

УДК 543

## СОВМЕСТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДЕВЯТИ УРЕМИЧЕСКИХ ТОКСИНОВ И ХОЛИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С ТАНДЕМНЫМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

© 2024 г. Т. И. Алюшина<sup>а</sup>, Е. И. Савельева<sup>а, \*</sup>, В. А. Добронравов<sup>б</sup>

<sup>а</sup> Научно-исследовательский институт гигиены, пропатоологии и экологии человека  
Федерального медико-биологического агентства России  
г.п. Кузьмоловский, ст. Капитолово, Всевожский район,  
Ленинградская область, 188663 Россия

<sup>б</sup> Научно-исследовательский институт нефрологии при Первом Санкт-Петербургском государственном  
медицинском университете им. И.П. Павлова Минздрава России  
ул. Льва Толстого, 6--8, кор. № 54, 197089 Санкт-Петербург, Россия

\*E-mail: saveleva@rihophe.site

Поступила в редакцию 12.12.2023 г.

После доработки 15.12.2023 г.

Принята к публикации 16.12.2023 г.

Представлена методика одновременного определения девяти уремиических токсинов и холина в сыворотке крови. Целевые вещества подобраны по литературным данным в качестве перспективных биомаркеров для установления тяжести и характера прогрессирования иммуноглобулин А нефропатии – заболевания почек, приводящего к потере трудоспособности, а при отсутствии своевременного лечения – к смерти людей молодого и среднего возраста. С применением ультрафильтрации достигается разделительное определение свободных и связанных с белками крови индольных уремиических токсинов. Использование высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией высокого разрешения обеспечивает удовлетворительную точность анализа при отсутствии полного хроматографического разделения аналитов в стандартных условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ. При проведении градуировки в качестве суррогатной сыворотки крови использовали раствор альбумина в фосфатном буферном растворе. Концентрация белка 45 мг/мл и pH 7.4 соответствуют этим характеристикам нативной сыворотки крови. В рамках пилотного эксперимента показана перспективность определения важнейших показателей состояния кишечного микробиома – холина и триметиламиноксида в сухих пятнах крови.

**Ключевые слова:** уремиические токсины, холин, сыворотка крови, иммуноглобулин А нефропатия, высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием высокого разрешения (ВЭЖХ-МС/МС ВР), триметиламиноксид (ТМАО), сухие пятна крови.

DOI: 10.31857/S0044450224080094, EDN: tjelgc

Болезнь Берже, или иммуноглобулин А нефропатия (IgA-нефропатия), – тяжелое заболевание почек, проявляющееся, как правило, в молодом возрасте [1]. Доступные в настоящее время способы диагностики IgA-нефропатии основаны на исследовании биоптического материала [2], но даже и эти инвазивные и небезопасные для пациентов методы далеко не всегда способны

помочь установить достоверные различия между прогрессирующими и не прогрессирующими формами течения IgA-нефропатии [3].

В последние годы появляется все больше данных о вовлеченности малых молекул, циркулирующих в крови, в развитие целого ряда заболеваний, в том числе и нефрологических. Метаболиты крови, ассоциированные

с хроническими заболеваниями почек, получили название уремических токсинов. Уремические токсины можно определить как органические соединения, которые не могут быть выведены из организма и поэтому накапливаются в кровотоке, достигая различных органов, включая почки и сердце. Уремические токсины до конца не изучены, но хорошо известно, что их содержание в плазме крови прогрессивно увеличивается в острых фазах болезней почек, способствуя ряду функциональных изменений [4]. При этом уровни содержания и тем более динамика уремических токсинов в крови пациентов при IgA-нефропатии до настоящего времени не установлены.

Доказано, что сердечно-сосудистая смертность значительно выше у лиц с нарушениями функции почек [5], поэтому вопросы профилактики и диагностики почечной дисфункции весьма актуальны. У пациентов с почечной дисфункцией, как правило, микрофлора кишечника становится несбалансированной и неупорядоченной [6]. Ось “кишечник—почки—сердце” при хронической болезни почек привлекает все большее внимание [7]. Накопление уремических токсинов, продуцируемых микроорганизмами кишечника, приводит к возникновению хронической болезни почек, а также повышает риск развития сердечно-сосудистых событий. Триметиламин-N-оксид (ТМАО), образующийся в результате потребления с пищей холина, L-карнитина и бетаина, является одним из уремических токсинов, вызывающих поражение почек и сердца, развитие атеросклероза и других патологий [8]. Нарушение функции почек в сочетании с дисбиозом микробиоты кишечника приводит к увеличению концентрации циркулирующего ТМАО [9, 10], что, в свою очередь, усугубляет повреждение почек, способствуя развитию воспалительных процессов [11]. Повышенное содержание холина в циркулирующей крови изменяет состав микроорганизмов кишечника [12]. Эти данные позволяют предположить, что существует тесное взаимодействие между холином крови и микробиомом, которое приводит к различным режимам активации катаболических путей [13]. Связь кишечник—почки с метаболическими позициями исследована в работе [14]. Особый интерес в этой области вызывают продукты микробной биодegradации аминокислот и им подобных нутриентов, в частности индольные метаболиты триптофана: индолуксусная кислота, индоксилглюкуронид и индоксилсульфат [15], ТМАО как продукт биодegradации карнитина и холина, фенилглюкуронид и фенилсульфат, образующиеся при биодegradации тирозина, гиппуровая кислота и фенилацетилглутамин, связанные с биодegradацией фенилаланина [16, 17]. Биомаркером микробной биодegradации фурановых жирных кислот является 3-карбоксив-5-пропил-2-фуранпропионовая кислота

(КМПФ), ассоциированная не только с почечной дисфункцией, но и с диабетом [18].

На основании анализа литературы сформирована группа биомаркеров почечной дисфункции, ассоциированной с альтерацией кишечного микробиома, включающая классические уремические токсины и холин. Часть уремических токсинов обнаруживается в крови в виде сульфатов и глюкуронидов, а холин, хотя и циркулирует в системном кровотоке в свободном виде, как и все четвертичные аммониевые основания, не образует летучих производных. Этими обстоятельствами продиктована необходимость применения жидкостной хроматографии для определения выбранных биомаркеров. Высокоэффективная жидкостная хроматография в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) является золотым стандартом для разделения, идентификации и определения уремических токсинов [19]. Пока не существует согласованного мнения относительно биологических эффектов свободных и связанных с белком уремических токсинов. Авторы работы [20] полагают, что факторами риска являются свободные (не связанные с белком) уремические токсины, в других же работах утверждается, что более информативным показателем является их общее содержание в сыворотке или плазме [21]. До тех пор пока этот вопрос остается дискуссионным, отдельное определение свободных и связанных с белками индольных уремических токсинов сохраняет актуальность.

Цель настоящей работы – разработка методики определения в сыворотке крови группы биогенных соединений, включающей девять уремических токсинов и холин.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

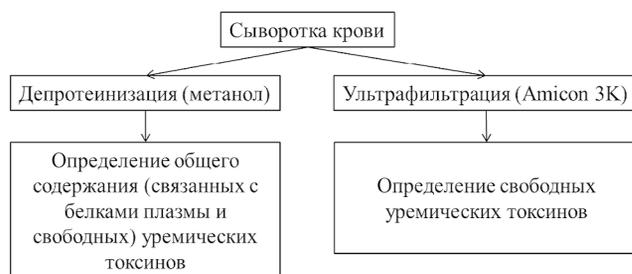
**Реактивы и стандарты.** В качестве стандартных образцов использовали реактивы производства Sigma-Aldrich (США): индолуксусную кислоту (кат. № 87-51-4), индоксилглюкуронид (кат. № 35804-66-1), индоксилсульфат (кат. № 2642-37-7), триметиламиноксид (ТМАО, кат. № 1184-78-7), фенилацетилглутамин (кат. № 28047-15-6), 3-карбоксив-4-метил-5-пропил-2-фуранпропионовую кислоту (КМПФ, кат. № 86879-39-2), фенилсульфат (кат. № 1733-88-6), фенилглюкуронид (кат. № 17685-05-1), гиппуровую кислоту (кат. № 495-69-2), холин (кат. № 67-48-1). В качестве антиоксиданта использовали дитиотрейтол (Servicebio, Китай, артикул: GC205010-1G). Для приготовления растворов аналитов и элюентов использовали ацетонитрил (Panreac, Испания, кат. № 221881.1611), метанол для ВЭЖХ (J.T. Baker, Индия, кат. № 8402), муравьиную кислоту (Sigma, США, кат. № 251364).

Образцы сыворотки крови для анализа были предоставлены Институтом нефрологии

при Первом медицинском университете им. И.П. Павлова. Образцы отбирали от 10 пациентов с установленным после биопсии почки диагнозом “IgA-нефропатия” и от 10 пациентов с отсутствием такого диагноза. Различное физиологическое состояние доноров позволяло получить широкий разброс концентраций аналитов в сыворотке крови и сориентироваться в диапазонах концентраций при разработке методики для последующего диагностического применения. Образцы поступили в лабораторию зашифрованными, со скрытой информацией о персональных и клинических данных.

При разработке методики использовали объединенную сыворотку крови, полученную смешением сыворотки крови шести доноров. При оценке возможности применения техники сухих пятен для определения холина и ТМАО в цельной крови использовали свежееотобранную кровь донора. Для отбора сухих пятен цельной крови использовали карты Protein Saver 903 Card (Whatman, США, кат. № 10534320) и карты для сбора и хранения биологического материала TU 9398-001-27207261-2015 (ООО “Биохран”, Россия).

**Подготовка образцов для анализа.** Включение холина в группу аналитов предъявило особые требования к подготовке проб к анализу, поскольку известно, что при комнатной температуре концентрация холина в плазме и сыворотке крови повышается *ex vivo* за счет остаточного действия эстераз, осуществляющих гидролиз фосфатидилхолина с образованием свободного холина [22]. С учетом этого обстоятельства все процедуры подготовки проб к анализу проводили при температуре не выше 4°C. При соблюдении температурного режима концентрации всех аналитов, включая холин, оставались стабильными в течение по крайней мере 8 ч. Фракции свободных (не связанных с белком) соединений отделяли методом ультрамикрофильтрации. Подготовка сыворотки крови для определения свободных и связанных с белками соединений проводили согласно процедуре, описанной в работе [23]. Для определения свободных компонентов 100 мкл сыворотки переносили в устройство для ультрафильтрации (центробежный фильтр Amicon Ultra-0.5 с мембраной Ultracel-3k, предел отсечения по массе: 3КДа) и центрифугировали в течение 15 мин со скоростью 14 000 об/мин (радиус ротора 6 см) при 4°C. Для определения общего содержания соединений (свободных и связанных с белками крови) к 100 мкл сыворотки крови добавляли 300 мкл метанола, тщательно перемешивали и центрифугировали 15 мин со скоростью 14 000 об/мин при указанных выше условиях. Схема подготовки сыворотки или плазмы к анализу для определения общего содержания уремиических токсинов и их фракции, не связанной с белками, представлена на рис. 1.



**Рис. 1.** Схема определения свободных и связанных с белками уремиических токсинов в сыворотке крови.

### Хромато-масс-спектрометрический анализ.

Для определения уремиических токсинов использовали ВЭЖХ-МС/МС высокого разрешения, приборный комплекс фирмы Thermo Scientific (США), хроматограф модели Dionex UltiMate 3000 и масс-спектрометр Q Exactive электроспрей HESI – II. Условия анализа приведены в табл. 1. Аналитические характеристики определения уремиических токсинов, в том числе хроматографические времена удерживания и характеристичные массовые числа ( $m/z$ ) даны в табл. 2.

При данных условиях продолжительность анализа одной пробы составила 15 мин. Перед каждой тестовой пробой анализировали холостую пробу. Эффект переноса в исследованном диапазоне концентраций для всех аналитов отсутствовал.

С помощью гидрофильной хроматографии возможно более эффективное разделение компонентов, в использованном же нами стандартном режиме обращенно-фазовой ВЭЖХ

**Таблица 1.** Условия хроматографического разделения аналитов

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| Колонка                        | Agilent SB-C8:<br>150 мм × 4.6 мм × 1.8 мкм  |
| Подвижная фаза                 | Фаза А: 0.1%-ная муравьиная кислота в деионизованной воде.<br>Фаза Б: 0.1%-ная муравьиная кислота в ацетонитриле         |
| Градиентный режим элюирования  | 0–0.5 мин (10% Б); 0.5–8 мин (от 10% Б до 90% Б); 8–10 мин (90% Б); 10–10.1 мин (от 90% Б до 10% Б); 10.1–14 мин (10% Б) |
| Скорость подвижной фазы        | 0.4 мл/мин   |
| Температура термостата колонки | 35°C   |

**Таблица 2.** Аналитические характеристики уремических токсинов и холина

| Аналит                | [M+H] <sup>+</sup> | [M-H] <sup>-</sup> | Выбранные ионные реакции | Время удерживания, мин |
|-----------------------|--------------------|--------------------|--------------------------|------------------------|
| Индолуксусная кислота | 176.0706           | —                  | 176.0706→130.0649        | 6.5                    |
| Индоксилглюкуронид    | —                  | 308.0770           | 308.0770→113.0230        | 7.8                    |
| Индоксилсульфат       | —                  | 212.0023           | 212.0023→79.9558         | 7.2                    |
| ТМАО                  | 76.0757            | —                  | 76.0757→58.0652          | 3.9                    |
| Фенилацетилглутамин   | 265.1180           | —                  | 265.1180→130.0496        | 8.0                    |
| КМПФ                  | —                  | 239.0925           | 239.0925→195.1016        | 10.4                   |
| Фенилсульфат          | —                  | 172.9914           | —                        | 7.8                    |
| Фенилглюкуронид       | —                  | 269.0668           | —                        | 7.8                    |
| Гиппуровая кислота    | —                  | 178.0509           | —                        | 8.3                    |
| Холин                 | 104.1069           | —                  | —                        | 3.8                    |

не достигалось разделение пиков индоксилглюкуронида, индоксилсульфата и фенилглюкуронида, однако в условиях масс-спектрометрии высокого разрешения это не влияло на точность анализа. В случае масс-спектрометрии низкого разрешения потребуется оптимизация условий хроматографического разделения.

**Анализ сухих пятен крови.** Каплю цельной крови наносили на подложки (картриджи) для отбора сухих пятен импортного (Whatman 903) и отечественного (Биохран) производства. После нанесения образец высушивали в течение около 2 ч при комнатной температуре, исключая возможность загрязнения другими образцами. Для элюирования аналитов в пробирку типа Эппендорф емк. 5 мл помещали вырезанное пятно крови, добавляли 100 мкл раствора дитиотреитола с концентрацией 20 мг/мл и 100 мкл деионизованной воды. Содержимое пробирки тщательно перемешивали в вортексе в течение 20 мин, затем добавляли 600 мкл ацетонитрила и встряхивали еще 15 мин, после чего центрифугировали (10 мин, 14 000 об/мин, радиус ротора 6 см, 4°C), отделяли супернатант и анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС в тех же условиях, которые использовали для анализа сыворотки крови.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Особенность методики определения девяти уремических токсинов и холина в сыворотке крови заключается в том, что она объединяет в одном анализе соединения с разными физико-химическими свойствами в широких (2 и 3 порядка величины) диапазонах концентраций. Все определяемые соединения являются

биогенными, получить сыворотку крови, в которой бы они отсутствовали, не представляется возможным. В отсутствие доступа к изотопно меченым стандартам определяемых соединений мы предприняли попытки подбора внутренних стандартов среди абиогенных веществ с элементами структурного подобия в отношении определяемых аналитов, однако эксперименты показали, что наименьшая погрешность определений достигается при использовании метода внешнего стандарта.

**Выбор условий масс-спектрометрического определения.** При разработке методики существовала проблема значительной разницы концентраций аналитов в сыворотке крови. Компоненты, при регистрации которых в режиме полного ионного тока наблюдались матричные влияния (индолуксусная кислота, индоксилглюкуронид, индоксилсульфат, ТМАО, фенилацетилглутамин, КМПФ), определяли в режиме тандемной масс-спектрометрии (МС/МС) с регистрацией выбранных реакций. Соединения, свободные от матричных интерференций (фенилсульфат, фенилглюкуронид, гиппуровая кислота, холин), определяли в режиме регистрации полного ионного тока. Из-за различной природы соединений детектирование осуществляли одновременно в режимах положительной и отрицательной ионизации. Поскольку общее количество аналитов в методике относительно невелико, использование “гибридного” протокола детектирования не усложняло процедуру анализа.

**Градуировка с использованием суррогатной биоматрицы.** Для определения свободных уремических токсинов в плазме крови построили градуировочные графики в диапазоне

концентраций 0.0010–10.0 мкг/мл. Так как все определяемые соединения эндогенные, невозможно получить градуировочные зависимости с использованием плазмы крови с внесением аналитов. Необходимо подобрать оптимальную суррогатную матрицу для градуировочных определений.

Проблема суррогатных биоматриц в метаболическом анализе решается или использованием стандартизованного образца, в котором концентрации определяемых компонентов точно установлены и не меняются во времени, либо полным устранением (инкубирование с ферментами, экстракция) определяемых веществ. Ни один из перечисленных подходов с учетом природы аналитов не мог быть использован при разработке настоящей методики. В качестве суррогатной сыворотки крови использовали раствор альбумина с концентрацией 45 мг/мл в фосфатном буферном растворе (25 мМ, pH 7.4). Таким образом, pH, вязкость, плотность и содержание растворенного белка в суррогатной матрице были идентичны этим свойствам природной сыворотки крови. В приготовленную таким образом суррогатную матрицу вносили модельную смесь аналитов, итоговые концентрации которых в градуировочных смесях составляли 0.01, 0.05, 0.1, 1.0 и 10 мкг/мл по каждому веществу. Далее для определения суммарного содержания свободных и связанных с белками крови уремиических токсинов и холина в градуировочных растворах подготовку проб и анализ проводили по процедурам, описанным в “Экспериментальной части”. Коэффициенты детерминации ( $R^2$ ) градуировочных зависимостей составляют не менее 0.993.

**Воспроизводимость результатов определения целевых компонентов** оценивали следующим образом: объединенный образец сыворотки крови разделяли на пять аликвот и определяли фоновые концентрации целевых компонентов. Затем в объединенный образец сыворотки крови добавляли аналитические стандарты с известной концентрацией и анализировали. Показатели контроля качества определяли в рамках одной аналитической серии для образцов с нативным содержанием определяемых соединений и с добавкой. Добавки стандартной смеси составляли от 0.001 до 1 мкг/мл в зависимости от фонового содержания аналита в плазме. Показателями контроля качества служили величины стандартного отклонения ( $s$ , %). Результаты оценки показали удовлетворительную воспроизводимость методики – стандартное отклонение не превышало 20% во всех образцах для контроля. Результаты оценки воспроизводимости методики для концентраций, приблизительно соответствующих удвоенным уровням фоновых концентраций, представлены в табл. 3.

**Таблица 3.** Результаты оценки воспроизводимости методики

| Аналит                | Линейный диапазон, мкг/мл | $s$ , % |
|-----------------------|---------------------------|---------|
| КМПФ                  | 0.01–10.0                 | 2       |
| ТМАО                  | 0.01–10.0                 | 12      |
| Гиппуровая кислота    | 0.1–10.0                  | 8       |
| Индоксилглюкуронид    | 0.01–1.0                  | 8       |
| Индоксилсульфат       | 0.01–1.0                  | 4       |
| Индолуксусная кислота | 0.1–10.0                  | 3       |
| Фенилглюкуронид       | 0.01–1.0                  | 10      |
| Фенилсульфат          | 0.01–10.0                 | 9       |
| Фенилацетилглутамин   | 0.01–1.0                  | 8       |
| Холин                 | 0.1–10.0                  | 3       |

**Апробацию методики** проводили с использованием рандомизированных образцов плазмы крови 10 пациентов нефрологической клиники с установленным диагнозом “Нефропатия IgA” и 10 человек с нормальной функцией почек. Всего проанализировали 20 образцов. Во всех образцах сыворотки крови определили искомые аналиты, за исключением фенилглюкуронида, содержание которого в пяти из 20 проанализированных образцов сыворотки крови было ниже предела определения.

В табл. 4 представлены установленные нами интервалы концентраций и медианные значения концентраций уремиических токсинов и холина в сыворотке крови, а также опорные сведения о концентрациях этих соединений в плазме/сыворотке/цельной крови (источник [24] не уточняет) в норме и при тяжелой патологии почек.

Опорные данные по содержанию свободного холина в сыворотке крови приведены из оригинальных источников [25, 26], поскольку холин, как отмечено ранее, не относится к уремиическим токсинам. В базе данных [24] собраны концентрации без указания характера биообразца, а также без указания использованного метода. Некоторые результаты получены для малых выборок: от 10 до 1 человека. Концентрации, соответствующие патологии, преимущественно относятся к терминальным стадиям заболевания для пациентов, находящихся на гемодиализе. Кроме того, отсутствие патологии в большинстве случаев устанавливается весьма условно. Для фенилглюкуронида и индоксилглюкуронида опорные данные отсутствуют. В целом можно отметить, что интервалы концентраций уремиических токсинов в сыворотке/плазме крови настолько широки, что определение точечных концентраций представляется малопродуктивным для диагностики. Скорее может быть полезен

**Таблица 4.** Установленные медианные значения и интервалы концентраций девяти уремических токсинов и холина в сыворотке крови по результатам анализа 20 образцов в сравнении с данными из “Базы данных уремических токсинов” [24]

| Аналит                                  | Медиана, мкг/мл | Интервал концентраций, мкг/мл |                     |                     |
|---|-----------------|-------------------------------|---------------------|---------------------|
|   |                 | наши данные                   | литературные данные |                     |
|   |                 |                               | норма               | патология           |
| КМПФ                                    | 2.2             | 0.077–5.2                     | 4.6 ± 1.8           | 26 ± 10             |
| ТМАО                                    | 0.70            | 0.37–1.5                      | 2.8 ± 1.5           | 7.5 ± 2.4           |
| Гиппуровая кислота                      | 1.2             | 0.54–6.5                      | 3.0 ± 2.0           | 109 ± 65            |
| Индоксилглюкуронид                      | 0.13            | 0.070–0.53                    | –                   | –                   |
| Индоксилсульфат, свободный              | 0.42            | 0.17–1.1                      | 0.53 ± 0.29         | 3.8 ± 2.5           |
| Индоксил сульфат, общее количество      | 3.3             | 1.1–5.2                       | 0.54 ± 0.4          | 37 ± 26             |
| Индолуксусная кислота, свободная        | 0.13            | 0.10–0.29                     | 0.49 ± 0.34         | 1.3 ± 0.8           |
| Индолуксусная кислота, общее количество | 0.51            | 0.29–0.81                     | 17.5 ± 17.5         | 1.0 ± 0.7           |
| Фенилглюкуронид                         | 0.01            | 0.004*–0.033                  | –                   | –                   |
| Фенилацетилглутамин                     | 0.57            | 0.22–1.5                      | 0.4 ± 0.2           | 52.3 ± 30.0         |
| Фенилсульфат                            | 0.26            | 0.11–1.2                      | 0.48 ± 0.3          | 1.9 ± 0.6           |
| Холин                                   | 2.2             | 1.2–3.2                       | <0.7–2.0 [25]       | 3.7. ± 0.9 [25, 26] |

\*Ниже предела определения.

мониторинг динамики профиля уремических токсинов и холина в сыворотке крови конкретного пациента для контроля прогрессирования заболевания и эффективности лечения.

Закономерным желанием аналитиков является определение как можно большего количества аналитов по одной методике, следствием чего являются многочисленные примеры одновременного определения нескольких десятков соединений в одной процедуре. На основании анализа доступных источников можно полагать, что для определения уремических токсинов многоцелевые методики пока не созданы. Причины, вероятно, кроются в значительном разбросе концентраций уремических токсинов, их различной способности связываться с белками крови, а также образовывать глюкурониды и сульфаты. Методом ВЭЖХ с флуориметрическим детектором удалось определить четыре аналита [27], методом ВЭЖХ-МС/МС определили пять аналитов по одной методике [28]. Рекордным количеством остается 10 уремических токсинов по одной ВЭЖХ-МС/МС-методике, не охватывающей определение холина [23], в то время как циркулирующий холин крови, наряду с продуктом его микробной трансформации ТМАО являются важнейшими биомаркерами состояния кишечного микробиома [29]. Определение холина и ТМАО в сыворотке или плазме крови не входит

в перечень стандартных анализов, выполняемых клиническими лабораториями. Ввиду отмеченной ранее нестабильности холина в плазме или сыворотке хранение и транспортировка биопроб из клиник в диагностические центры представляет проблему. В этой связи привлекательной представляется техника сухих пятен крови, предоставляющая возможность транспортировки проб в почтовых конвертах. Если объектом анализа является не сыворотка или плазма, а цельная кровь, то отбор пробы может происходить в мобильном медицинском пункте, не оснащенном холодильником и центрифугой. Интересные данные сравнительного исследования содержания холина в плазме и цельной крови представлены в работе [30]. Цельная кровь перед анализом была гемолизирована. Наблюдали положительную корреляцию между содержанием холина в цельной крови и плазме ( $r = 0.42$ ,  $p \leq 0.001$ ). Авторы полагают, что содержание холина в цельной крови отражает его внутриклеточные концентрации, которые, в свою очередь, коррелируют с концентрациями холина в цитозоле. То обстоятельство, что содержание холина в плазме или сыворотке может быть установлено путем пересчета его концентрации в цельной крови, открывает возможности для малоинвазивного экспресс-тестирования содержания холина в капле крови и, возможно, даже в сухих пятнах крови.

В рамках настоящего исследования провели пилотный эксперимент по оценке возможности определения холина и ТМАО в сухих пятнах цельной крови. При разработке методики экстракции аналитов из сухих пятен крови применяли различные растворители: метанол, ацетонитрил, водный раствор дитиотреитола с концентрацией 20 мг/мл и 0.9%-ный водный раствор хлорида натрия. При использовании для экстракции 0.9%-ного водного раствора хлорида натрия не происходил гемолиз крови, и благодаря этому в образцы не попадали фрагменты клеток крови и их содержимое. Однако подавление интенсивности ионизации хлоридом натрия при ВЭЖХ-МС/МС-анализе оказалось более значительным, чем матричный эффект от гемолиза клеток крови. В связи с этим для экстракции аналитов из сухих пятен использовали раствор дитиотреитола (ДТТ) в деионизованной воде. Схема подготовки проб к анализу в технике сухих пятен представлена на рис. 2.

Не так давно в России начато производство картриджей для отбора сухих пятен биоматериалов. Картриджи разработаны в целях генетического анализа, однако интересно оценить их применимость и в биоаналитических исследованиях.

**Сравнение свойств специализированных картриджей Whatman и Биохран.** Методику сухих пятен разрабатывали на двух видах специализированных картриджей: Whatman 903 и Биохран. Кровь отбирали и наносили на картриджи, по пять образцов на каждый вид картриджей. Далее образцы высушивали в течение 2 ч, подготавливали к анализу и анализировали описанным выше методом. Результаты сравнительной оценки применимости импортных и отечественных картриджей для определения холина и ТМАО в цельной крови иллюстрирует рис. 3. Как следует

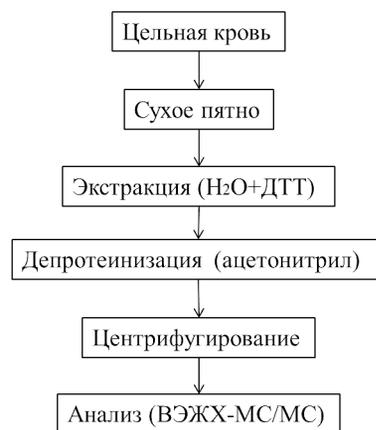


Рис. 2. Схема определения холина и триметил-амин-N-оксида (ТМАО) в сухих пятнах крови.

из рисунка, в случае определения холина разница интенсивностей сигналов составляет 22%, причем интенсивность сигнала при анализе образцов, нанесенных на картриджи Биохран, выше. В случае определения ТМАО интенсивность сигнала при анализе образцов, нанесенных на картриджи Биохран, ниже на 93%. Таким образом, для разработки методики определения холина в сухих пятнах крови подходят оба вида картриджей, причем отечественные могут оказаться предпочтительнее. Для определения обоих аналитов в одной методике картриджи Биохран пока не подходят. В планах их производителя разработка картриджей для биоаналитического применения.

Пилотный эксперимент показал перспективность исследований по разработке методик для клинического применения в технике сухих пятен.

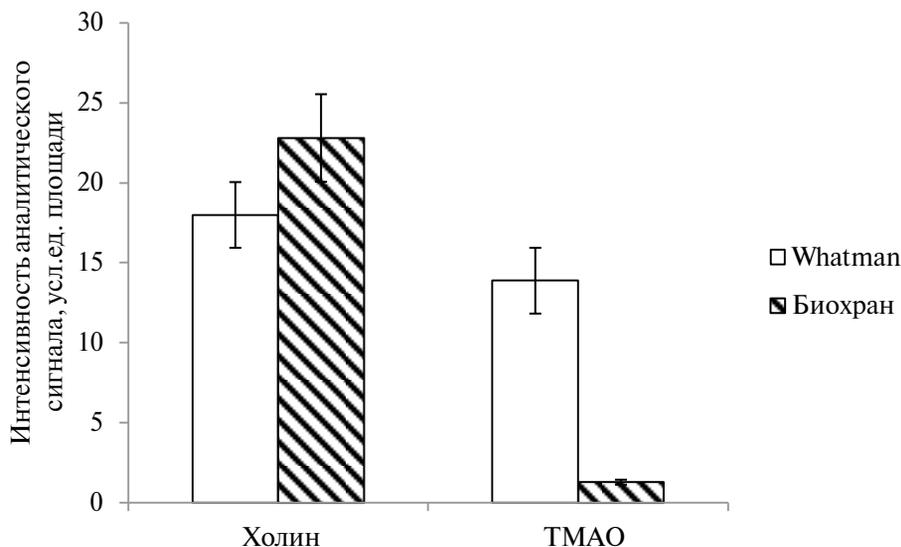


Рис. 3. Результаты сравнения картриджей Whatman 903 и Биохран на примере определения холина и триметил-амин-N-оксида (ТМАО) в технике сухих пятен крови.

\* \* \*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Разработанная методика обеспечивает определение в одном анализе девяти уремиических токсинов и холина в сыворотке крови. Суммарная продолжительность анализа и пробоподготовки составляет 30 мин, что позволяет отнести разработанную методику к экспресс-анализу. Для отдельного определения свободных и связанных с белком индолных токсинов использован метод ультрафильтрации. Применение раствора альбумина в фосфатном буферном растворе в качестве суррогатной матрицы при анализе градуировочных растворов позволило учесть матричные влияния сыворотки крови. Применение масс-спектрометрии высокого разрешения дает возможность снизить требования к эффективности хроматографического разделения аналитов. Такой подход приемлем для исследовательских лабораторий, выполняющих различные аналитические задачи без замены хроматографической колонки в стандартном режиме обращенно-фазовой ВЭЖХ. Для лабораторий с потоковым однотипным анализом такой подход нельзя назвать рациональным. При транслировании методики на более доступное аналитическое оборудование потребуется оптимизация условий хроматографического разделения. В рамках пилотного эксперимента показана целесообразность проведения исследований по оценке возможности определения холина и ТМАО в сухих пятнах крови.

Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории биохимии Института нефрологии при Первом медицинском университете им. акад. И.П. Павлова за предоставление образцов для анализа.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда 23-15-00510.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г., ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого донора было получено информированное добровольное согласие.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

1. *Nair R., Walker P.D.* Is IgA nephropathy the commonest primary glomerulopathy among young adults in the USA // *Kidney Int.* 2006. V. 69. P. 1455.
2. *Шулов Е.М., Бобкова И.Н., Колина И.Б., Камышова Е.С.* Клинические рекомендации по диагностике и лечению IgA-нефропатии // *Нефрология.* 2015. Т. 19. № 6. С. 83.
3. *Boyd J.K., Barratt J.* Immune complex formation in IgA nephropathy: CD89 a 'saint' or a 'sinner'? // *Kidney Int.* 2010. V. 78. P. 1211.
4. *Falconi C.A., Junho C.V.C., Fogaça-Ruiz F., Vernier I.C.S., da Cunha R.S., Stinghen A.E.M., et al.* Uremic toxins: An alarming danger concerning the cardiovascular system // *Front. Physiol.* 2021. V. 12. Article 686249.
5. *Go A.S., Chertow G.M., Fan D.* Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization // *N. Engl. J. Med.* 2004. V. 351. № 13. P. 1296.
6. *Noce A., Marchetti M., Marrone G.* Link between gut microbiota dysbiosis and chronic kidney disease // *Eur. Rev. Med. Pharmacol.* 2022. V. 26. № 6. P. 2057.
7. *Huang Y., Xin W., Xiong J.* The intestinal microbiota and metabolites in the gut-kidney-heart axis of chronic kidney disease // *Front Pharmacol.* 2022. V. 13. Article 837500.
8. *Bennett B., Vallim T., Wang Z.* Trimethylamine-N-oxide, a metabolite associated with atherosclerosis, exhibits complex genetic and dietary regulation // *Cell Metab.* 2013. V. 17. № 1. P. 49.
9. *Boini K.M., Hussain T., Li P.-L.* Trimethylamine-N-oxide instigates NLRP3 inflammasome activation and endothelial dysfunction // *Cell Physiol. Biochem.* 2017. V. 44. № 1. P. 152.
10. *Ma G., Pan B., Chen Y., Guo C., Zhao M.M., Zheng L.M., Chen B.X.* Trimethylamine N-oxide in atherogenesis: impairing endothelial self-repair capacity and enhancing monocyte adhesion // *Biosci. Rep.* 2017. V. 37. № 2. BSR20160244.
11. *Zheng Y., Tang Z., You L., Wu Y., Liu J., Xue J.* Trimethylamine-N-oxide is an independent risk factor for hospitalization events in patients receiving maintenance hemodialysis // *Ren Fail.* 2020. V. 42. № 1. P. 580.
12. *Yoo W., Zieba J.K., Foegeding N.J., Torres T.P., Shelton C.D., Shealy N.G.* High-fat diet-induced colonocyte dysfunction escalates microbiota-derived trimethylamine N-oxide // *Science.* 2021. V. 373. P. 813.
13. *Yoo W., Zieba J.K., Foegeding N.J., Torres T.P., Shelton C.D., Shealy N.G., et al.* High-fat diet-induced colonocyte dysfunction escalates microbiota-derived trimethylamine N-oxide // *Science.* 2021. V. 373. P. 813.
14. *Xu Y., Kong X., Zhu Y., Xu J., Mao H., Li J., et al.* Contribution of gut microbiota toward renal function

- in sepsis // *Front. Microbiol.* 2022. V. 13. Article 985283.
15. *Гецина М.Л., Черневская Е.А., Белобородова Н.В.* Роль общих для человека и микробиоты метаболитов триптофана при тяжелых заболеваниях и критических состояниях // *Клиническая практика.* 2020. Т. 11. № 1. С. 92. (*Getsina M.L., Chernevskaya E.A., Beloborodova N.V.* The role of human and microbial metabolites of triptophane in severe diseases and critical Ill (review) // *J. Clin. Pract.* 2020. V. 11. № 1. P. 92.)
  16. *Tanaka H., Sirich T.L., Plummer N.S., Weaver D.S., Meyer T.W.* An enlarged profile of uremic solutes // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 8. Article 0135657. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135657>
  17. *Mair R.D., Sirich T.L., Plummer N.S., Meyer T.W.* Characteristics of colon-derived uremic solutes // *Clin. J. of the American Soc Nephrol.* 2018. V. 13. № 9. P. 1398–404. <https://doi.org/10.2215/CJ.N.03150318>.
  18. *Liu G., Gibson R.A., Callahan D., Guo X.-F., Li D., Sinclair A.J.* Pure omega 3 polyunsaturated fatty acids (EPA, DPA or DHA) are associated with increased plasma levels of 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid (CMPF) in a short-term study in women // *Food Funct.* 2020. V. 11. № 3. P. 2058. <https://doi.org/10.1039/c9fo02440a>
  19. *Kikuchi K., Itoh Y., Tateoka R., Ezawa A., Murakami K., Niwa T.* Metabolomic search for uremic toxins as indicators of the effect of an oral sorbent AST-120 by liquid chromatography/tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. B.* 2010. V. 878. № 29. P. 2997. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.09.006>
  20. *Liabeuf S., Barreto D.V., Barreto F.C., Meert N., Glorieux G., Schepers E., et al.* Free p-cresylsulphate is a predictor of mortality in patients at different stages of chronic kidney disease // *Nephrol. Dial. Transplant.* 2010. V. 25. P. 1183. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfp592>
  21. *Machado T.S., Poitevin S., Paul P., McKay N., Jourde-Chiche N., Legris T., et al.* Indoxyl sulfate upregulates liver P-glycoprotein expression and activity through aryl hydrocarbon receptor signaling // *Clin. J. Am. Soc Nephrol.* 2018. V. 29. P. 906. <https://doi.org/10.1681/AS.N.2017030361>
  22. *Ohkawa R., Kurano M., Sakai N., Kishimoto T., Nojiri T., Igarashi K. et al.* Measurement of plasma choline in acute coronary syndrome: Importance of suitable sampling conditions for this assay // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 4725.
  23. *Fabresse N., Uteem I., Lamy E., Massy Z., Larabi I.A., Alvarez J.-C.* Quantification of free and protein bound uremic toxins in human serum by LC-MS/MS: Comparison of rapid equilibrium dialysis and ultrafiltration // *Clin. Chim. Acta.* 2020. V. 507. P. 228. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.04.032>
  24. Электронный ресурс Uremic Solutes Database / [database.uremic-toxins.org](http://database.uremic-toxins.org) (дата обращения 11.12.2023).
  25. *Garcia E., Shalaurova I., Matyus S.P., Wolak-Dinsmore J., Oskardmay D.N., Connelly M.A.* Quantification of choline in serum and plasma using a clinical nuclear magnetic resonance analyzer // *Clin Chim Acta.* 2022. V. 1. № 524. P. 106. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2021.11.031>
  26. *Ilcol Y.O., Dilek K., Yurtkuran M., Ulus I.* Changes of plasma free choline and choline-containing compounds' concentrations and choline loss during hemodialysis in ESRD patients // *Clin. Biochem.* 2002. V. 35. № 3. P. 233. [https://doi.org/10.1016/s0009-9120\(02\)00298-9](https://doi.org/10.1016/s0009-9120(02)00298-9)
  27. *Silva L.A.P., Campagnolo S., Fernandes S.R., Marques S.S., Barreiros L., Sampaio-Maia B. Segundo M.A.* Rapid and sustainable HPLC method for the determination of uremic toxins in human plasma samples // *Anal. Bioanal. Chem.* 2023. V. 415. P. 683.
  28. *Calaf R., Cerini C., Genovesio C., Verhaeghe P., Jourde-Chiche N., Berge-Lefranc D.* Determination of uremic solutes in biological fluids of chronic kidney disease patients by HPLC assay // *J. Chromatogr. B.* 2011. V. 879. № 23. P. 2281. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.06.014>
  29. *Zhan X., Fletcher L., Huyben D., Cai H., Dingle S., Qi N., et al.* Choline supplementation regulates gut microbiome diversity, gut epithelial activity, and the cytokine gene expression in gilts // *Front. Nutr.* 2023. V. 10. Article 1101519. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1101519>
  30. *Awwad H.M., Kirsch S.H., Geise J., Obeid R.* Measurement of concentrations of whole blood levels of choline, betaine, and dimethylglycine and their relations to plasma levels // *J. Chromatogr. B.* 2014. V. 957. P. 41.

## JOINT DETERMINATION OF NINE UREMIC TOXINS AND CHOLINE IN BLOOD SERUM USING HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH TANDEM MASS SPECTROMETRIC DETECTION

T. I. Alyushina<sup>a</sup>, E. I. Savelyeva<sup>a,\*</sup>, V. A. Dobronravov<sup>b</sup>

<sup>a</sup> *Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology, and Human Ecology of the Federal Medical-Biological Agency of Russia, 188663 Kuzmolovsky Settlement, Leningrad Region, Russia*

<sup>b</sup> *Research Institute of Nephrology, I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University, 197089 St. Petersburg, Russia*

\*E-mail: saveleva@rihophe.site

**Abstract.** This paper presents a method for the simultaneous determination of nine uremic toxins and choline in blood serum. The target substances were selected based on literature data as potential biomarkers for assessing the severity and progression of immunoglobulin A nephropathy, a kidney disease that leads to disability, and, without timely treatment, death in young and middle-aged individuals. Ultrafiltration is used to separately determine free and protein-bound indolic uremic toxins in the blood. The use of high-performance liquid chromatography combined with high-resolution tandem mass spectrometry ensures satisfactory accuracy of the analysis without complete chromatographic separation of analytes under standard reversed-phase HPLC conditions. For calibration purposes, an albumin solution in phosphate buffer was used as a surrogate for blood serum. The protein concentration of 45 mg/mL and pH 7.4 match the characteristics of native blood serum. A pilot experiment demonstrated the feasibility of determining key indicators of the gut microbiome's state—choline and trimethylamine N-oxide (TMAO)—in dried blood spots.

**Keywords:** uremic toxins, choline, blood serum, immunoglobulin A nephropathy, high-performance liquid chromatography with high-resolution tandem mass spectrometric detection (HPLC-MS/MS HR), trimethylamine N-oxide (TMAO), dried blood spots.