

<https://doi.org/10.47183/mes.2025-27-1-26-36>

УДК 615.9



## НОВАЯ ONE-POT МЕТОДИКА ПОЛУЧЕНИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ИНДАПАМИДА ПУТЕМ ОКИСЛЕНИЯ-КОНЬЮГАЦИИ НА МАЛДИ-МИШЕНИ

О.А. Кельцьева<sup>1,2</sup>, А.А. Афанасьева<sup>1</sup>, С.К. Ильюшонок<sup>2,3</sup>, А.С. Гладчук<sup>1,2,3</sup>, А.Н. Арсеньев<sup>2</sup>, А.С. Фролов<sup>2</sup>, В.Н. Бабаков<sup>3</sup>, К.А. Краснов<sup>1✉</sup>, Е.П. Подольская<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Научно-клинический центр токсикологии имени академика С. Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Институт аналитического приборостроения Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека Федерального медико-биологического агентства, Ленинградская обл., Россия

**Введение.** Метаболическая активация ксенобиотиков, в том числе лекарственных средств, считается одним из основных механизмов развития идиосинкразических реакций. Соответственно, потенциальная биоактивация ксенобиотика должна быть тщательно оценена на ранних этапах разработки лекарств. В связи с этим поиск новых быстрых и эффективных методик скрининга реакционноспособных метаболитов ксенобиотиков является актуальным.

**Цель.** Разработка новой методики моделирования процессов биотрансформации ксенобиотиков *in vitro* для выявления потенциальных метаболитов индапамида.

**Материалы и методы.** В качестве методов сравнения были выбраны такие неферментативные инструментальные методы, как электрохимическое окисление (ЭХО) и фотокаталитическое окисление (ФКО) в объеме. Моделирование второй фазы метаболизма осуществлялось путем инкубации продуктов окисления индапамида с улавливающим агентом (глутатион, GSH). Продукты окисления, а также их конъюгаты с GSH затем анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией. В основе новой one-pot методики моделирования метаболизма лежит проведение УФ-индуцированного ФКО ксенобиотика в присутствии GSH на функционализированной диоксидом титана поверхности мишени с последующей регистрацией продуктов с помощью масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией.

**Результаты.** В случае ЭХО было обнаружено 5 метаболитов и 3 аддукта с GSH, а при использовании ФКО в объеме было выявлено 7 метаболитов и 1 аддукт с GSH. При использовании новой one-pot методики было найдено 8 аддуктов с GSH. Помимо ряда выявленных известных метаболитов индапамида и их конъюгатов с GSH, в совокупности тремя методами для индапамида было зафиксировано по 4 ранее не изученных метаболита и аддукта с GSH.

**Выводы.** По сравнению с ЭХО и ФКО в объеме предложенный аналитический подход к моделированию метаболизма индапамида показал более высокую информативность в сочетании с простотой и экспрессностью, что делает его перспективным для использования в доклинических исследованиях лекарственных препаратов при прогнозировании метаболизма и токсичности объектов фармацевтической разработки, а также при изучении процессов биотрансформации различных ксенобиотиков.

**Ключевые слова:** индапамид, МАЛДИ масс-спектрометрический анализ, аддукты, электрохимическое окисление, глутатион, фотокаталитическое окисление, ксенобиотик, реактивные метаболиты

**Для цитирования:** Кельцьева О.А., Афанасьева А.А., Ильюшонок С.К., Гладчук А.С., Арсеньев А.Н., Фролов А.С., Бабаков В.Н., Краснов К.А., Подольская Е.П. Новая one-pot методика получения потенциальных метаболитов индапамида путем окисления-конъюгации на МАЛДИ-мишени. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2025;27(1):26–36. <https://doi.org/10.47183/mes.2025-27-1-26-36>

**Финансирование:** исследование выполнено в рамках государственного задания № 388-00072-23-00, НИР шифр «Мишень».

**Благодарности:** авторы выражают благодарность за техническую поддержку ресурсному центру «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Научного парка СПбГУ за возможность работы с МАЛДИ масс-спектрометрическим оборудованием.

**Потенциальный конфликт интересов:** авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

✉ Краснов Константин Андреевич [krasnov\\_tox@mail.ru](mailto:krasnov_tox@mail.ru)

Статья поступила: 29.09.2024 После доработки: 03.02.2025 Принята к публикации: 13.02.2025

## A NEW ONE-POT TECHNIQUE FOR OBTAINING POTENTIAL INDAPAMIDE METABOLITES BY OXIDATION AND CONJUGATION ON MALDI TARGET

Olga A. Keltsieva<sup>1,2</sup>, Anna A. Afanasyeva<sup>1</sup>, Semyon K. Ilyushonok<sup>2,3</sup>, Alexey S. Gladchuk<sup>1,2,3</sup>, Alexander N. Arseniev<sup>2</sup>, Alexander S. Frolov<sup>2</sup>, Vladimir N. Babakov<sup>3</sup>, Konstantin A. Krasnov<sup>1✉</sup>, Ekaterina P. Podolskaya<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Golikov Research Center of Toxicology, St. Petersburg, Russia

<sup>2</sup> Institute of Analytical Instrumentation RAS, St. Petersburg, Russia

<sup>3</sup> Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Leningrad region, Russia

**Introduction.** Metabolic activation of xenobiotics, including pharma drugs, is considered to be one of the main mechanisms for the development of idiosyncratic reactions. Accordingly, the potential bioactivation of a xenobiotic should be carefully evaluated in the early stages of drug development. In this regard, the search for new rapid and effective screening techniques for reactive metabolites of xenobiotics presents particular interest.

**Objective.** Development of a new technique for modeling the processes of xenobiotic biotransformation *in vitro* to identify potential metabolites of indapamide.

**Materials and methods.** Non-enzymatic instrumental methods, such as electrochemical oxidation (ECO) and photocatalytic oxidation (PCO) in volume, were used as comparison methods. The second phase of metabolism was modeled by incubating the oxidation products of indapamide with a trapping agent (glutathione, GSH). The oxidation products, as well as their conjugates with GSH, were then analyzed by high-performance liquid chromatography–tandem

© О.А. Кельцьева, А.А. Афанасьева, С.К. Ильюшонок, А.С. Гладчук, А.Н. Арсеньев, А.С. Фролов, В.Н. Бабаков, К.А. Краснов, Е.П. Подольская, 2025

mass spectrometry (HPLC–MS/MS). The developed one-pot technique for metabolism modeling is based on a UV-induced PCO of a xenobiotic in the presence of GSH on the surface of a target functionalized with titanium dioxide followed by detection of the products by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI).

**Results.** In use of ECO resulted in the detection of 5 metabolites and 3 adducts with GSH, while the use of PCO in the volume allowed detection of 7 metabolites and 1 adduct with GSH. The new one-pot technique detected 8 adducts with GSH. In addition to the detection of a number of known indapamide metabolites and their conjugates with GSH, a total of 4 previously unstudied metabolites and adducts with GSH were each detected for indapamide by the three methods.

**Conclusions.** In comparison with ECO and PCO in volume, the proposed analytical technique for modeling indapamide metabolism showed its higher informativity combined with simplicity and rapidity, which makes it a promising candidate for use in preclinical studies of drugs in predicting the metabolism and toxicity of pharmaceutical objects, as well as in studying the biotransformation processes of various xenobiotics.

**Keywords:** indapamide; MALDI mass spectrometric analysis; adducts; electrochemical oxidation; glutathione; photocatalytic oxidation; xenobiotics; reactive metabolites

**For citation:** Keltsieva O.A., Afanasyeva A.A., Ilyushonok S.K., Gladchuk A.S., Arseniev A.N., Frolov A.S., Babakov V.N., Krasnov K.A., Podolskaya E.P. A new one-pot technique for obtaining potential indapamide metabolites by oxidation and conjugation on MALDI target. *Extreme Medicine*. 2025;27(1):26–36. <https://doi.org/10.47183/mes.2025-27-1-26-36>

**Funding:** the work was carried out within the framework of the State task of the Federal Medical-Biological Agency № 388-00072-23-00, scientific research work code: "Mishen".

**Acknowledgements:** the Research Resource Center for Molecular and Cellular Technologies of the Research Park of St. Petersburg State University is acknowledged for technical support with MALDI-MS instrumentation

**Potential conflict of interest:** the authors declare no conflict of interest.

✉ Konstantin A. Krasnov [krasnov\\_tox@mail.ru](mailto:krasnov_tox@mail.ru)

**Received:** 29 Sep. 2024 **Revised:** 3 Feb. 2025 **Accepted:** 13 Feb. 2025

## ВВЕДЕНИЕ

Индапамид (ИПМ), представляющий собой сульфаниламидное производное индольного ряда, рассматривается как одно из наиболее эффективных диуретических средств, применяемых при артериальной гипертензии и застойной сердечной недостаточности<sup>1</sup>.

ИПМ, структура которого приведена на рисунке 1, является галогенсодержащим соединением с брутто-формулой  $C_{16}H_{16}ClN_3O_3S$  ( $m/z$   $[M-H]^-$  364,05).

Применение ИПМ может сопровождаться рядом побочных эффектов, среди которых отмечены реакции гиперчувствительности: сыпь и фоточувствительность [2–4].

Возникновение идиосинкразических реакций на чужеродные для организма химические соединения (ксенобиотики) во многом определяется их метаболической биотрансформацией<sup>2</sup>. В этом плане ИПМ, который активно метаболизирует в организме человека, представляет интересным объектом для углубленного изучения продуктов его биотрансформации, идентификация которых может быть весьма полезной для отслеживания механизмов возникновения кожных реакций и иных проявлений индивидуальной непереносимости лекарственных препаратов и ксенобиотиков.

Процессы превращений ксенобиотиков в организме подразделяются на три основные фазы. Первая — химическая трансформация под действием окислительно-восстановительных или гидролитических ферментов с образованием первичных метаболитов, как правило, обогащенных полярными функциональными группами. Это повышает гидрофильность молекул, благодаря чему они эффективнее выводятся из организма [5]. В ходе второй фазы первичные метаболиты могут вступать в реакции конъюгации с эндогенными молекулами, образуя стабильные (ковалентные) аддукты [6]. Во время третьей фазы

продукты метаболизма выводятся из организма, что происходит обычно при участии транспортных белков [7].

Следует отметить, что наибольшую опасность для организма представляют короткоживущие метаболиты ксенобиотиков, так как они за счет своей высокой реакционной способности вступают в реакции с белками, нарушая тем самым их функциональную активность. Непосредственно детектировать реактивные метаболиты в организме непросто, однако возможно их косвенное определение через аддукты с биомолекулами. По сравнению со свободными метаболитами такие аддукты (конъюгаты) являются более информативными биомаркерами воздействия на организм экзогенного соединения в связи с более длительным пребыванием в организме [8]. Одним из важнейших конъюгирующих агентов в организме служит восстановленный глутатион (GSH) — трипептид, имеющий ключевое значение для защиты клеток от токсического повреждения ксенобиотиками [9]. В процессе метаболизма ксенобиотиков GSH реагирует с такими субстратами, как эпоксиды, галогениды, активные непредельные соединения, после чего образующиеся аддукты выводятся из организма с желчью или мочой [10]. В связи с этим GSH используют в модельных экспериментах в качестве низкомолекулярной ловушки для выявления реакционноспособных продуктов метаболизма

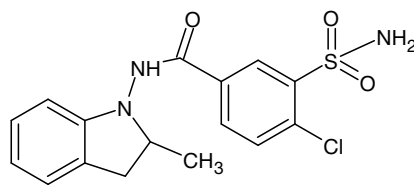


Рисунок подготовлен по данным [1]

**Рис. 1.** Структурная формула индапамида

<sup>1</sup> Машковский МД. Лекарственные средства. М.: Новая Волна; 2024.

<sup>2</sup> Граник ВГ. Метаболизм экзогенных соединений. Лекарственные средства и другие ксенобиотики. М.: Вузовская книга; 2015.

ксенобиотиков. Такие исследования являются важным этапом фармацевтической разработки, поскольку позволяют предсказать токсичность и оценить безопасность потенциального лекарственного препарата [11].

Традиционно для моделирования метаболизма ксенобиотиков применяют биохимические методы с использованием клеток или субклеточных фракций. К последним относятся микросомы печени, содержащие ферменты первой фазы метаболизма (цитохром P450), цитозоль, обогащенную ферментами второй фазы (трансферазами), или фракцию S9, содержащую полный набор метаболических ферментов I и II фаз биотрансформации ксенобиотиков [5, 12, 13]. Однако биохимические методы имеют ряд недостатков, среди которых можно отметить низкую производительность, высокую трудозатратность, сложность выделения индивидуальных метаболитов из биологических матриц и другие.

В связи с этим в последнее время активно развиваются альтернативные подходы к моделированию метаболизма на основе неферментативных инструментальных методов, не требующих использования биологических матриц, что позволяет существенно сократить время и затраты на исследование [14]. Чаще всего для этого используют такие методы, как электрохимическое окисление (ЭХО) [15] или фотокаталитическое окисление (ФКО) [16].

В методе ЭХО окисление ксенобиотиков проводят в электрохимическом реакторе, где окислителем выступают активные формы кислорода [17, 18]. Сопряжение электрохимической ячейки с масс-спектрометром [19] или хромато-масс-спектрометром [20] позволяет регистрировать продукты ЭХО в режиме реального времени. Этот способ позволяет моделировать не только первую, но и вторую фазу метаболизма, если после ЭХО проводят обработку улавливающими агентами, такими как GSH или цистеин [21]. Как показано на примере N-деалкилирования имипрамина и диазепама в исследовании Shono T. et al. [22], применение ЭХО обеспечивает больший выход метаболитов по сравнению с микросомальной фракцией.

В другом методе моделирования метаболизма ФКО, реакции окисления ксенобиотиков инициируются под действием светового излучения в присутствии катализаторов [23]. Диоксид титана ( $\text{TiO}_2$ ) является одним из наиболее активно используемых фотокатализаторов благодаря своим оптическим и фотохимическим свойствам, а также низкой стоимости [24]. Кроме того, в работе Ruokolainen M. et al. [25] было показано, что индуцированное ультрафиолетовым излучением фотокаталитическое окисление в суспензии диоксида титана ( $\text{УФ/TiO}_2$ -ФКО) позволяет воспроизводить больше реакций первой фазы метаболизма, происходящих в микросомах печени человека, чем при использовании ЭХО или реакции Фентона.

Несмотря на развитие новых подходов к моделированию биотрансформации ксенобиотиков, исследование метаболизма в каждом новом случае, тем не менее представляет сложную и трудоемкую задачу. В связи с этим разработка более простой и эффективной методики получения и идентификации метаболитов ксенобиотиков является актуальной.

Цель исследования — разработка новой методики моделирования процессов биотрансформации ксенобиотиков *in vitro* для выявления потенциальных метаболитов индапамида.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Электрохимическое окисление индапамида и получение аддуктов с глутатионом

При разработке методики ЭХО ИГМ опирались на данные, полученные в работе [26], с использованием аналогичной системы для ЭХО. В пробирку объемом 15 мл помещали 10 мг субстанции ИГМ (analytical standard; Merck, Германия) и добавляли 10 мл метанола (HPLC grade; Merck, Германия), после чего интенсивно перемешивали с помощью перемешивающего устройства типа «вортекс» BR-2000 Vortexer (Bio-Rad, США) до растворения субстанции. Для получения рабочего раствора ИГМ стоковый раствор (1 мг/мл в метаноле) разбавляли 75% (об./об.) водным ацетонитрилом (HPLC grade; Merck, Германия) с добавлением формиата аммония (10 mM; pH 7,4; чистота 97%; Merck, Германия) до концентрации 50 мкг/мл.

Трехэлектродную электрохимическую ячейку  $\mu$ -PrepCell™ (объем 0,7 мкл, слой электролита 50 мкм, рабочий электрод — Glassy carbon) в составе ROXY™ EC system (Antec, Нидерланды) предварительно промывали 5 мл дистиллированной воды с помощью автоматического шприцевого насоса Harvard (702212B, Harvard Apparatus, США) со скоростью потока 100 мкл/мин. После этого через ячейку пропускали 5 мл 50% (об./об.) водного раствора ацетонитрила со скоростью потока 100 мкл/мин.

Для проведения ЭХО через ячейку пропускали 100 мкл рабочего раствора ИГМ со скоростью 15 мкл/мин. Электролиз проводили при 37 °C и постоянном напряжении 2,4 В. Продукты окисления ИГМ собирали в микропробирку, раствор метаболитов разбавляли пятикратно деионизованной водой и помещали в вials для последующего ВЭЖХ-МС/МС анализа.

При исследовании аддуктов с GSH (чистота >98%; Merck, Германия) раствор, прошедший через электрохимическую ячейку, собирали в пробирку, содержащую 100 мкл водного раствора GSH (1 мг/мл), и инкубировали в течение часа при температуре 37 °C. Затем полученную смесь с GSH разбавляли в 25 раз деионизованной водой и переносили в вials для последующего анализа методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС).

### Индукцированное ультрафиолетовым излучением фотокаталитическое окисление индапамида в присутствии наночастиц диоксида титана в микропробирке и получение аддуктов с глутатионом

При разработке методики  $\text{УФ/TiO}_2$ -ФКО ИГМ опирались на ранее предложенный подход, описанный в работе [27]. В пробирку объемом 1,5 мл помещали 10 мг субстанции ИГМ и добавляли 1 мл метанола, после чего интенсивно перемешивали с помощью перемешивающего устройства типа «вортекс» BR-2000 Vortexer до растворения субстанции. Для получения рабочего раствора стоковый раствор ИГМ (10 мг/мл в метаноле) разбавляли деионизованной водой до концентрации 1 мг/мл.

В микропробирку объемом 2 мл добавляли 10 мг наночастиц диоксида титана  $\text{TiO}_2$  (соотношение полиморфных модификаций анатаз: рутил = 80/20; «Плазмотерм», Россия) и 2 мл деионизованной воды. После чего помещали суспензию в ультразвуковую ванну на 10 мин.

Полученную суспензию (5 мг/мл) использовали сразу после приготовления.

В микропробирку объемом 0,2 мл добавляли 12,5 мкл раствора ИПМ (1 мг/мл в 10% (об./об.) водном метаноле), 12,5 мкл суспензии  $\text{TiO}_2$  (5 мг/мл), 150 мкл деионизованной воды. Затем открытую микропробирку помещали в пластиковый держатель и накрывали изготовленной в лаборатории панелью для ультрафиолетового облучения (светодиоды BL-L522VC ( $\lambda_{\text{max}} = 405$  нм; Betlux Electronics, Китай), закрепленные на непроводящей подложке), выдерживали в течение 30 мин. При поиске аддуктов с GSH после завершения облучения к суспензии добавляли 5 мкл водного раствора GSH (5 мг/мл) и инкубировали в течение часа при температуре 37 °C.

Для очистки от  $\text{TiO}_2$  использовали центрифужные фильтры Costar® Spin-X® (размер пор — 0,22 мкм, нейлоновая мембрана; Corning, США). В фильтр добавляли 150 мкл суспензии с продуктами окисления ИПМ и 150 мкл деионизованной воды, после чего центрифугировали в течение 5 мин при 10 000 г с использованием центрифуги MiniSpin (Eppendorf, Германия). Фильтрат переносили в другую микропробирку, а к использованному фильтру добавляли 300 мкл ацетонитрила с 0,1% (об./об.) муравьиной кислотой (чистота 98%; Merck, Германия) и снова центрифугировали в течение 5 мин при 10 000 г. Данный фильтрат объединяли с полученным ранее и упаривали с помощью центрифужного испарителя SpeedVac (Eppendorf, Германия). К осадку добавляли 5% (об./об.) водный ацетонитрил с 0,1% (об./об.) муравьиной кислотой до итоговой концентрации GSH 20 мкг/мл, полученный раствор затем помещали в вialу для последующего ВЭЖХ-МС/МС анализа.

#### **Индucedированное ультрафиолетовым излучением фотокаталитическое окисление индапамида в присутствии наночастиц диоксида титана и получение аддуктов с глутатионом на поверхности МАЛДИ-мишени**

В качестве подложки использовали полированную МАЛДИ-мишень из нержавеющей стали. На поверхность ячеек МАЛДИ-мишени наносили по 2 мкл суспензии  $\text{TiO}_2$  (2 мг/мл) и высушивали при комнатной температуре.

На ячейки мишени, функционализированные  $\text{TiO}_2$ , наносили:

- 10 мкл деионизованной воды (контроль);
- 9 мкл деионизованной воды и 1 мкл водного раствора GSH (100 мкг/мл) (контроль);
- 7 мкл деионизованной воды, 2 мкл раствора ИПМ (50 мкг/мл) и 1 мкл раствора GSH (100 мкг/мл) (определение аддуктов GSH с продуктами окисления).

Мишень с нанесенными образцами накрывали ранее описанной панелью для ультрафиолетового облучения и облучали в течение 30 мин. После завершения облучения отбирали по 1 мкл из каждой капли и переносили на соседнюю ячейку, после чего добавляли 1 мкл раствора (20 мг/мл в 80% (об./об.) водном ацетонитриле с 0,1% (об./об.) трифторуксусной кислотой (чистота 99%; Merck, Германия)) матрицы 2,5-дигироксibenзойной кислоты (DHB; Bruker Daltonik GmbH, Германия). Мишень высушивали при комнатной температуре перед анализом методом МАЛДИ масс-спектрометрии.

#### **Анализ продуктов окисления индапамида и их аддуктов с глутатионом методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией**

Для проведения ВЭЖХ-МС/МС анализа использовали аналитическую систему, состоящую из жидкостного хроматографа Agilent 1290 Infinity (Agilent Technologies, США) и масс-спектрометра типа «ионная ловушка» AmaZon ETD (Bruker Daltonik GmbH, Германия) с источником ионов с ионизацией электрораспылением. Экспериментальные данные регистрировали и обрабатывали с помощью программного пакета DataAnalysis 5.0 (Bruker Daltonik GmbH, Германия).

Хроматографическое разделение осуществляли при следующих условиях: колонка — ZORBAX Eclipse Plus C18 Rapid Resolution High Definition (2,1×150 мм, 1,8 мкм; Agilent Technologies, США); температура колонки 40 °C; скорость потока подвижной фазы 200 мкл/мин; объем вводимой пробы 5 мкл; фаза А — 0,1% (об./об.) водный раствор муравьиной кислоты; фаза Б — 0,1% (об./об.) раствор муравьиной кислоты в 90% (об./об.) водном ацетонитриле; режим элюирования — градиентный: 5% Б (0–2 мин), 5–60% Б (2–30 мин), 60% Б (30–31 мин), 60–5% Б (31–32 мин), 5% Б (32–37 мин).

Масс-спектрометрический анализ осуществляли при следующих условиях работы масс-спектрометра: напряжение на капилляре 4,5 кВ; давление небулайзера 2,2 бар; осушающий газ — азот; скорость потока осушающего газа 9 л/мин; температура осушающего газа 280 °C; режим работы — Auto MS/MS; режим сканирования — Auto MS/MS; диапазон  $m/z$  100–1000; скользящая средняя — отключена; частота спектров 4 Гц; тип фрагментации — диссоциация, активированная соударениями; газ для соударений — гелий; число ионов-предшественников — 3; окно изоляции иона-предшественника — 3,5  $m/z$ . Метаболиты ИПМ анализировали в режиме регистрации отрицательных ионов, а аддукты с GSH — в режиме регистрации положительных ионов. Калибровку масс-спектрометра проводили с использованием 1 mM раствора формиата натрия (чистота 97%; Merck, Германия) в 90% (об./об.) водном изопропанолe (HPLC grade; Merck, Германия).

#### **МАЛДИ масс-спектрометрический анализ**

Масс-спектрометрический анализ реактивных метаболитов ИПМ и их аддуктов с GSH проводили с помощью tandemного времяпролетного масс-спектрометра UltrafleXtreme (Bruker Daltonik GmbH, Германия), оснащенного Nd:YAG лазером ( $\lambda = 355$  нм), на базе ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Научного парка СПбГУ.

Регистрацию масс-спектров осуществляли в режиме рефлектор с детектированием положительных ионов при следующих параметрах работы масс-спектрометра: диапазон  $m/z$  — 300–1100; напряжение на первом источнике 19,0 кВ; напряжение на втором источнике 16,8 кВ; напряжение на линзах 7,0 кВ; напряжение на первом отражателе 20,5 кВ; напряжение на втором отражателе 10,5 кВ; задержка импульсной экстракции ионов 90 нс. Для получения одного спектра было использовано 10 000 актов облучения образца лазером при мощности лазера 60% и частоте облучения 2000 Гц. Для регистрации

и интерпретации масс-спектров были использованы программные продукты Flex Control и Flex Analysis (Bruker Daltonik GmbH, Германия).

Тандемный масс-спектрометрический анализ проводили в режиме индуцированной лазером диссоциации при следующих параметрах работы масс-спектрометра: окно селектора иона-предшественника 2 m/z; напряжение на первом источнике 7,6 кВ; напряжение на втором источнике 6,9 кВ; напряжение на линзах 3,5 кВ; напряжение на первом отражателе 29,4 кВ; напряжение на втором отражателе 14,1 кВ; LIFT 1 (19,0 кВ); LIFT 2 (3,2 кВ); задержка импульсной экстракции ионов 90 нс.

Калибровку масс-спектрометра осуществляли с использованием калибровочной смеси Peptide calibration standard II (Bruker Daltonik GmbH, Германия).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе изучения метаболизма ИГМ было проведено сравнение двух наиболее распространенных неферментативных подходов для получения продуктов окисления ксенобиотиков *in vitro*: электрохимическое окисление (ЭХО) и УФ-индуцированное фотокаталитическое окисление в присутствии наночастиц диоксида титана (УФ/TiO<sub>2</sub>-ФКО). Согласно литературным данным [28] для ИГМ известно пять метаболитов (M1–M5), каждый из которых способен вступать в реакцию с GSH. Выбор GSH в качестве улавливающего агента обусловлен его важной ролью в метаболизме ксенобиотиков в организме человека (является одной из основных биомолекул, участвующих в связывании реактивных продуктов метаболизма ксенобиотиков), а также его способностью вступать в реакции конъюгации с молекулами, в составе которых есть группы хиноидного типа (присутствие таких групп характерно для ряда метаболитов ИГМ).

Схема проведения эксперимента с использованием ЭХО представлена на рисунке 2А.

Окисление осуществляли с использованием электрохимической системы Roxu Exceed, оснащенной электрохимическим реактором  $\mu$ -PrepCell. Часть реакционной смеси затем отбирали для последующего анализа, остальное смешивали с раствором GSH и инкубировали в течение часа при 37 °С.

По результатам ВЭЖХ-МС/МС анализа было выявлено наличие 3 известных метаболитов ИГМ (M1, M4, M5), а также 2 метаболитов с m/z 381,93 (ПМ2) и m/z 429,96 (ПМ6), которые в литературе ранее описаны не были; соответствующие данные представлены на рисунке 3А. Кроме того, ВЭЖХ-МС/МС анализ инкубационной смеси продуктов окисления ИГМ и GSH позволил обнаружить 3 сигнала, которые по наличию изотопного распределения, характерного для соединений, содержащих в своем составе атом хлора, и результатам тандемного масс-спектрометрического анализа были отнесены к аддуктам GSH с 2 известными (M2, M4) и 1 необнаруженным (ПМ7) метаболитами ИГМ; соответствующие данные представлены на рисунке 3Б. Сведения об обнаруженных продуктах ЭХО ИГМ, а также аддуктах с GSH представлены в таблице 1.

Таким образом, метод ЭХО позволяет получать метаболиты ИГМ, однако обладает рядом недостатков:

- невозможность одновременного проведения нескольких экспериментов;
- необходимость очистки электрохимической ячейки после каждого использования;
- большой расход реактивов и исследуемых ксенобиотиков.

Учитывая вышеперечисленное, констатировали, что моделирование метаболизма ксенобиотиков методом ЭХО является длительным и затратным.

На следующем этапе исследования нами были смоделированы процессы метаболизма ИГМ методом УФ/TiO<sub>2</sub>-ФКО. Схема проведения УФ/TiO<sub>2</sub>-ФКО приведена на рисунке 2Б. На первом этапе осуществлялось облучение УФ-излучением пробирки с инкубационной смесью

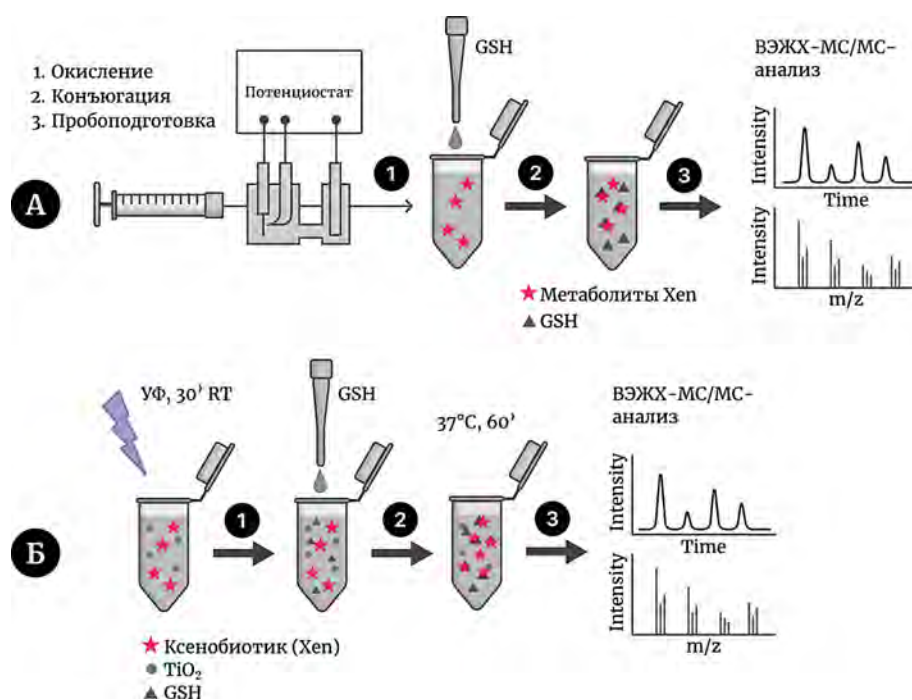


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

**Рис. 2.** Алгоритм получения продуктов окисления ксенобиотика методом ЭХО (А) или УФ/TiO<sub>2</sub>-ФКО (Б) с последующей конъюгацией с GSH и ВЭЖХ-МС/МС анализом (на примере ИГМ)

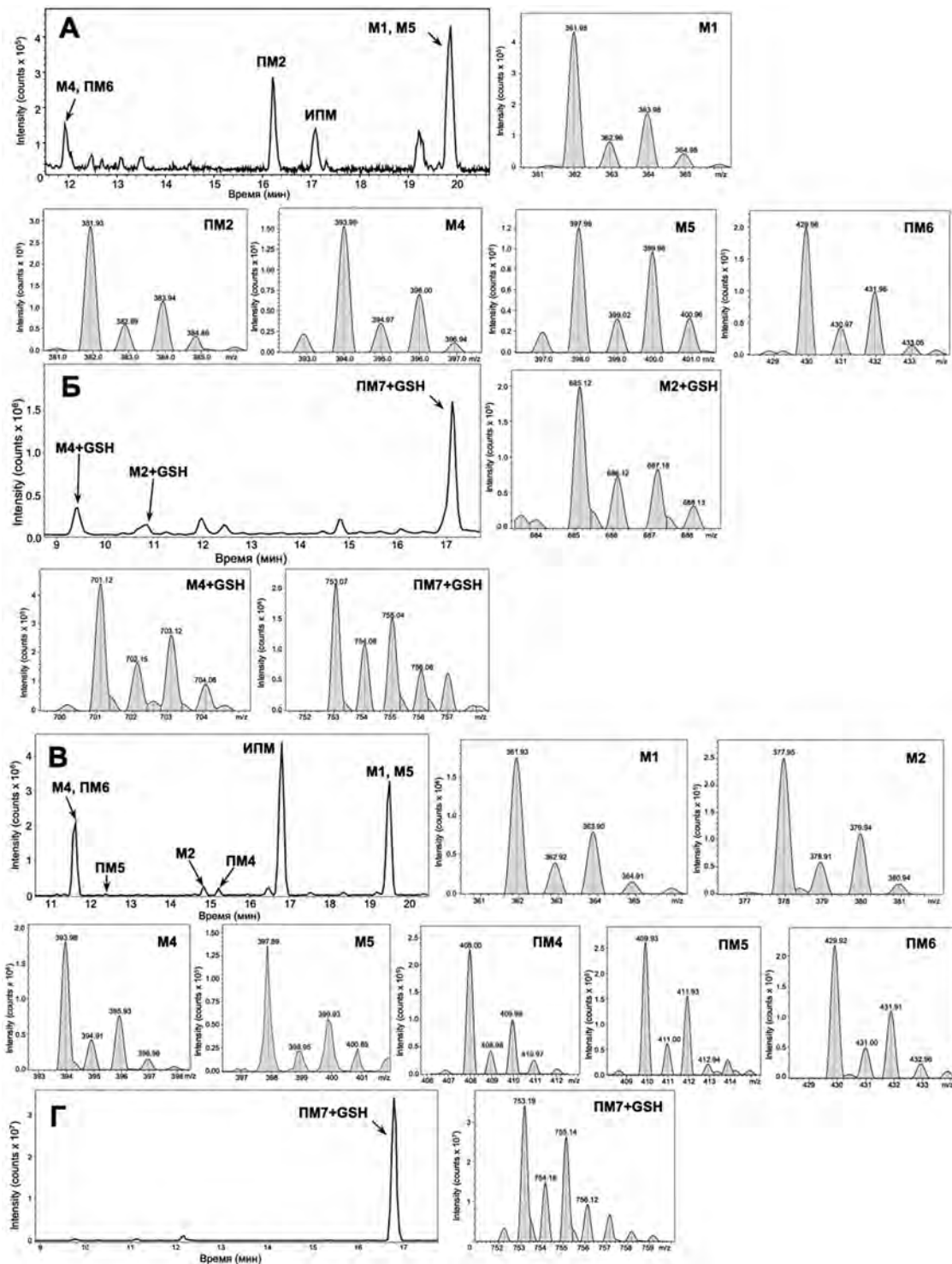


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

**Рис. 3.** Масс-хроматограммы метаболитов ИПМ, полученных методом ЭХО (А), и их аддуктов с GSH (Б), а также полученных методом УФ/ТiO<sub>2</sub>-ФКО (В) и их аддуктов с GSH (Г)

**Примечание:** на рисунке представлены фрагменты масс-спектров с указанием обнаруженных метаболитов ИПМ и их аддуктов с GSH.

(водная суспензия наночастиц TiO<sub>2</sub>, содержащая ИПМ), после завершения облучения в пробирку добавляли GSH и осуществляли процедуру конъюгации улавливающего агента с продуктами УФ/TiO<sub>2</sub>-ФКО ИПМ. Этапы окисления и конъюгации длятся в сумме 90 мин, как и в случае ЭХО. Однако преимуществом УФ/TiO<sub>2</sub>-ФКО является возможность параллельного проведения нескольких экспериментов, что значительно экономит время при подборе условий окисления. В целом по сравнению с ЭХО метод

УФ/TiO<sub>2</sub>-ФКО является более экономичным с точки зрения расходов как реактивов, так и исследуемых веществ. Однако при этом для дальнейшего проведения ВЭЖХ-МС/МС анализа возникает необходимость проведения пробоподготовки, включающей удаление частиц диоксида титана во избежание их попадания в хроматографическую систему.

По результатам ВЭЖХ-МС/МС анализа продуктов УФ/TiO<sub>2</sub>-ФКО ИПМ (рис. 3В) было установлено образование

Таблица 1. Молекулярные массы и вероятные структуры метаболитов ИПМ и их m/z аддуктов с GSH, обнаруженных тремя способами

| Метаболит | Структурная формула | Методы моделирования биотрансформации |                                      |                                   |                                      |                                      |
|-----------|---------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
|           |                     | ЭХО                                   |                                      | УФ/TiO <sub>2</sub> -ФКО          |                                      | УФ/TiO <sub>2</sub> -ФКО/ММ          |
|           |                     | m/z метаболита [M-H] <sup>-</sup>     | m/z аддукта с GSH [M+H] <sup>+</sup> | m/z метаболита [M-H] <sup>-</sup> | m/z аддукта с GSH [M+H] <sup>+</sup> | m/z аддукта с GSH [M+H] <sup>+</sup> |
| M1        |                     | 361,98                                | -                                    | 361,93                            | -                                    | 669,10<br>671,10                     |
| M2        |                     | (378)                                 | 685,12                               | 377,95                            | -                                    | 685,09                               |
| M3        |                     | (380)                                 | -                                    | -                                 | -                                    | 687,11                               |
| M4        |                     | 393,99                                | 701,12                               | 393,98                            | -                                    | 701,09                               |
| M5        |                     | 397,96                                | -                                    | 397,89                            | -                                    | 705,09                               |
| ПМ1       |                     | -                                     | -                                    | -                                 | -                                    | 657,09                               |
| ПМ2       |                     | 381,93                                | -                                    | -                                 | -                                    | -                                    |
| ПМ3       |                     | -                                     | -                                    | -                                 | -                                    | 703,10                               |
| ПМ4       |                     | -                                     | -                                    | 408,00                            | -                                    | -                                    |
| ПМ5       |                     | -                                     | -                                    | 409,93                            | -                                    | -                                    |
| ПМ6       |                     | 429,96                                | -                                    | 429,92                            | -                                    | -                                    |
| ПМ7       |                     | -                                     | 753,07                               | -                                 | 753,19                               | -                                    |

Таблица составлена авторами по собственным данным

**Примечание:** в скобках приведены значения m/z метаболитов, описанных в литературе, но не обнаруженных в рамках выполненных экспериментов; УФ/TiO<sub>2</sub>-ФКО/ММ — УФ/TiO<sub>2</sub>-ФКО на МАЛДИ-мишени.

4 известных метаболитов ИПМ (M1, M2, M4, M5), а также 3 ранее не описанных метаболитов с  $m/z$  408,00 (ПМ4),  $m/z$  409,93 (ПМ5) и  $m/z$  429,92 (ПМ6). Следует отметить, что метаболит M2, как и предполагаемые метаболиты ПМ4 и ПМ5, не был обнаружен при использовании метода ЭХО.

При анализе продуктов взаимодействия GSH с метаболитами ИПМ был зафиксирован только один сигнал, который по наличию характерного изотопного распределения и результатам tandemного масс-спектрометрического анализа был отнесен к аддукту GSH с потенциальным метаболитом ПМ7 (рис. 3Г). ПМ7-GSH стал единственным обнаруженным аддуктом, в то время как методом ЭХО было идентифицировано 3 аддукта.

Результаты, полученные методами ЭХО и УФ/ $\text{TiO}_2$ -ФКО для ИПМ, в целом сопоставимы, но оба метода имеют ряд недостатков, которые делают их весьма трудоемкими и времязатратными. Можно сформулировать ряд сложностей, которые должны быть решены при разработке более производительной методики скрининга реактивных метаболитов ксенобиотиков:

1. Времязатратность. Большая часть времени уходит на проведение конъюгации (1 час) и ВЭЖХ-МС анализа (~40 мин).

2. Трудозатратность. Удаление частиц  $\text{TiO}_2$  при УФ/ $\text{TiO}_2$ -ФКО или промывка электрохимической ячейки после каждого ксенобиотика.

3. Поэтапное проведение окисления и конъюгации может приводить к потере короткоживущих метаболитов.

4. Возможности параллельного проведения нескольких экспериментов ограничены.

5. Большой расход реактивов и исследуемых веществ.

Дальнейшая работа была направлена на разработку методики моделирования метаболизма ИПМ, в которой перечисленные недостатки были бы устранены или значительно уменьшены.

Среди методов определения метаболитов ксенобиотиков и их аддуктов широкое применение получила масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ). Данный метод отличается экспрессностью и высокой производительностью, так как процедура анализа включает в себя стадию нанесения всех необходимых образцов на одну твердую подложку (мишень) с последующей регистрацией сигналов аналитов без дополнительной пробоподготовки.

Мы установили, что если на ячейку МАЛДИ-мишени, функционализированную  $\text{TiO}_2$ , нанести ксенобиотик с добавкой улавливающего агента (GSH), то образующиеся в ходе проведения УФ/ $\text{TiO}_2$ -ФКО реактивные метаболиты могут *in situ* связываться с тиольной группой пептида, и последующий МС анализ позволяет детектировать короткоживущие продукты окисления в форме аддуктов.

Исходя из этого был предложен алгоритм проведения УФ/ $\text{TiO}_2$ -ФКО ИПМ на МАЛДИ-мишени (УФ/ $\text{TiO}_2$ -ФКО/ММ), представленный на рисунке 4.

Для выбора оптимального времени окисления проводили поиск аддуктов после 1, 5, 10, 20 и 30 мин УФ-облучения. Полученные масс-спектры представлены на рисунке 5.

Из результатов масс-спектрометрического анализа следует, что после 5 мин облучения сигналы аддуктов GSH с метаболитами ИПМ еще не обнаруживаются. На 10 мин УФ/ $\text{TiO}_2$ -ФКО были зафиксированы три сигнала, один из которых ( $m/z$  687,12) принадлежит продукту

конъюгации GSH с известным метаболитом ИПМ (M3), а другой ( $m/z$  703,11) можно отнести к аддукту GSH с ранее не изученным продуктом метаболизма ИПМ (ПМ3). Для образцов, отобранных после 20 мин облучения, в масс-спектрах наблюдался рост интенсивности вышеуказанных сигналов.

Наиболее полную информацию об аддуктах GSH с метаболитами ИПМ предоставлял масс-спектр, соответствующий выдерживанию образцов под УФ-облучением в течение 30 мин. Помимо идентифицированных ранее продуктов конъюгации, были обнаружены сигналы со значениями  $m/z$  669,10, 685,09, 701,09 и 705,10, соответствующие аддуктам с известными метаболитами ИПМ (M1, M2, M4, M5), а также сигнал с  $m/z$  657,09, принадлежащий аддукту с потенциальным метаболитом ПМ1. Сведения о выявленных аддуктах представлены в таблице 1. Следует отметить, что наибольшее внимание с точки зрения опасности для организма заслуживают, с нашей точки зрения, метаболиты M3, ПМ1 и ПМ3, которые регистрируются только в виде аддуктов с GSH, причем только методом УФ/ $\text{TiO}_2$ -ФКО/ММ в условиях конъюгации *in situ*, что свидетельствует об их высокой реакционной способности.

В отличие от методик ЭХО и УФ/ $\text{TiO}_2$ -ФКО, в этом случае в масс-спектрах было обнаружено значительное количество сигналов, отнесенных к аддуктам GSH с продуктами окисления ИПМ, как показано на диаграмме (рис. 6), что позволяет сделать вывод о перспективности предложенного подхода.

В совокупности тремя методами для ИПМ было идентифицировано по 4 ранее не изученных метаболита ( $m/z$

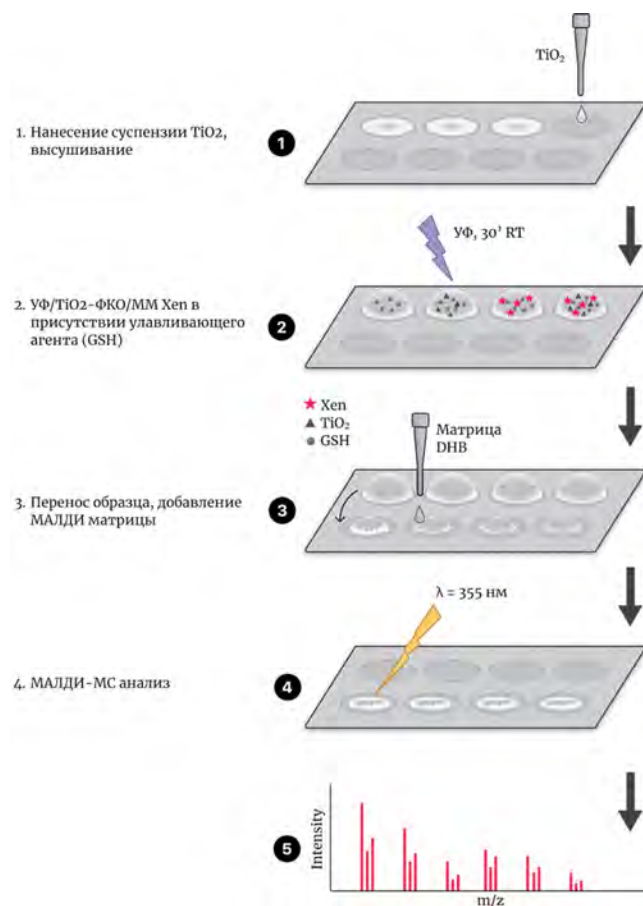


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

**Рис. 4.** Алгоритм получения метаболитов ИПМ и их аддуктов с GSH методом УФ/ $\text{TiO}_2$ -ФКО/ММ

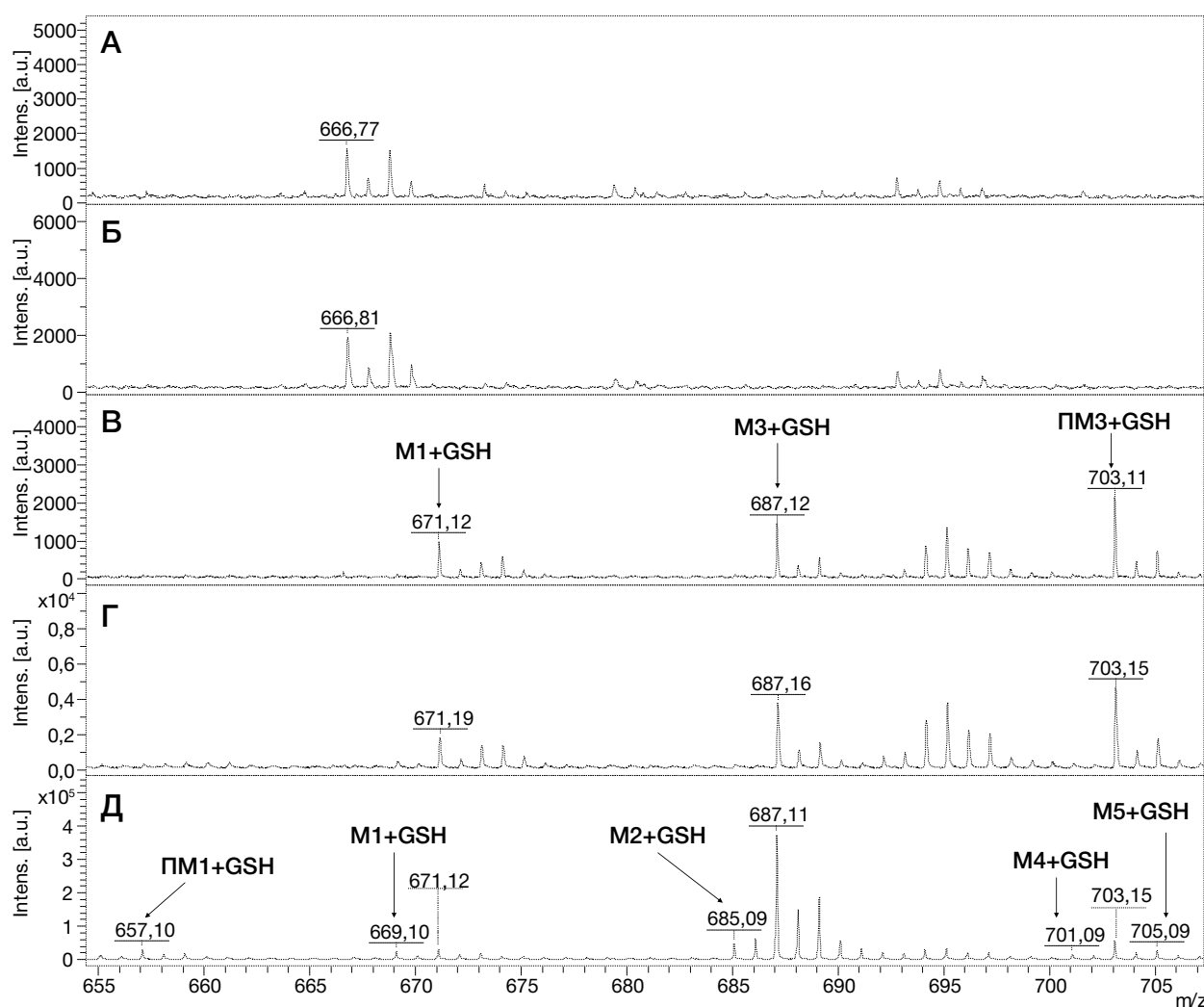


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

**Рис. 5.** МАЛДИ масс-спектры аддуктов GSH с метаболитами ИПМ при проведении УФ/TiO<sub>2</sub>-ФКО/ММ при УФ-облучении инкубационной смеси в течение 0 мин (А), 5 мин (Б), 10 мин (В), 20 мин (Г), 30 мин (Д)

[M-H]<sup>-</sup>: 381,93; 408,00; 409,93; 429,96) и аддукта с GSH (m/z [M+H]<sup>+</sup>: 657,09; 671,10; 703,10; 753,19).

Следует отметить, что рассмотренные в работе неферментативные методы моделирования биотрансформации ксенобиотиков (ЭХО, УФ/TiO<sub>2</sub>-ФКО) не могут выступать в качестве полноценной альтернативы классическим

биологическим системам (микросомальная или S9 фракции печени, первичные гепатоциты и др.), так как каждый из методов не может полностью воспроизвести полный набор ферментативных реакций, происходящих в ходе первой фазы метаболизма. В то же время данные инструментальные подходы позволяют быстро и относительно дешево получать продукты окисления в чистом растворе без необходимости трудоемкого процесса очистки от биологической матрицы, что особенно актуально при проведении скрининговых исследований потенциальной токсичности ксенобиотика

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения работы было проведено исследование потенциальных метаболитов ИПМ, полученных с помощью таких неферментативных методов моделирования процессов первой фазы биотрансформации ксенобиотиков, как ЭХО и УФ/TiO<sub>2</sub>-ФКО в объеме. Моделирование второй фазы метаболизма осуществлялось путем инкубации продуктов окисления индапамида с улавливающим агентом (GSH).

По результатам ВЭЖХ-МС/МС анализа метаболитов и их конъюгатов с GSH в случае ЭХО было обнаружено

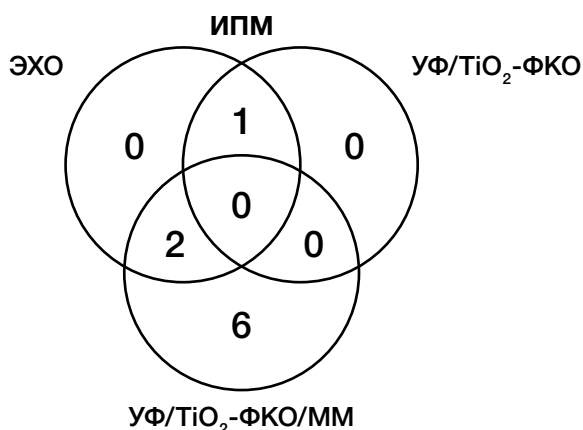


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

**Рис. 6.** Численное сопоставление обнаруженных аддуктов GSH с продуктами окисления ИПМ, полученных тремя различными методами

5 метаболитов и 3 аддукта с GSH, а при использовании УФ/TiO<sub>2</sub>-ФКО в объеме было обнаружено 7 метаболитов и 1 аддукт с GSH. Кроме того, была разработана новая методика *in vitro* выявления реактивных метаболитов ксенобиотиков, основанная на проведении УФ/TiO<sub>2</sub>-ФКО в присутствии улавливающего агента (GSH) на поверхности МАЛДИ-мишени, функционализированной диоксидом титана, с последующим МАЛДИ

масс-спектрометрическим анализом продуктов окисления и их конъюгатов. Продемонстрировано, что разработанная методика выявления реактивных метаболитов ксенобиотиков в случае ИГПМ превосходит общепринятые подходы как по производительности, так и по информативности, позволяя обнаруживать большее число потенциально опасных метаболитов (обнаружено 8 аддуктов с глутатионом).

## Литература / References

1. Wojnarowska Z, Grzybowska K, Hawelek L, Dulski M, Wrzalik R, Gruszka I et al. Molecular dynamics, physical stability and solubility advantage from amorphous indapamide drug. *Mol Pharm*. 2013;10(10):3612–27. <https://doi.org/10.1021/mp400116g>
2. Sanz-Muñoz C, Martínez-Morán C, Torrero-Antón MV, Miranda-Romero A. Indapamide-Associated Stevens-Johnson Syndrome. *Actas Dermosifiliogr*. 2008;99(4):321–2.
3. Mourad SS, Barary MA, El-Yazbi AF. Sensitive “release-on-demand” fluorescent genosensors for probing DNA damage induced by commonly used cardiovascular drugs: Comparative study. *Int J Biol Macromol*. 2024;269(1):131821. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.131821>
4. Rutherford T, Sinclair R. Photo-onycholysis due to indapamide. *Australas J Dermatol*. 2007;48(1):35–6.
5. Liu L, Cui H, Huang Y, Hao Y, Zhou Y, Wan Y. Molecular docking and *in vitro* evaluations reveal the role of human cytochrome P450 3A4 in the cross-coupling metabolism of phenolic xenobiotics. *Environ Res*. 2023;220:115256. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.115256>
6. Shang J, Coe KJ, Lim HK, Chen L, Khatri BB, Salter R et al. Application of Covalent Binding Body Burden in the HuREL Human Hepatocyte Coculture Model for Reactivity Risk Assessment of Metabolically Low Turnover Drugs. *Chem Res Toxicol*. 2024;37(4):540–4. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.4c00046>
7. Norman BH. Drug Induced Liver Injury (DILI). Mechanisms and Medicinal Chemistry Avoidance/Mitigation Strategies. *J Med Chem*. 2020;63(20):11397–419. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00524>
8. Савельева ЕИ, Корягина НЛ, Орлова ОИ. Определение аддуктов отравляющих веществ с биомолекулами как биомаркеров экспозиции/эффекта. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2018;20(3):451–63. Savelyeva EI, Koryagina NL, Orlova OI. Determination of toxic substances adducts with biomolecules as biomarkers of the exposure/effect. *Medicine of Extreme Situations*. 2018;20(3):451–63 (In Russ). EDN: YPHKSL
9. Gasmi A, Nasreen A, Lenchyk L, Lysiuk R, Peana M, Shapovalova N et al. An Update on Glutathione's Biosynthesis, Metabolism, Functions, and Medicinal Purposes. *Curr Med Chem*. 2024;31(29):4579–601. <https://doi.org/10.2174/0109298673251025230919105818>
10. Gupta PK. *Fundamentals of Toxicology: Essential Concepts and Applications*. New York: Academic Press; 2016.
11. Pognan F, Beilmann M, Boonen HCM, Czich A, Dear G, Hewitt P et al. The evolving role of investigative toxicology in the pharmaceutical industry. *Nat Rev Drug Discov*. 2023;22(4):317–35. <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00633-x>
12. Medina D, Omanakuttan B, Nguyen R, Alwarsh E, Walgama C. Electrochemical Probing of Human Liver Subcellular S9 Fractions for Drug Metabolite Synthesis. *Metabolites*. 2024;14(8):429. <https://doi.org/10.3390/metabo14080429>
13. Peeters L, Vervliet P, Foubert K, Hermans N, Pieters L, Covaci A. A comparative study on the *in vitro* biotransformation of medicagenic acid using human liver microsomes and S9 fractions. *Chem Biol Interact*. 2020;328:109192. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109192>
14. Sun H, Scott DO. Structure-based Drug Metabolism Predictions for Drug Design. *Chem Biol Drug Des*. 2010;7(5):3–17. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2009.00899.x>
15. Faber H, Vogel M, Karst U. Electrochemistry/mass spectrometry as a tool in metabolism studies. *Anal Chim Acta*. 2014;8(34):9–21. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.05.017>
16. Gawlik M, Skibiński R, Trawiński J, Komsta Ł. Photocatalysis combined with chromatographic methods as a new promising tool in drug metabolism studies. *Acta Chromatogr*. 2018;30(1):1–8. <https://doi.org/10.1556/1326.2016.00202>
17. Álvarez-Lueje A, Pérez M, Zapata C. Electrochemical Methods for the *In Vitro* Assessment of Drug Metabolism. *Topics on Drug Metabolism*. *InTech*. 2012; <https://doi.org/10.5772/28647>
18. Nikzad N, Rafiee M. Electrochemical study of drug metabolism. *Curr Opin Electrochem*. 2024;44:101446. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2024.101446>
19. Mielczarek P, Smoluch M, Kotlińska JH, Labuz K, Gotszalk T, Babij M et al. Electrochemical generation of selegiline metabolites coupled to mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2015;1389:96–103. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.02.049>
20. Lohmann W, Hayen H, Karst U. Covalent protein modification by reactive drug metabolites using online electrochemistry/liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem*. 2008;80:9714–9. <https://doi.org/10.1021/ac801699g>
21. Bussy U, Chung-Davidson YW, Li K, Li W. Phase I and phase II reductive metabolism simulation of nitro aromatic xenobiotics with electrochemistry coupled with high resolution mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2014;406(28):7253–60. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8171-3>
22. Shono T, Toda T, Oshino N. Preparation of N-dealkylated drug metabolites by electrochemical simulation of biotransformation. *Drug Metab Dispos*. 1981;9:481–2. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8171-3>
23. Gawlik M, Trawiński J, Skibiński R. Photocatalysis as a tool for *in vitro* drug metabolism simulation: multivariate comparison of twelve metal oxides on a set of twenty model drugs. *Catalysts*. 2020;10:26. <https://doi.org/10.3390/catal10010026>
24. Ruokolainen M, Valkonen M, Sikanen TM, Kotiaho T, Kostianen R. Imitation of phase I oxidative metabolism of anabolic steroids by titanium dioxide photocatalysis. *Eur J Pharm Sci*. 2014;65:45–55. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.08.009>
25. Ruokolainen M, Gul T, Permentier H, Sikanen T, Kostianen R, Kotiaho T. Comparison of TiO<sub>2</sub> photocatalysis, electrochemically assisted Fenton reaction and direct electrochemistry for simulation of phase I metabolism reactions of drugs. *Eur J Pharm Sci*. 2016;83:36–44. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.12.012>
26. Faber H, Melles D, Brauckmann C, Wehe CA, Wentker K, Karst U. Simulation of the oxidative metabolism of diclofenac by electrochemistry/liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2012;403:345–54. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5665-0>
27. Gladchuk AS, Gorbunov AY, Keltsieva OA, Ilyushonok SK, Babakov VN, Shilovskikh VV et al. Coating of a MALDI target with metal oxide nanoparticles by droplet-free electrospraying — a versatile tool for *in situ* enrichment of human globin adducts of halogen-containing drug metabolites. *Microchem J*. 2023;191:108708. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.108708>

28. Sun H, Moore C, Dansette PM, Kumar S, Halpert JR, Yost GS. Dehydrogenation of the indoline-containing drug 4-chloro-N-(2-methyl-1-indoliny)-3-sulfamoylbenzamide (indapamide)

by CYP3A4: correlation with in silico predictions. *Drug Metab Dispos.* 2009;37(3):672–84.  
<https://doi.org/10.1124/dmd.108.022707>

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: О.А. Кельцьева — ВЭЖХ-МС анализ; А.А. Афанасьева — отработка методики фотокаталитического окисления-конъюгации индапамида на МАЛДИ-мишени; С.К. Ильюшонок — отработка методики электрохимического окисления индапамида; А.С. Гладчук — оформление и подготовка материала к печати; А.Н. Арсеньев — отработка методики фотокаталитического окисления-конъюгации индапамида в микропробирке; А.С. Фролов — общее руководство исследованием; В.Н. Бабаков — сбор и анализ литературных данных; К.А. Краснов — интерпретация масс-спектров и определение структуры вероятных метаболитов индапамида; Е.П. Подольская — научный замысел и план исследования.

## ОБ АВТОРАХ

**Кельцьева Ольга Александровна**  
<https://orcid.org/0000-0002-4069-0355>  
[keltcieva@gmail.com](mailto:keltcieva@gmail.com)

**Афанасьева Анна Андреевна**  
[afanasyeva.a.a.2000@yandex.ru](mailto:afanasyeva.a.a.2000@yandex.ru)

**Ильюшонок Семен Кириллович**  
<https://orcid.org/0000-0003-1672-4583>  
[ilsemen21@mail.ru](mailto:ilsemen21@mail.ru)

**Гладчук Алексей Сергеевич**, канд. техн. наук  
<https://orcid.org/0000-0002-4411-2069>  
[aleglad24@gmail.com](mailto:aleglad24@gmail.com)

**Арсеньев Александр Николаевич**  
[star2361@mail.ru](mailto:star2361@mail.ru)

**Фролов Александр Станиславович**  
[Alexander.S.Frolov@gmail.com](mailto:Alexander.S.Frolov@gmail.com)

**Бабаков Владимир Николаевич**, канд. биол. наук  
[vbabakov@gmail.com](mailto:vbabakov@gmail.com)

**Константин Андреевич Краснов**, д-р хим. наук  
<https://orcid.org/0000-0003-1503-2243>  
[krasnov\\_tox@mail.ru](mailto:krasnov_tox@mail.ru)

**Подольская Екатерина Петровна**, д-р техн. наук  
[ek.podolskaya@gmail.com](mailto:ek.podolskaya@gmail.com)