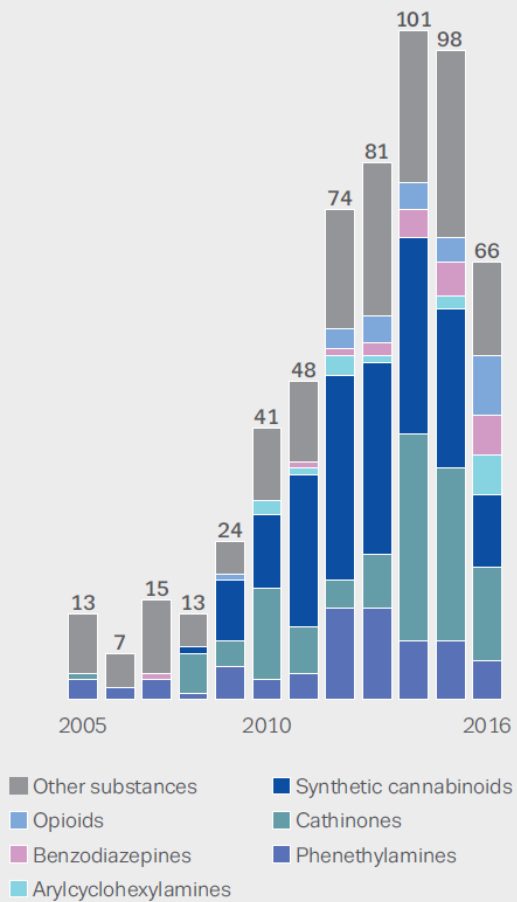


***в пробирке* биотрансформации новых ПСИХОАКТИВНЫХ веществ**

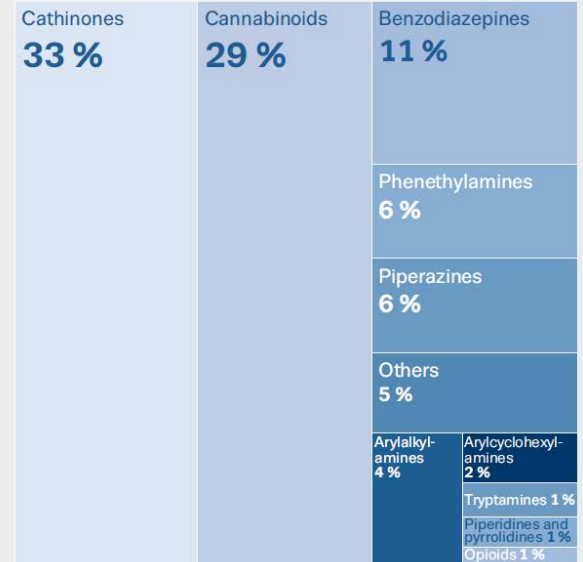
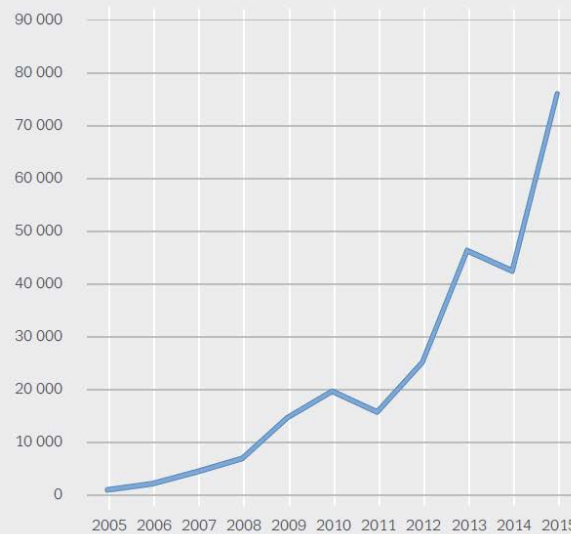
ALN VAN NUIJS , O. MORTELE, П. VERVLIET, C. GYS, M. DEGREEF, M. CUYKX, K.
MAUDENS, FY LAI, A. Covaci.

NPS в Европе ...

Number and categories of new psychoactive substances notified to the EU Early Warning System for the first time, 2005–16

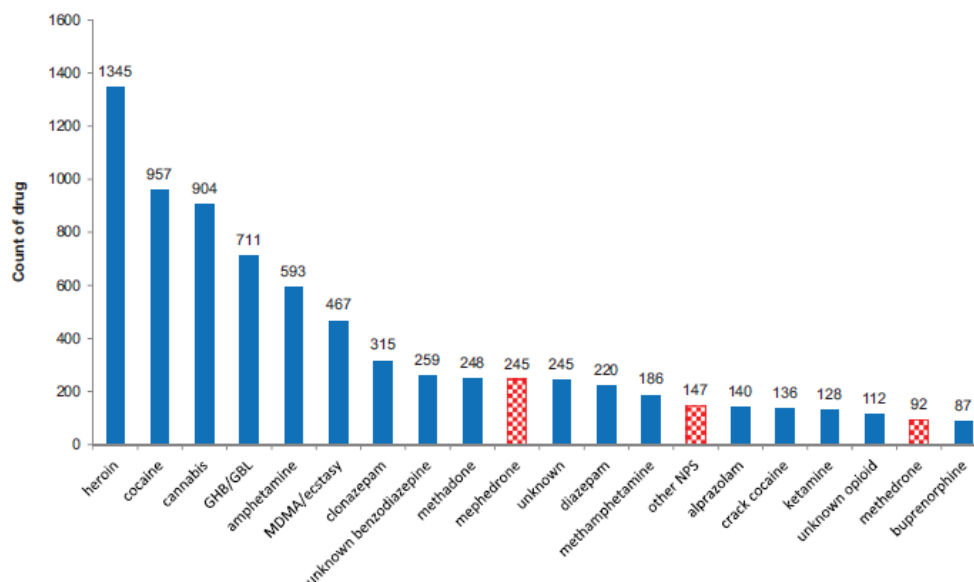


Number of seizure cases



Acute recreational drug and new psychoactive substance toxicity in Europe: 12 months data collection from the European Drug Emergencies Network (Euro-DEN)

ALISON M DINES,¹ DAVID M WOOD,^{1,2} CHRISTOPHER YATES,³ FRIDTJOF HEYERDAHL,⁴ KNUT ERIK HOVDA,⁴ ISABELLE GIRAUDON,⁵ ROUMEN SEDEFOV,⁵ and PAUL I DARGAN^{1,2}; EURO-DEN RESEARCH GROUP*

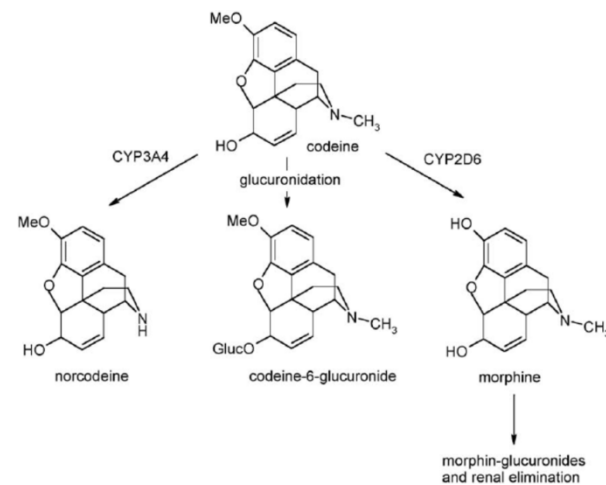
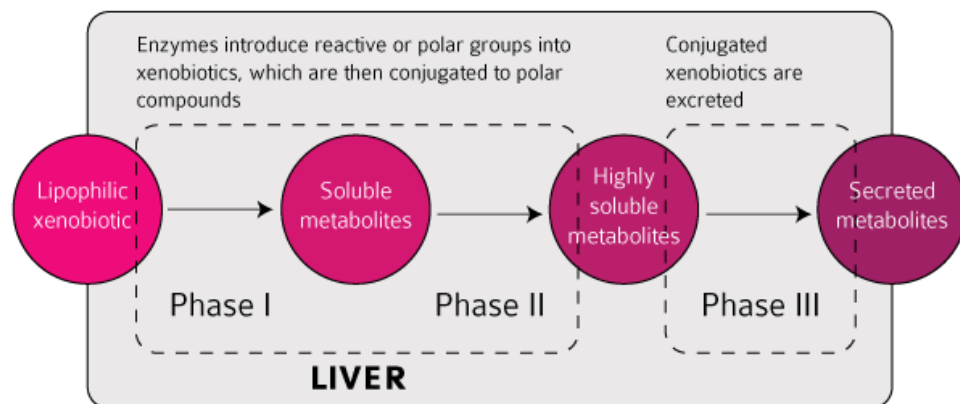


- Отчеты о серьезной агитации, психоз, кома
- Авторы сообщают ограничения: что пропустил?

NPS является реальной проблемой для судебной токсикологии:

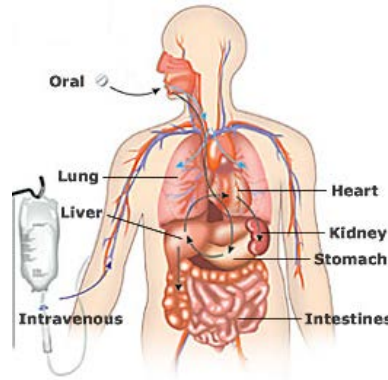
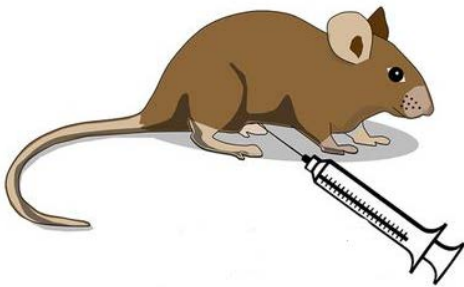
1) Количество соединений (> 620 контролируется в ЕС и до сих пор подсчета)

2) Неизвестный метаболитическая судьба этих соединений (Фаза-I и Фаза-II), который биомаркеров целевой (исходное соединение или метаболитов)?



Изучение метаболизма судьба весьма актуальна для выявления целевых биомаркеров. Существует несколько стратегий возможных:

1) *в естественных условиях*



+ : Ближе к реальности, полная биологическая система

- : Этические и вопросы безопасности, дорогой

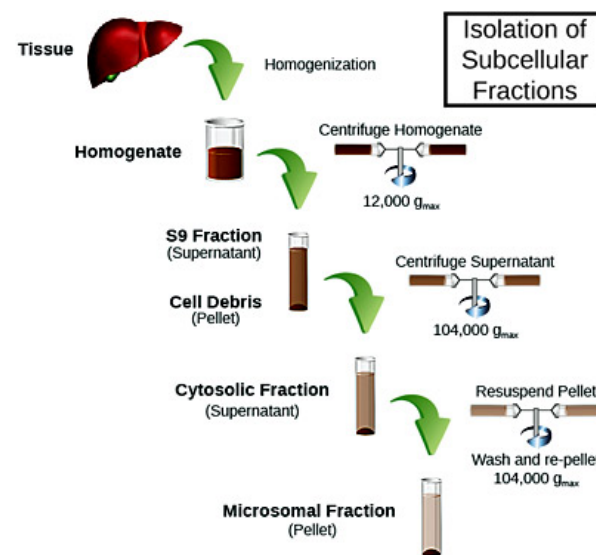
Существует несколько стратегий возможных:

2) в пробирке

- кусочки печени, изолированные перфузии печени (комплекс)
- Первичные гепатоциты
- Клеточные линии печени
- Человеческая печень S9 фракция
- Человеческая печень субклеточных фракции (микрос, цитозол)

+ : Легче контролировать, дешевле

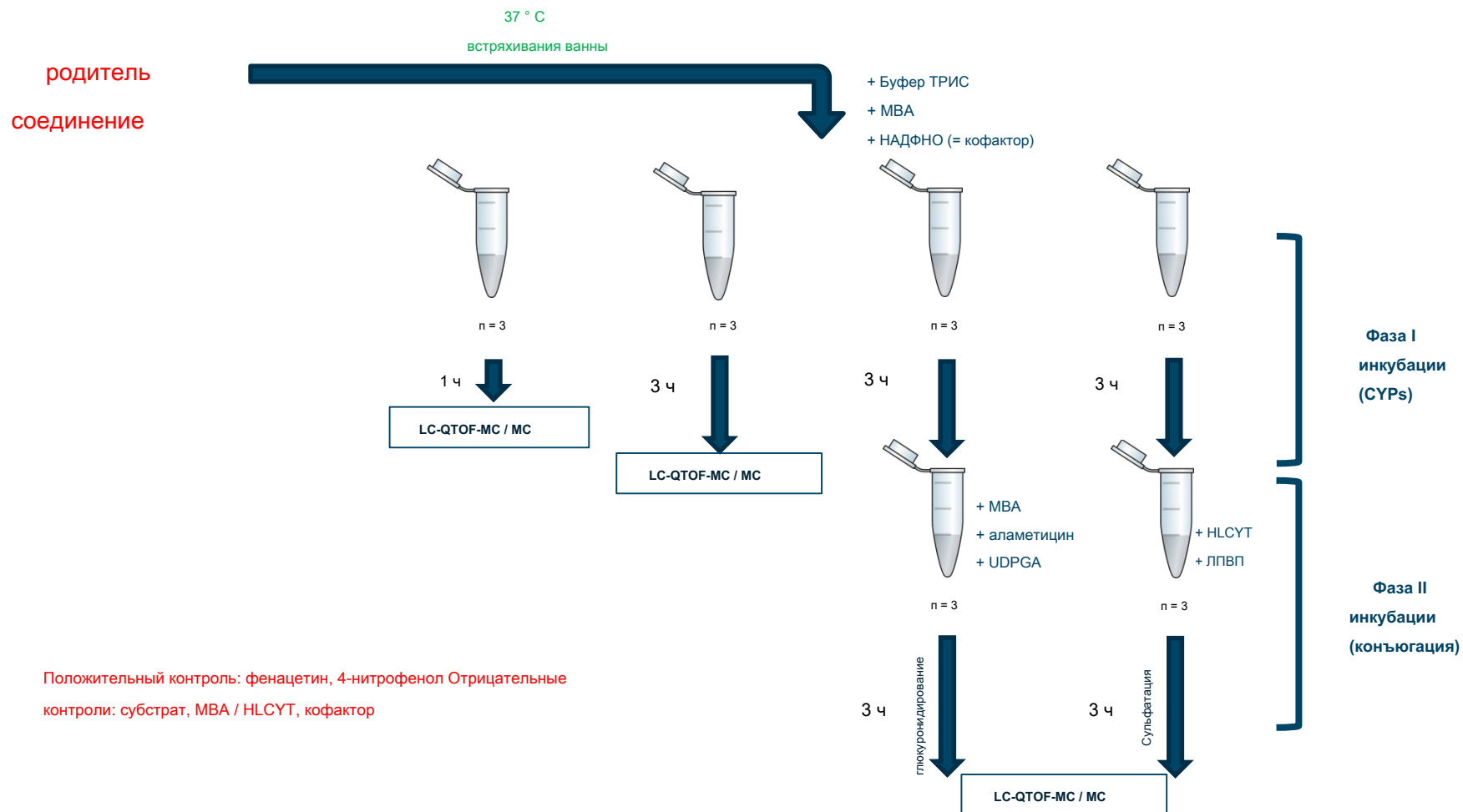
- : Представитель в *естественных условиях* биотрансформации?



**Для оптимизации *straightforward* в пробирке установить, чтобы
выяснить метаболический путь NPS и к
определить биомаркеры:**

- На основе инкубирования с субклеточными фракциями человека
- Анализ полученных экстрактов с помощью жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрии высокого разрешения
- Разъяснение метаболитов через комбинацию подозреваемых и не- рабочих процессов анализа целевых данных

в пробирке инкубирование экспериментальной установки: прямолинейное



MBA = микросомы печени человека HLCYT =

человек цитозол печень

CYP = система P450 фермента цитохром

НАДФН = никотинамидадениндинуклеотидфосфат UDPGA =

2,5-uridinediphosphate глюкуроновой кислоты PAPS =

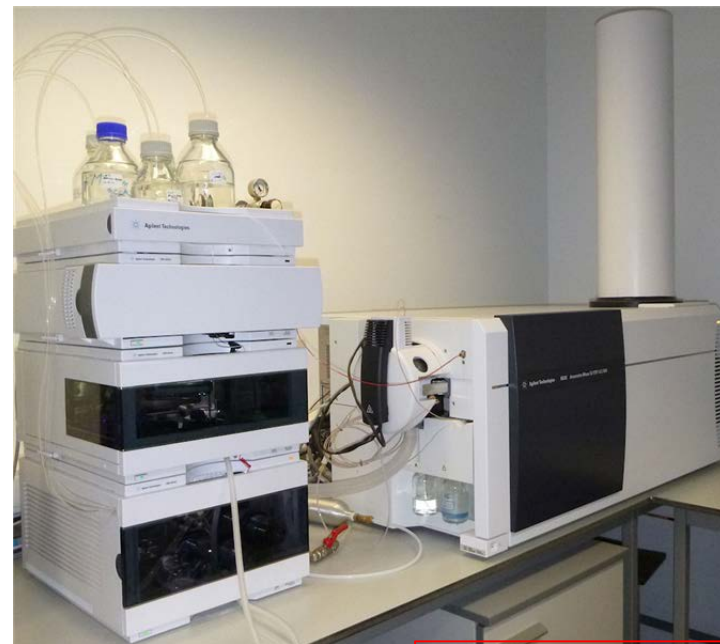
аденозин-3-фосфат 5-phosphosulfate

Базовые приготовления:

- Тушение метаболизма: + 250 мкл охлажденного на льду ацетонитрил + 1% муравьиной кислоты
- Добавление теофиллина в качестве «внутреннего стандарта»
- Центрифугирование 5 мин при 8000 оборотах в минуту
- Выпаривание и восстановление в 200 мкл 10/90 (об / об) растворе ACN / Milli-Q воды

LC-ESI-MC-QTOF

- Компания Agilent 1290 UPLC соединен с Agilent 6530 QTOF
- ЖХ Колонка: Kinetex C8 (2,1 x 150 мм, 1,7 мкм)
- Мобильная фаза **A** : Milli-Q + 0,04% Ф.А.
- Мобильная фаза **B** : 80/20 ACN / Milli-Q + 0,04% Ф.А.
- Время работы: 30 минут (время дают отделиться!)
- ESI +/-
- Данные в зависимости от приобретения
- энергия столкновения: 10/20/40 V



Анализ данных:

1. Наиболее трудоемкий шаг, но очень важно!
2. Сочетание подозрительных и нецелевых рабочих процессов (дополнительного)
3. Определение метаболитов: различные уровни доверия

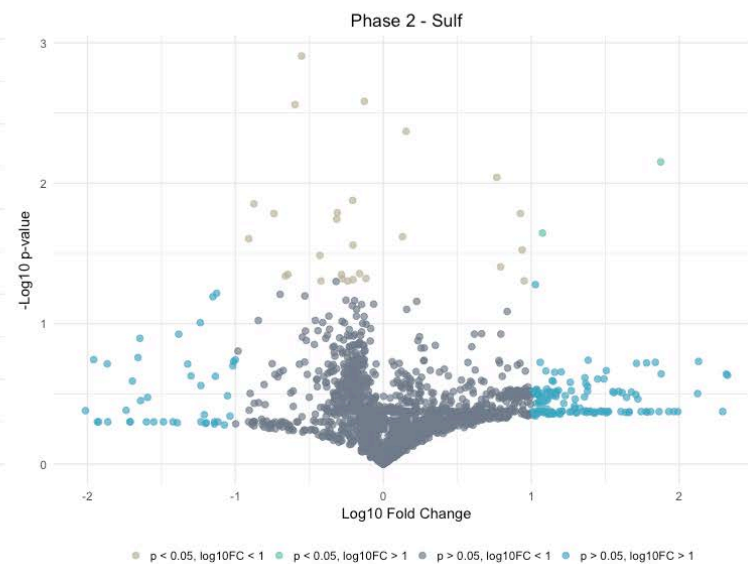
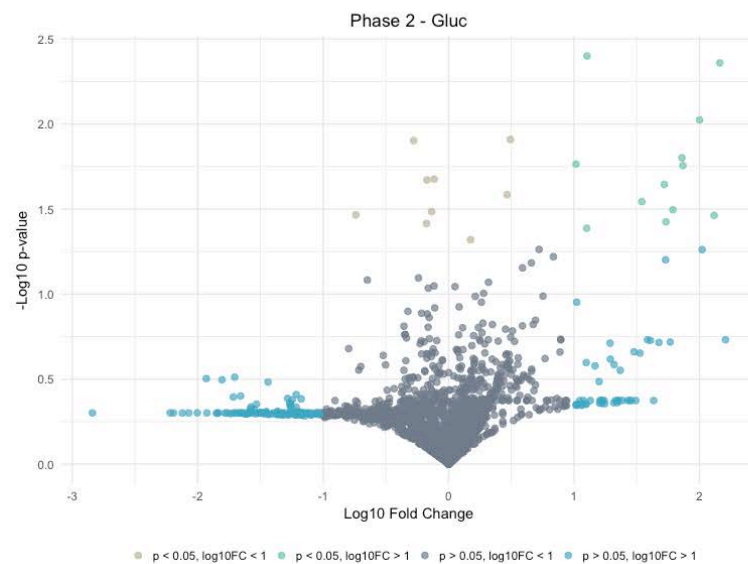
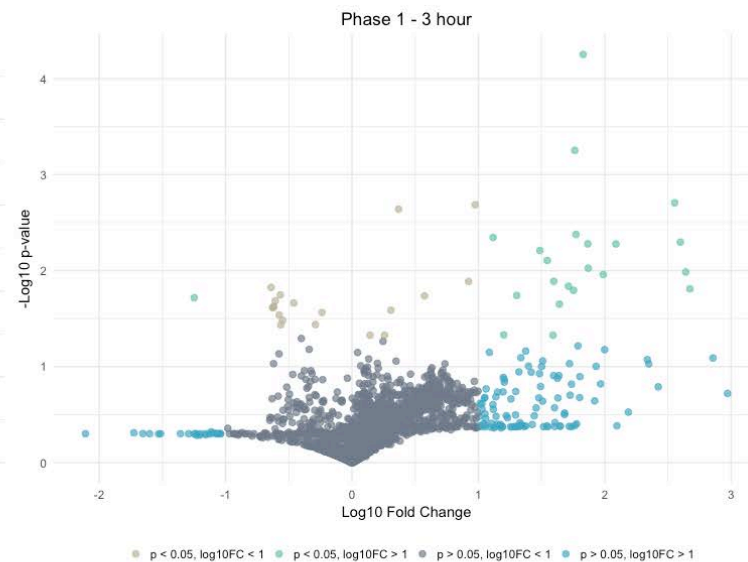
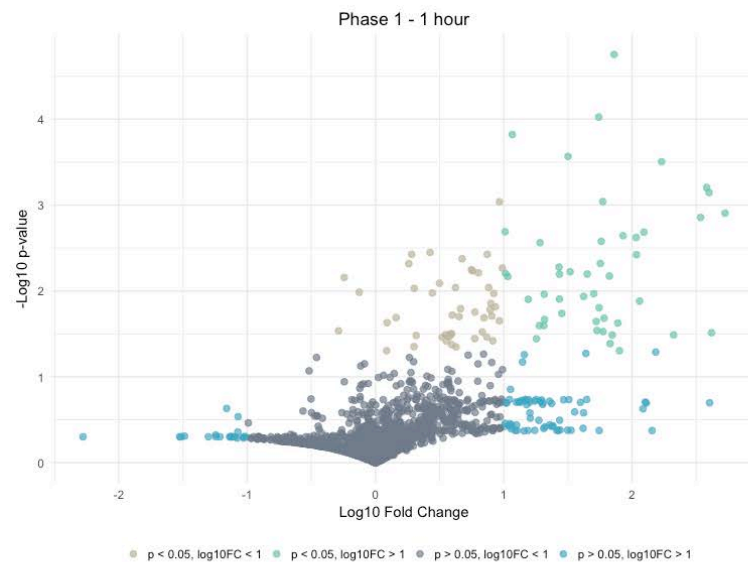
Identification confidence	Minimum data requirements
Level 1: Confirmed structure by reference standard	MS, MS ² , RT, Reference Std.
Level 2: Probable structure a) by library spectrum match b) by diagnostic evidence	MS, MS ² , Library MS ² MS, MS ² , Exp. data
Level 3: Tentative candidate(s) structure, substituent, class	MS, MS ² , Exp. data
Level 4: Unequivocal molecular formula	MS isotope/adduct
Level 5: Exact mass of interest	MS

Suspect screening

- *In silico* prediction of metabolites with Nexus Meteor (Lhasa Limited) and literature
- Find by Formula algorithm (Agilent MassHunter)
 - $\Delta m/z < \pm 10$ ppm
 - Present in 2 out of 3 replicates
 - Not present in negative controls
 - Double bond equivalent (DBE) match
 - Matching isotope pattern

Подозреваемый рабочий
стратегия

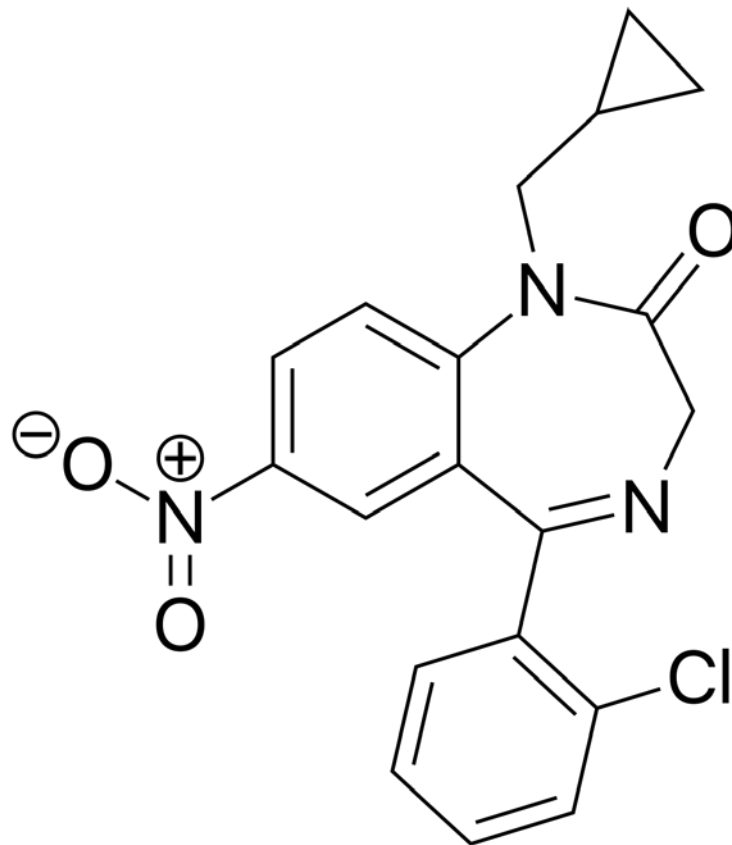
стратегии рабочего процесса, не являющиеся мишенью



вулкан участки

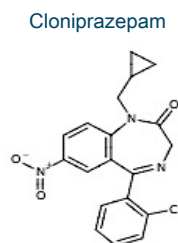
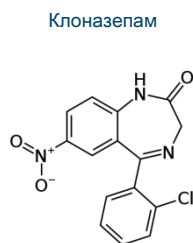


Пример 1: CLONIPRAZEPAM



Cloniprazepam = Дизайнер бензодиазепина

- Производное от клоназепама (Rivotril®)



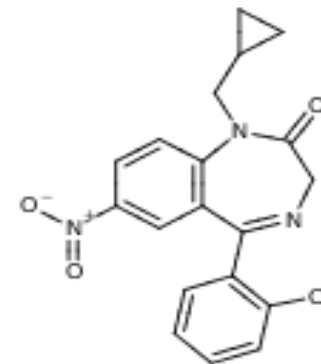
- Седативные, анти-судороги, мышечный релаксант и анксиолитическое свойства
- Самолечение: альтернатива рецепту бензодиазепинов
- Комбинация с другими лекарственными средствами

Нет клинической информации:

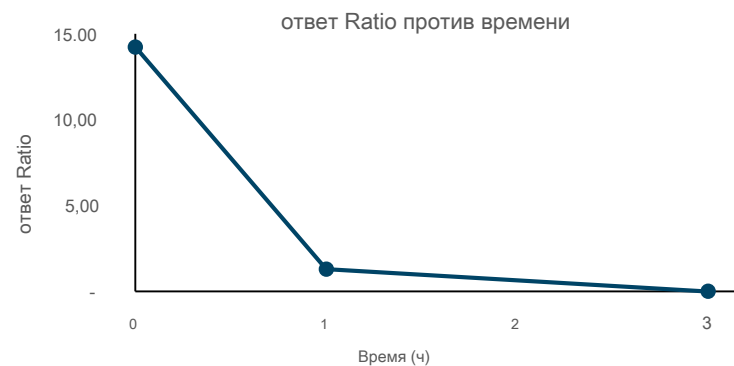
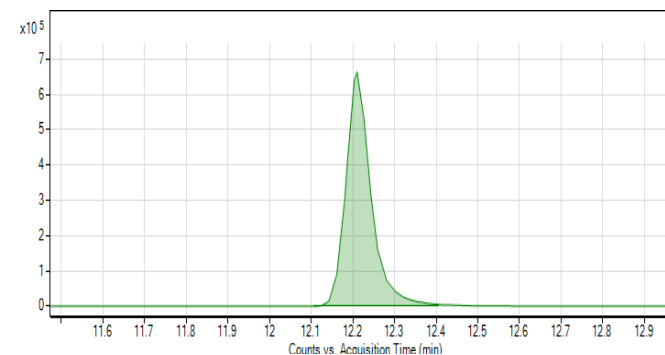
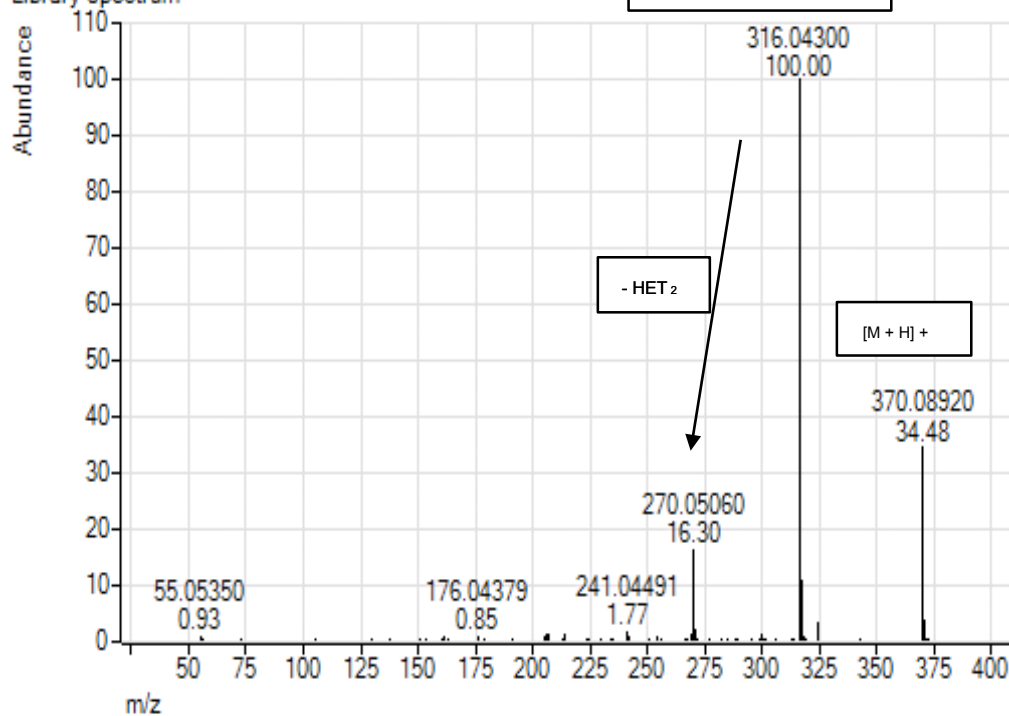
- Фармакокинетика?
- Метаболизм?
- Обнаружение в крови, моче?

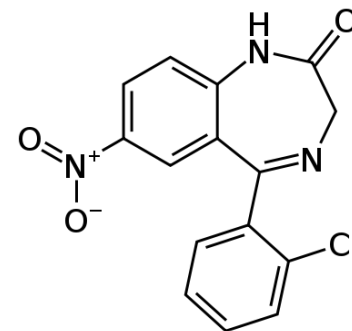
Cloniprazepam исходное соединение /

$m/z = 370.0953$ ($[M + H]^+$)



Library spectrum

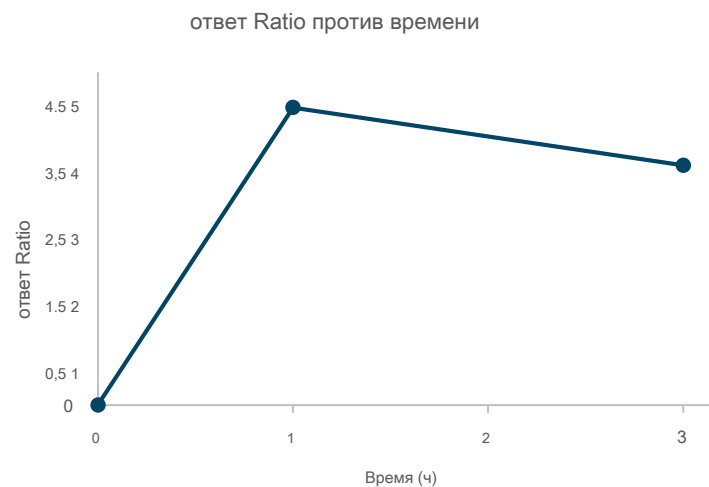
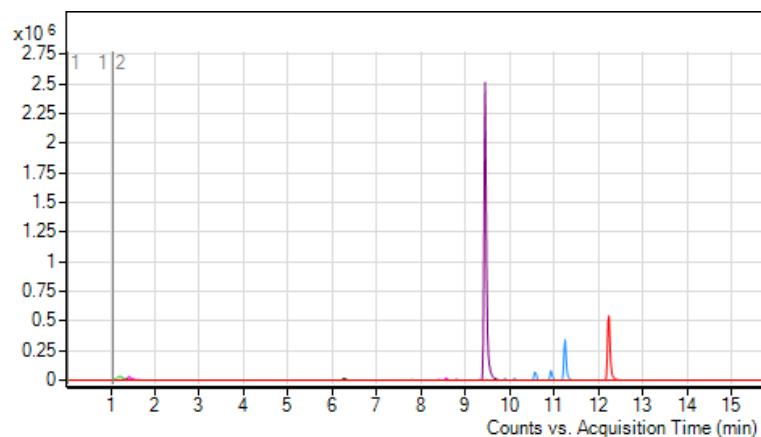




Клоназепам

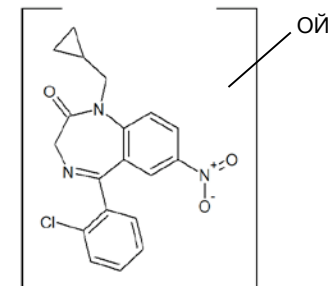
$m/z = 316.0483$ ($[M + H]^+$)

- Наиболее известный метаболит
- Подтвержденный с MS / MS и аналитическим эталоном

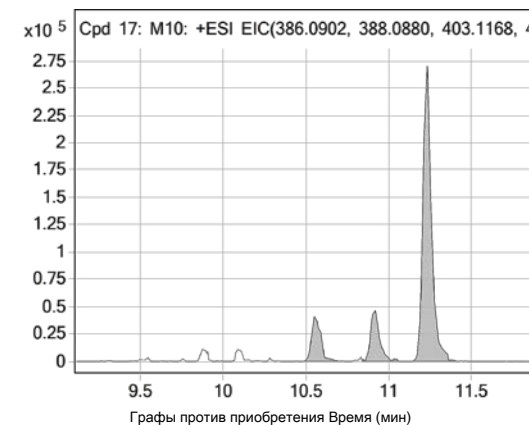


Окси-cloniprazepam

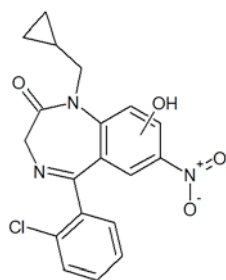
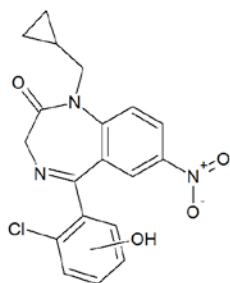
$m/z = 386.0902$ ($[M + H]^+$)

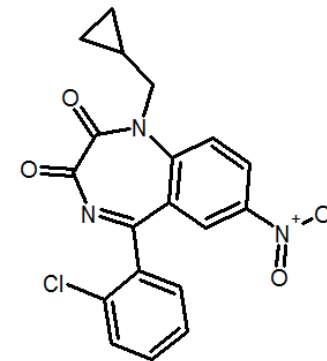


- Различные изомеры присутствуют
- МС / МС для 3 выделенных пиков
- Фрагмент m/z 332,04 соответствует гидрокси-клоназепам
 -> нет гидроксирования на боковой цепи метилциклопропил



- RT 11.2 мин: Потеря H_2O • Раманатхан и др (Anal Chem, 2000, 72: 1352-1359): « Данные МС / МС показал потерю воды с алифатическим гидроксированием, который не было благоприятствование, когда гидроксирование было фенольным»
- RT 10,6 и 10,9 мин: Нет потерь H_2O вывода присутствует

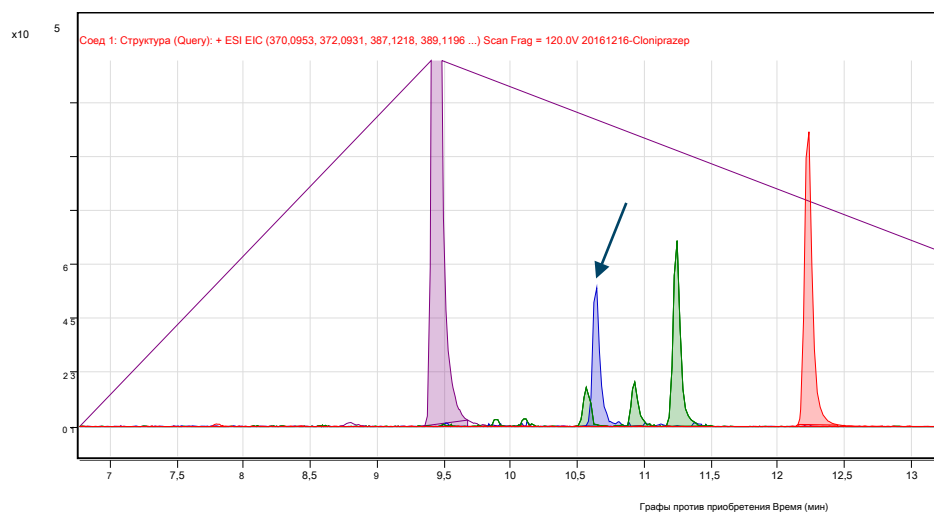




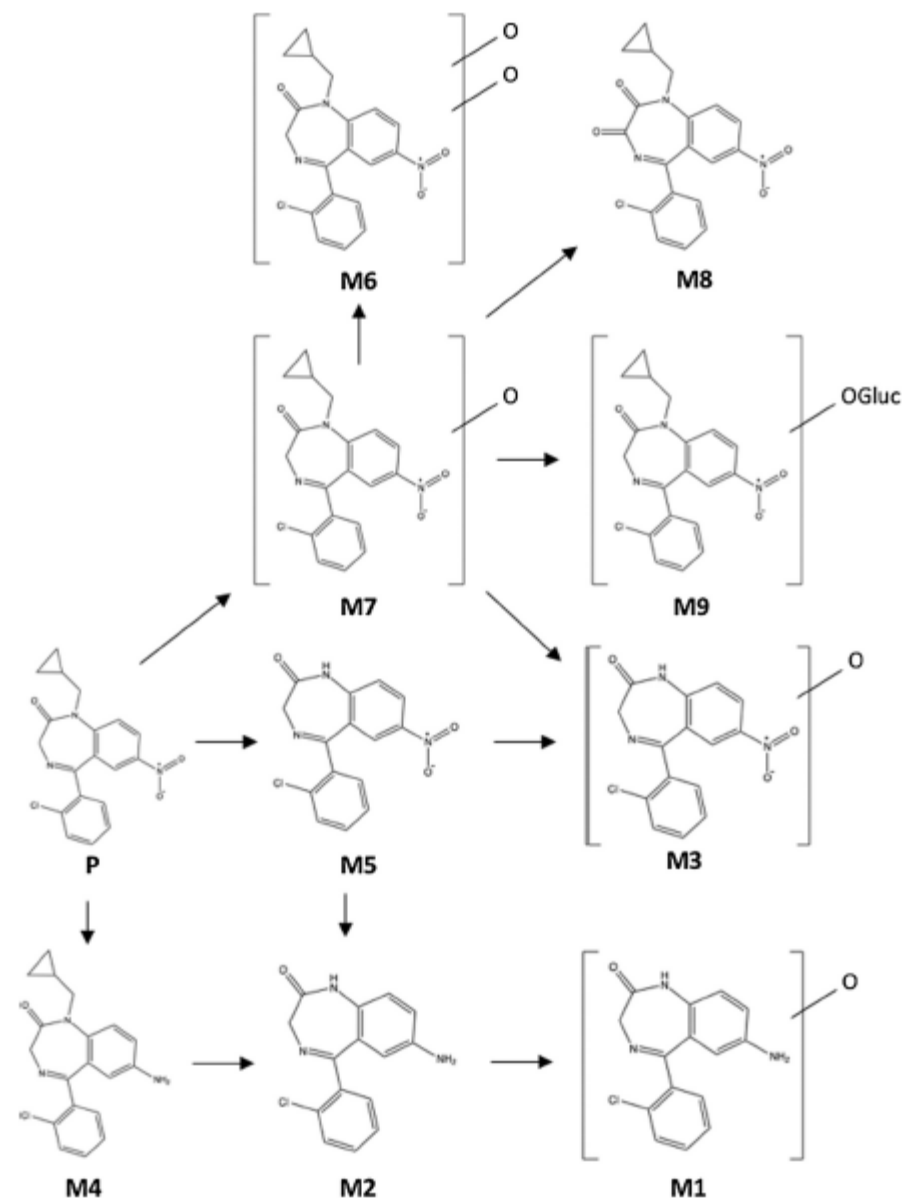
3-кето-cloniprazepam

$m/z = 384.0746$ ($[M + H]^+$)

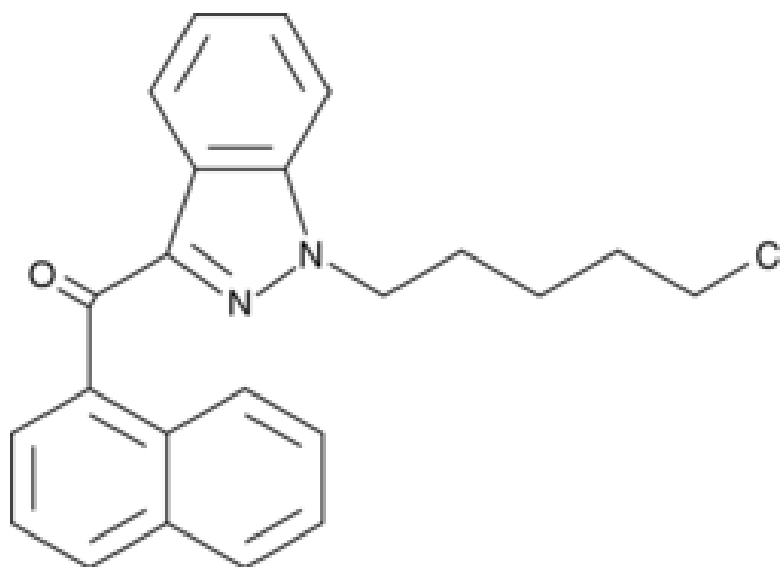
- Не предсказывается *в силикомарганца* прогнозирование
- Выявленный нецелевой рабочий процесс
- Подтверждено MS / MS и двойные связи эквиваленты



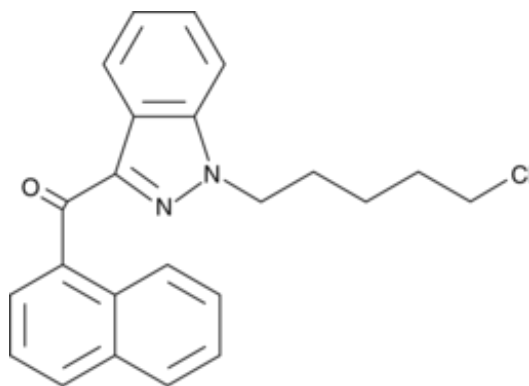
- 9 человек *в пробирке* метаболиты cloniprazepam определены
 - 8 Фаза I и 1 метаболиты Фаза II
- Клоназепам: самый известный *в пробирке* метаболит
- 5 метаболитов были специфичными для cloniprazepam
 - OH-cloniprazepam
 - 7-NH₂- cloniprazepam
 - 3-кето-cloniprazepam
 - Дигидрокси-cloniprazepam
 - Глюкуронид OH-cloniprazepam
- Возможные биомаркеры для приема cloniprazepam



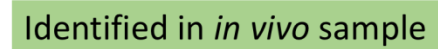
Пример 2: 5cl-THJ-018



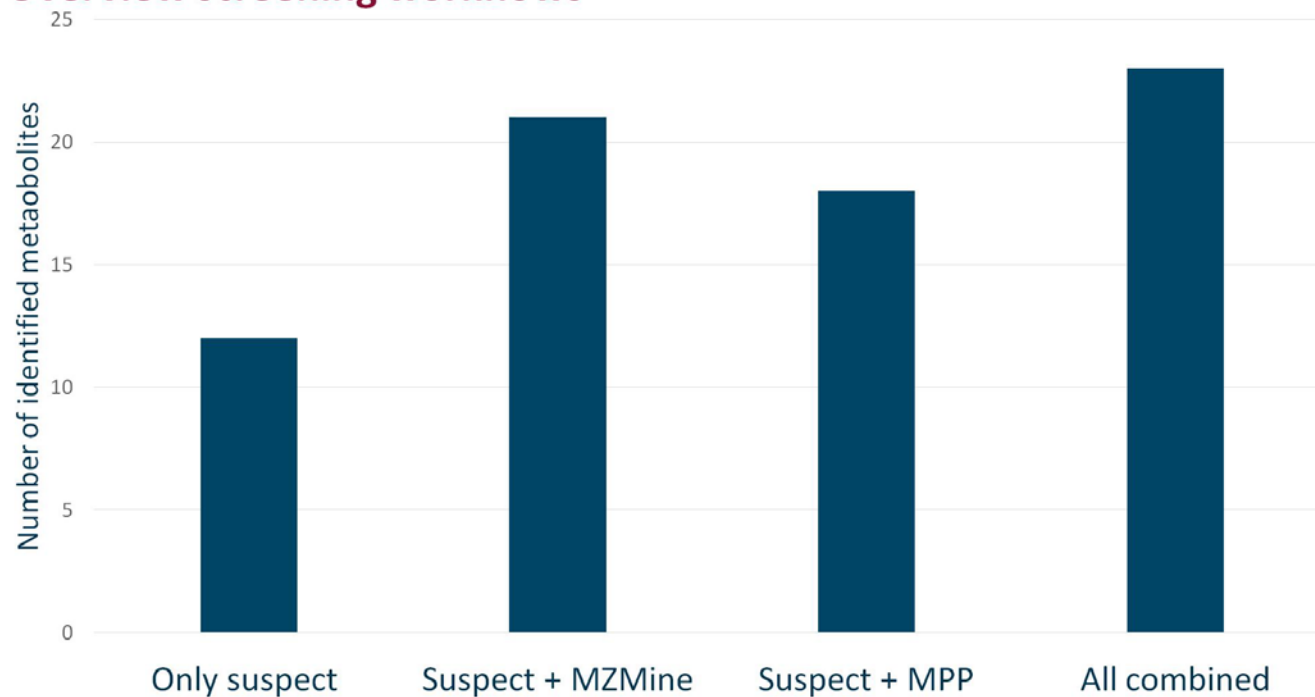
5-Cl-THJ-018 = Синтетические каннабиноиды (5-хлорпентил JWH 018 индазола аналог)



- Каннабиноидов агонист рецептора: каннабис-подобные эффекты
- Физиологические и токсикологические свойства этого соединения не были определены
- Обширные биотрансформации можно ожидать!
- Возможность сравнить *в пробирке* результаты с *в естественных условиях* случай: подлинный образец мочи от пользователя (который на самом деле думал, что он использовал methiopropamine)



Overview screening workflows



Взаимодополняемость рабочих процессов !!!!

- Исследование NPS метаболической судьбы необходимо выбрать целевые биомаркеры
- Легко и просто установка с субклеточными фракциями, но ограничения должны быть приняты во внимание:
 - Только выбранные ферменты присутствуют (например, NAT, ...)
 - Нет полной биологической системы
 - Качественный, не количественное
- Важность (а) звук сбора данных и (б) дополнительный анализ данных рабочих процессов Выводов



Toxicological Centre

University of Antwerp

Спасибо за внимание! Вопросов?