионы металла. В результате реакции образуется мономолекулярная пленка толщиной в одну молекулу HSt, одна из поверхностей которой состоит из атомов металла. Нашей задачей было функционализировать поверхность МАЛДИ мишени структурами на основе монослоев стеарата лантана.

*Формирование металл-аффинных сорбентов на МАЛДИ-мишени с использованием технологии Ленгмюра*

Функционализация МАЛДИ мишени самособирающимися монослоями стеарата лантана (FLa) позволяет придать ее поверхности новые уникальные свойства, способствующие значительному повышению эффективности масс-спектрометрического анализа. Нами было показано, что нанесение раствора HSt в н-гексане на каплю водной субфазы, содержащей ионы лантана, приводит к образованию коллапсированного монослоя FLa. Полученная структура характеризуется развитой поверхностью, сформированной из четко выраженных агрегатов стеарата металла со средним диаметром 300 – 400 нм, высоким уровнем адгезии к поверхности полированной МАЛДИ мишени и функциональностью металл-аффинного сорбента. Следует отметить, что такая функционализация поверхности предназначена для проведения металл-аффинной хроматографии непосредственно в пределах ячейки мишени в формате «лаборатория на мишени», что позволяет не только многократно снизить расход реактивов и ускорить пробоподготовку, но и значительно повысить выход ионов целевых соединений и, как следствие, чувствительность анализа. Эффективность сорбента в значительной степени зависит от поверхности, доступной для взаимодействия с аналитом. Было показано, что оптимальным является формирование 6 коллапсированных монослоев FLa, так как полученная структура остается в пределах ячейки и не разрушается при обработке водой. При нанесении большего количества слоев нарушаются взаимодействия между слоями, и часть сформированного материала перестает удерживаться на подложке.

Сорбент, полученный непосредственно на МАЛДИ мишени, обладает характерной структурой. Многократное наслаивание слоя на слой порождает специфичную объемную структуру с надломами поверхности. При стекании с капли у краев ячейки н-гексан быстро испаряется, что приводит к многократному наплзанию новых частей слоя на предыдущие, их деформации и разрушению. В результате на мишени образуется структура с периодическими утолщениями и взломами (рис. 6а). Результаты, полученные с помощью сканирующей электронной микроскопии, свидетельствуют о формировании на мишени материала с достаточно развитой поверхностью (рис. 6б). Методом EDX-спектроскопии было доказано содержание La в составе сформированной структу-

ры (рис. 6в), а методом МАЛДИ-МС определено структурное звено сорбента ((C<sub>17</sub>H<sub>35</sub>COO)<sub>2</sub>La<sup>+</sup>, m/z 705,439) (рис. 6г).

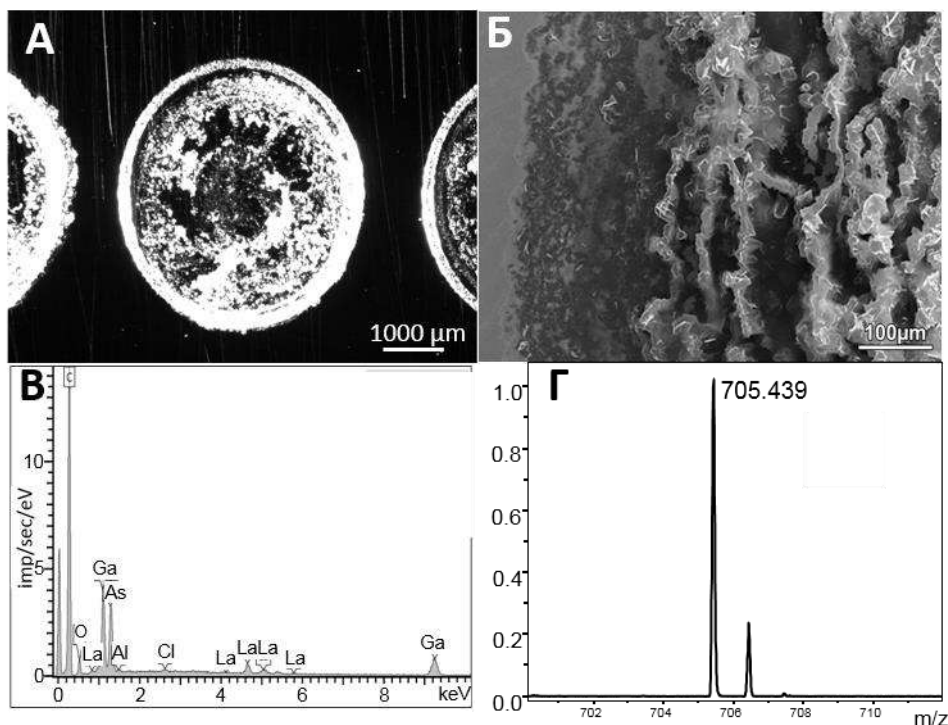


Рисунок 6 – А – изображение 6 слоев FLa, сформированных на мишени МАЛДИ при увеличении в 10 раз, Б – изображение 6 слоев FLa, сформированных на мишени МАЛДИ при увеличении в 100 раз, В – EDX-спектр подложки с 6 сформированными FLa, Г – фрагмент МАЛДИ масс-спектра FLa

#### *Металл-аффинная экстракция на FLa в формате «лаборатория на мишени»*

Нами была проведена функционализация поверхности МАЛДИ-мишени мультимолекулярными структурами FLa для проведения процедуры металл-аффинной хроматографии в формате «лаборатория на мишени». Исследование сорбционных свойств сформированных структур оценивали с использованием глобина человека, модифицированного модельными ксенобиотиками N1-(4-хлорфенил)-2-хлорацетамидом (Cl-1) и N1-(2,4-дихлорфенил)-2-хлорацетамидом (Cl-2) из группы хлорацетамидов, которые являются типичными алкилирующими агентами. МАЛДИ-МС анализ полноразмерных модифицированных белков (инкубировали при соотношении 10 мкг алкилирующего агента на 1 мг белка) показал, что в обоих случаях модификация прошла по одному сайту в  $\alpha$ -субъединице и двум в  $\beta$ -субъединице. МАЛДИ-МС анализ триптических гидролизатов выявил, что  $\alpha$ Cys104,  $\beta$ Cys93 и  $\beta$ Cys112 модифицированы как Cl-1 так и Cl-2, что было подтверждено МС анализом фрагментных ионов. Для оценки чувствительности подхода в формате «лаборатория на мишени» были приготовлены растворы глобина с различным соотношением ксенобиотик (Cl-1, Cl-2)/белок (от 10 мкг/1 мг до 1 нг/1 мг в 1 мл образца), получены триптические гидролизаты и проведена металл-аффинная экстракция на функционализированной FLa поверхности мишени с последующим МАЛДИ-МС анализом. В процессе исследования было установлено, что сигналы, соответствующие аддукту пептида LLGNVLC112VLANHFGK бета-субъединицы, детектируются при концентрации алкилирующего агента 1 нг/мл (соотношение ксенобиотик/белок ~

1/12000) и 10 нг/мл (соотношение ксенобиотик/белок  $\sim 1/1500$ ) для C1-1 и C1-2, соответственно. На основании этого был сделан вывод, что металл-аффинная экстракция на FLа в формате «лаборатория на мишени» позволяет значительно повысить эффективность и чувствительность МАЛДИ-МС анализа, причём триптический пептид бета-субъединицы глобина LLGNVLVC112VLANHFGK является оптимальным модельным объектом при исследовании реакционной способности хлорсодержащих алкилирующих агентов.

#### *Интеграция стадии металл-аффинной экстракции с устройством РСμR96*

На завершающем этапе исследования стадия металл-аффинной экстракции была введена в процедуру пробоподготовки в формате «лаборатории на мишени» при использовании устройства РСμR96. Перед установкой микрореакторной насадки поверхность МАЛДИ-мишени была функционализирована 3 коллапсированными монослоями FLа. С использованием РСμR96 были последовательно проведены все стадии моделирования окислительной биотрансформации и пробоподготовка, включая металл-аффинную экстракцию, на примере амодиахина и глобина человека. Результаты МАЛДИ-МС анализа продемонстрированы на рисунке 7. Как показано на рисунке 7, в диапазоне  $m/z$ , соответствующему пептиду LLGNVLVC112VLANHFGK ( $m/z$  1719,634), модифицированному продуктами окисления AQ, присутствует ряд интенсивных сигналов с  $m/z$  1999,971; 2015,943; 2037,977, два из которых по результатам фрагментного анализа были идентифицированы, как аддукты LLGNVLVC112VLANHFGK с M1 и M4. Сигнал с  $m/z$  2037,977 по виду изотопного распределения нами также был определен, как аддукт, но разницу масс  $\Delta 318$  Да мы не смогли отнести ни к одному из ранее описанных продуктов окисления AQ (M7). Тем не менее, это соединение было идентифицировано программой Mascot с достаточным уровнем достоверности, как пептид LLGNVLVCVLANHFGK, содержащий модификацию по  $\beta$ Cys112.  $\Delta 318$  Да может соответствовать структуре с предположительной брутто формулой  $C_{16}H_{15}ClN_2O_3$ . Исчезновение (или значительное снижение интенсивности) сигналов нецелевых пептидов в полученном масс-спектре свидетельствует о высокой селективности сформированного на МАЛДИ мишени сорбента на основе FLа в отношении хлорсодержащих аддуктов при проведении металл-аффинной экстракции в формате «лаборатория на мишени».

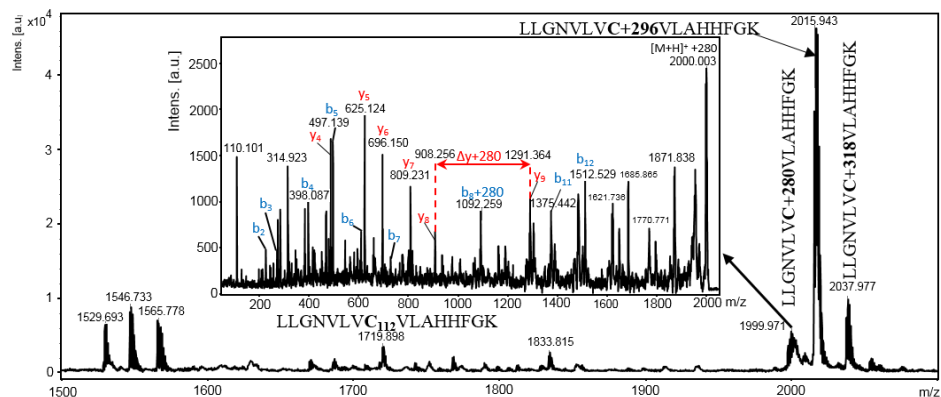


Рисунок 7 – МАЛДИ-МС спектр триптического гидролизата глобина человека, модифицированного продуктами окисления амодиахина (показан пептид  $\beta$ -субъединицы глобина LLGNVLVCVLANHFGK, модифицированный продуктами окисления AQ M1, M4 и M7). Во врезке – фрагментный масс-спектр пептида LLGNVLVCVLANHFGK, модифицированного M1 по  $\beta$ Cys112 ( $m/z$  1999,971)



Таким образом, показано, что введение стадии металл-аффинной хроматографии как дополнительного этапа пробоподготовки при использовании РСμR96 позволяет значительно расширить функциональные возможности предложенного подхода.

**В ЗАКЛЮЧЕНИИ** обобщены основные результаты:

1. Разработано и изготовлено микрореакторное устройство, интегрирующее фотокаталитическое моделирование окислительной биотрансформации ксенобиотиков и последующую пробоподготовку в рамках одной высокопроизводительной платформы на основе МАЛДИ-мишени в формате «лаборатория на мишени». С использованием разработанного устройства были получены и идентифицированы продукты окисления амоди-ахина и их аддукты с глобином человека (по остаткам αCys104, βCys93 и βCys112), которые могут использоваться как потенциальные биомаркеры интоксикации.

2. Разработан простой, быстрый и высокопроизводительный подход для моделирования окислительного метаболизма, основанный на проведении УФ/TiO<sub>2</sub>-ФКО непосредственно на МАЛДИ-мишени с последующим масс-спектрометрическим анализом. Установлено, что УФ/TiO<sub>2</sub>-ФКО является более предпочтительным методом моделирования окислительного метаболизма диклофенака, чем ЭХО.

3. Выявлено, что ЭФО наночастиц TiO<sub>2</sub> на подложку из нержавеющей стали с последующей модификацией осажденного слоя ПДМС позволяет получать высококачественное композитное покрытие с двойственной функциональностью, которое может быть использовано в качестве фотокатализатора при УФ/TiO<sub>2</sub>-ФКО и в качестве эмиттера ионов при ПАЛДИ-МС.

4. Разработаны способ получения мультимолекулярных структур на основе коллапсированных монослоев стеарата лантана (FLa), обладающих свойствами металл-аффинных сорбентов, и процедура для специфичной экстракции хлорсодержащих аддуктов из многокомпонентных образцов непосредственно на МАЛДИ-мишени. Продемонстрировано, что сорбент на основе FLa обладает развитой поверхностью и механической стабильностью. Селективное обогащение образцов целевыми хлорсодержащими анализитами значительно повышает чувствительность МС анализа. Металл-аффинная экстракция хлорсодержащих аддуктов может быть успешно введена в качестве дополнительного этапа пробоподготовки при использовании разработанного РСμR96.

5. Ключевыми преимуществами предложенного подхода являются значительное увеличение производительности анализа, возможность параллельного моделирования биотрансформации множества различных ксенобиотиков, а также возможность синтеза стандартных образцов метаболитов ЛС при минимальных расходах реагентов.

**Основные публикации по теме диссертации:**

**Статьи в журналах из перечня ВАК РФ:**

1. **Горбунов А.Ю.** Применение электрофоретически модифицированной TiO<sub>2</sub> МАЛДИ мишени для масс-спектрометрии с поверхностно-активированной лазерной десорбцией-ионизацией / Горбунов А.Ю., Зорин И.М., Ильющенок С.К., Бардин А.А., Кельдиева О.А., Краснов Н.В., Бабаков В.Н., Подольская Е.П. // Научное приборостроение. – 2021. – Т. 31. – №. 1. – С. 44 – 58.

**Статьи в иностранных журналах, включенных в базу цитирования SCOPUS и Web of Science:**

1. **Gorbunov A.Yu.** TiO<sub>2</sub>-modified MALDI target for in vitro modeling of the oxidative biotransformation of diclofenac / Gorbunov A.Yu., Krasnov K.A., Bardin A.A., Keltsieva O.A., Babakov V.N., Podolskaya E.P. // Mendeleev Commun. – 2020. – V.30. – P. 220-221.

2. **Gorbunov A.Y.** Identification of covalent adducts of hemoglobin with diclofenac metabolites / Gorbunov A.Y., Dubrovskii Y.A., Keltsieva O.A., Babakov V.N., Podolskaya E.P. // FEBS Open Bio. – 2018. – V.8 (Suppl. S1). – P. 348.

3. **Gorbunov A.** Multiwell photocatalytic microreactor device integrating drug biotransformation modeling and sample preparation on a MALDI target / Gorbunov A., Bardin A., Il'yushonok S., Kovach J., Petrenko A., Sukhodolov N., Krasnov K., Krasnov N., Zorin I., Obornev A., Babakov V., Radilov A., Podolskaya E. // Microchemical Journal. – 2022. – V.178. – P. 107362.

4. Gladchuk A.S. Self-organization of stearic acid salts on the hemispherical surface of the aqueous subphase allows functionalization of matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry target plates for on-plate immobilized metal affinity chromatography enrichment / Gladchuk A.S., Silyavka E.S., Shilovskikh V.V., Bocharov V.N., Zorin I.M., Tomilin N.V., Stepashkin N.A., Alexandrova M.L., Krasnov N.V., **Gorbunov A.Yu.**, Babakov V.N., Sukhodolov N.G., Selyutin A.A., Podolskaya E.P. // Thin Solid Films. – 2022. – V.756. – 139374.

5. **Горбунов А.Ю.** Формирование наноразмерных мультимолекулярных структур стеарата лантана с использованием монослоев Ленгмюра для масс-спектрометрии с лазерной десорбцией/ионизацией / Горбунов А.Ю., Подольская Е.П. // Письма в ЖТФ. – 2022. – Т. 48. – № 21. – С. 35 – 39.