

УДК 577.175.62:796.071

ПОЛУЧЕНИЕ 6 β -ГИДРОКСИПРОИЗВОДНЫХ АНАБОЛИЧЕСКИХ СТЕРОИДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕКОМБИНАНТНОЙ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ СИСТЕМЫ СУР3А4 ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ДОПИНГ-КОНТРОЛЯ

Бакакина Ю. С.¹, Бабарико Д. В.¹, Ефимович Д. Д.¹, Шкель Т. В.², Свирид А. В.²,
Кисель М. С.², Походня Ю. Г.¹, Гилеп А. А.², Сяхович В. Э.¹

¹Учреждение здравоохранения «Национальная антидопинговая лаборатория»,
аг. Лесной, Республика Беларусь;

²Государственное научное учреждение «Институт биоорганической химии
Национальной академии наук Беларуси»,
г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. Применение спортсменами анаболических андрогенных стероидов (ААС) является наиболее значимой проблемой допинг-контроля. ААС практически полностью метаболизируются в организме человека в результате фазы I и фазы II биотрансформации, в том числе при участии ферментов семейства цитохромов P450 (СУР). Наличие стандартных веществ или сертифицированных референсных образцов метаболитов ААС является обязательным для определения спектра запрещенных препаратов в биологических жидкостях спортсменов. В рамках данной работы был разработан метод получения 6 β -гидроксипроизводных значимых в допинг-контроле ААС с использованием рекомбинантной ферментативной системы СУР3А4 человека и подобраны условия для детекции синтетических ААС и их метаболитов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС).

Ключевые слова: рекомбинантный СУР3А4 человека, синтетические анаболические андрогенные стероиды, метаболиты, жидкостная хромато-масс-спектрометрия.

Введение. Анаболические андрогенные стероиды относятся к группе S1 запрещенного списка веществ Всемирного антидопингового агентства (ВАДА) и находятся под полным запретом применения как в соревновательный, так и внесоревновательный периоды [1]. В связи с этим определение ААС относится к приоритетному направлению в допинг-контроле, а разработка и обновление аналитических подходов для надежного обнаружения их злоупотребления имеет важное значение.

Несмотря на этот факт, а также на принимаемые меры по улучшению методов детек-

ции данных соединений, пропаганду чистого спорта и другие мероприятия ВАДА, количество выявленных положительных проб остается высокой, а данная группа занимает первое место среди всех классов запрещенных веществ (47 % от всех выявленных неблагоприятных аналитических результатов в 2020 г.). В таблице приведены первые 10 позиций неблагоприятных аналитических результатов (*Adverse Analytical Finding*) в группе S1 запрещенного списка веществ ВАДА, выявленных лабораториями, аккредитованными ВАДА, в 2020 г. [2].

Таблица — Неблагоприятные аналитические результаты в группе S1 запрещенного списка веществ ВАДА, выявленных лабораториями, аккредитованными ВАДА

Анаболический стероид	Количество выявленных случаев	Случаи в группе S1, %
1. Станозолол	86	14
2. Оралтуринабол	76	13
3. Дростанолон	62	10
4. Метандиенон	56	9
5. 19-норандростерон	50	8
6. Оксандролон	47	8

Окончание табл. 1

Анаболический стероид	Количество выявленных случаев	Случаи в группе S1, %
7. Тренболон	37	6
8. Болденон	36	6
9. Метенолон	28	5
10. Местеролон	23	4

ААС в большинстве своем практически полностью биотрансформируются в организме человека. ААС метаболизируются в основном в печени, некоторые метаболические реакции также происходят в почках и коже [3]. В результате фазы I и фазы II биотрансформации ААС образуется серия метаболитов.

Одним из требований ВАДА к антидопинговым лабораториям является использование для анализа только стандартных веществ или сертифицированных референсных образцов метаболитов ААС для рассмотрения полученных положительных результатов тестирования. В связи с этим одной из главных особенностей подхода к анализу проб спортсменов на присутствие ААС является необходимость детекции продуктов I или II фазы метаболизма.

Таким образом, для успешного определения спектра запрещенных препаратов, относящихся к списку S1, в биологических жидкостях атлетов необходимо разработать эффективный алгоритм получения стандартных веществ метаболитов таких препаратов.

Ферменты семейства цитохромов P450 (CYP) участвуют в I фазе биотрансформации ААС и катализируют гидроксирование стероидного кольца [4]. Гидроксирование ААС по 6 β -положению с участием CYP3A является одним из главных метаболических путей I фазы биотрансформации стероидов *in vivo*. В связи с этим использование ферментов CYP450 представляет значительный интерес для решения задачи биотехнологического синтеза метаболитов I фазы биотрансформации ААС.

Цель работы — разработка метода получения 6 β -гидроксипроизводных синтетических ААС с использованием рекомбинантной ферментативной системы CYP3A4 человека.

Материалы и методы. Объектом исследования являлось получение 6 β -гидроксипроизводных синтетических ААС с использованием рекомбинантной ферментативной системы CYP3A4 человека.

Получение CYP3A4 человека. Клетки *E. coli* DH5 α трансформировали плазмидой pCW_CYP3A4, несущей последовательность кодирующей ДНК CYP3A4 человека, и культивировали при 26 °С в течение 48 ч с момента

индукции синтеза белка 0,5 мМ изопропил- β -тиогалактопиранозидом (ИПТГ).

Выделение и очистку рекомбинантного белка CYP3A4 проводили при комбинации аффинной и ионообменной хроматографии. Выделение белка проводили на хроматографической колонке с Ni-NTA²⁺-агарозой, а очистку — на колонке с гидроксапатитом в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Окрашенные белковые фракции собирали и хранили при -75 °С.

Получение НАДФН-цитохром P450 редуктазы. Клетки *E. coli* DH5 α трансформировали плазмидой pRatCPR(Lys56Gln), несущей последовательность кодирующей ДНК НАДФН-цитохром P450 редуктазы крысы (Lys56Gln мутант), и культивировали при 26 °С в течение 48 ч с момента индукции синтеза белка 1 мМ ИПТГ.

Выделение и очистку рекомбинантного белка НАДФН-цитохром P450 редуктазы проводили при комбинации аффинной и ионообменной хроматографии. Выделение белка проводили на хроматографической колонке с DEAE-агарозой, а очистку — на колонке с 2,5-АДФ-агарозой в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Белковую фракцию хранили при -75 °С.

Получение микросомального цитохрома b₅ (b₅). Компетентные клетки *E. coli* BL21 (DE3) трансформировали плазмидной ДНК pT7_Mcb5_human, несущей кодирующую ДНК микросомального цитохрома b₅ человека, и культивировали при 37 °С в течение 4 ч с момента индукции синтеза белка 1 мМ ИПТГ.

Процедура выделения микросомального цитохрома b₅ состояла в комбинации аффинной хроматографии и адсорбционной хроматографии смешанного типа.

Поскольку часть цитохрома b₅ человека экспрессируется в апоформе (без гема), необходимо перевести его в холоформу (с гемом). Для этого к супернатанту при постоянном перемешивании добавляли по каплям раствор геминхлорида (50 мг геминхлорида в 1 мл 0,1 Н NaOH) при 4 °С. Титрование геминхлоридом продолжали до достижения максимального значения оптической плотности на

414 нм. Далее проводили выделение белка на хроматографической колонке с DE-52-целлюлозой и очистку — на хроматографической колонке с Ni-NTA²⁺-агарозой, а затем на колонке с гидроксапатитом в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Окрашенные белковые фракции собирали и хранили при -75 °С.

Получение β-гидроксипроизводных ААС.

Реакционная смесь для получения β-гидроксипроизводных ААС включала ферментативный комплекс, состоящий из СУР3А4, СРР и цитохрома b5 в соотношении 1:2:2, 50 мМ калий-фосфатного буфера (КФБ, рН 7,4), 30 мМ MgCl₂, 200 мкг/мл смеси фосфолипидов (L-α-дилаурил-sn-глицеро-3-фосфохолина, L-α-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина, L-α-фосфатидил-L-серина), 750 нг/мл холата натрия, 3 мМ восстановленного глутатиона и 100 мкМ ААС в конечном объеме 250 мкл. Реакцию запускали внесением 10 мМ НАДФН и инкубировали в течение 60 мин при 37 °С. В качестве контроля использовали образцы, не содержащие НАДФН. Реакцию останавливали внесением 50 % ацетонитрила.

Образование продуктов реакции определяли с помощью ВЭЖХ-МС/МС анализа с применением обращенно-фазной колонки Hypersil Gold C18 (150×2,1 мм, размер частиц 5 мкм, Thermo Scientific, США) с использованием сверхвысокоэффективного жидкостного хроматографа Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, США). Масс-спектрометрическую детекцию проводили на масс-спектрометре высокого разрешения Q Exactive Plus (Thermo Scientific, США). В качестве внутреннего стандарта использовали синтетический ААС — метилтестостерон. Данные обрабатывали с помощью программы XCalibur (Thermo Scientific, США).

Результаты и их обсуждение. В недавнем прошлом газовая хроматография (ГХ) в сочетании с масс-спектрометрией (МС) являлась основным методом для определения и скрининга ААС и их метаболитов в моче человека [5]. Однако для анализа ААС с помощью ГХ-МС требуется проведение предварительного ферментативного гидролиза и длительных этапов дериватизации для получения летучих производных. При анализе ААС с использованием ГХ-МС остается проблема с чувствительностью и селективностью для определения некоторых стероидов, присутствующих в моче в очень низких количествах. В последние годы все большее значение в допинг-контроле приобретает метод ВЭЖХ в сочетании с тандемной МС (МС/МС),

поскольку для его проведения не требуется стадия дериватизации, возможно определение термолabileльных и плохо дериватирующихся ААС. В литературе имеется ряд работ по анализу ААС в биологических жидкостях человека с использованием ВЭЖХ-МС/МС [6].

На первом этапе выполнения работы были подобраны параметры хроматографического разделения и детекции методом ВЭЖХ-МС целевых соединений на основе стандартных веществ тестируемых ААС и их метаболитов.

Для работы были выбраны значимые в допинг-контроле ААС: станозолол, оралтуринабол, метандиенон, оксандролон, оксиметолон, которые имеют разные структурные характеристики, в частности, количество двойных связей, положение и количество функциональных групп.

В качестве внутреннего стандарта был выбран синтетический ААС — метилтестостерон. Несмотря на то что данное соединение относится к группе S1 запрещенного списка веществ ВАДА, известно, что оно полностью метаболизируется в организме человека и в исходном виде не экскретируется. Хроматограмма и масс-спектр внутреннего стандарта приведены на рисунке 1.

Было рассмотрено несколько вариантов содержания ацетонитрила в элюирующей системе — от 5 до 30 %. Показано, что заметного влияния на качество хроматографического разделения ААС и их метаболитов в условиях масс-спектрометрической детекции данный параметр не оказывает.

В связи с тем, что при масс-спектрометрической детекции имеется возможность селективного выделения соединений с разной молекулярной массой даже в случае совпадающего времени выхода, особое внимание при подборе хроматографических параметров было уделено возможности разделения изомерных форм стероидов. В связи с этим, исходное содержание ацетонитрила в элюирующей системе было выбрано минимально возможным — 5 %. Кроме того, было рассмотрено влияние хроматографических параметров (режим элюирования) на разделение метаболитов ААС с несколькими вариантами гидроксирования стероидной структуры на примере метаболитов станозолола — 3'-гидрокси-, 4β-гидрокси- и 16β-гидроксистеранозолола (рисунок 2). В результате был подобран метод с 25-минутным градиентом от 5 до 95 % ацетонитрила (с 0,1%-й муравьиной кислотой) в воде при скорости потока 0,25 мл/мин. В качестве базового раствора использовали 0,1%-ю муравьиную кислоту в воде.

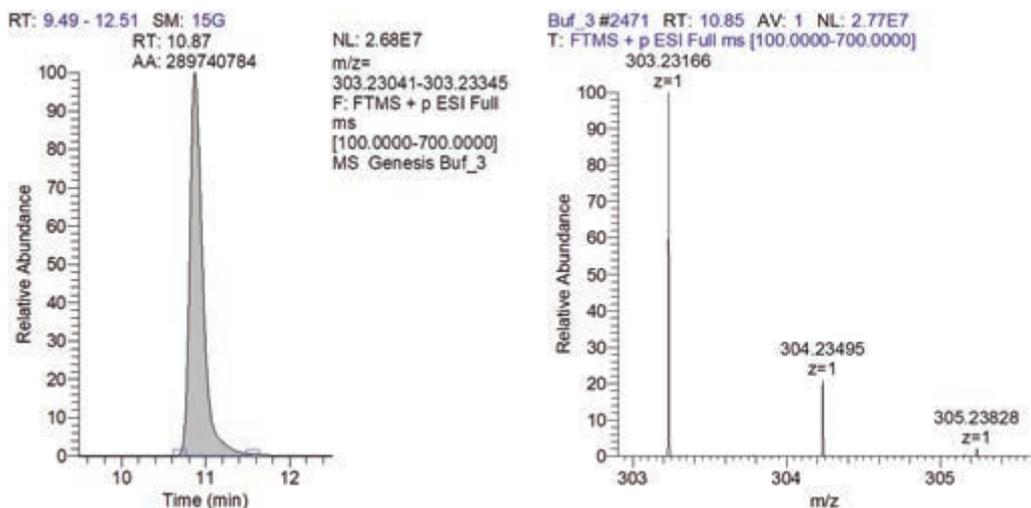


Рисунок 1 — Хроматограмма и масс-спектр внутреннего стандарта (метилтестостерона), полученные методом ВЭЖХ-МС

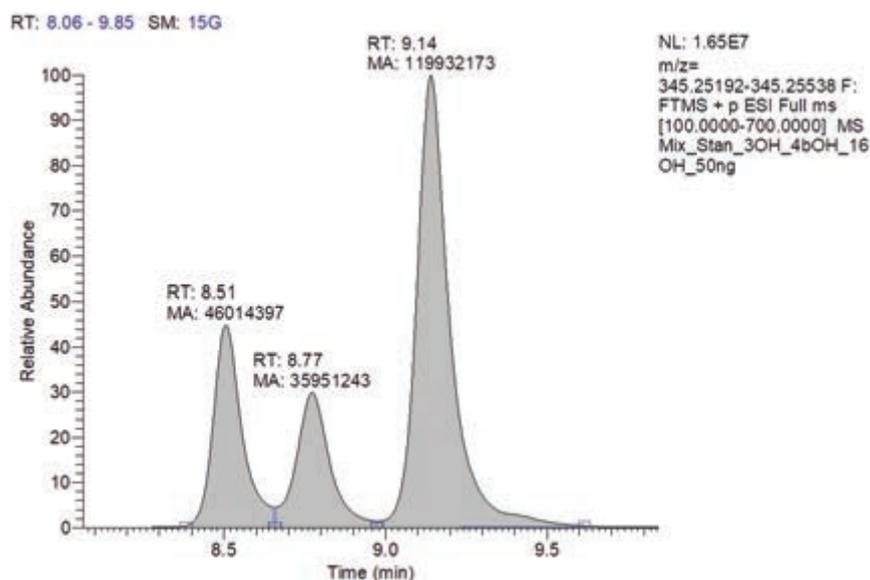


Рисунок 2 — Хроматограмма разделения смеси 3'-гидрокси-, 4β-гидрокси- и 16β-гидроксистеранола (50 нг/мл каждого соединения) при градиенте от 5 до 95 % ацетонитрила методом ВЭЖХ

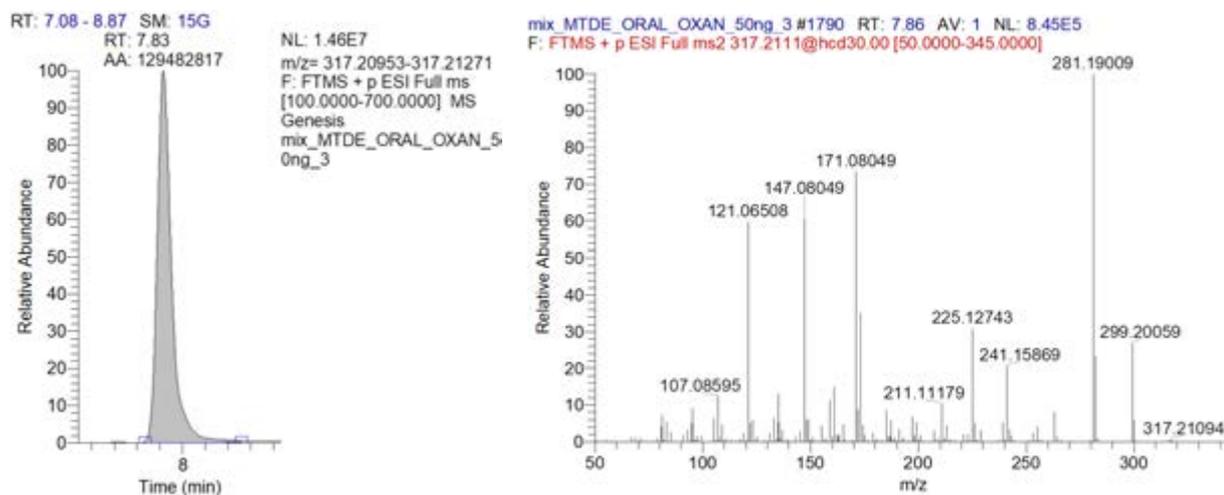
С целью оптимизации МС/МС-распада был проведен анализ в МС/МС-режиме детекции целевых ионов с коллизионными энергиями 15–70 эВ и охарактеризованы полученные МС/МС-спектры ААС и их метаболитов. Для исследованных в работе ААС были получены масс-спектры с удовлетворительными параметрами распада как по степени деградации материнского иона, так и образованию дочерних ионов при коллизионной энергии 30 эВ.

На рисунке 3 в качестве примера представлены хроматограммы и МС/МС-спектры

6β-гидрокси-метандиенона и 6β-гидроксиоралтуринабола, демонстрирующие наличие характерической фрагментации данных соединений.

Таким образом, были подобраны условия для хроматографического разделения (содержание ацетонитрила в элюирующей системе, режим элюирования) и масс-спектрометрической детекции (коллизионная энергия) синтетических ААС и их метаболитов методом ВЭЖХ-МС/МС.

а



б

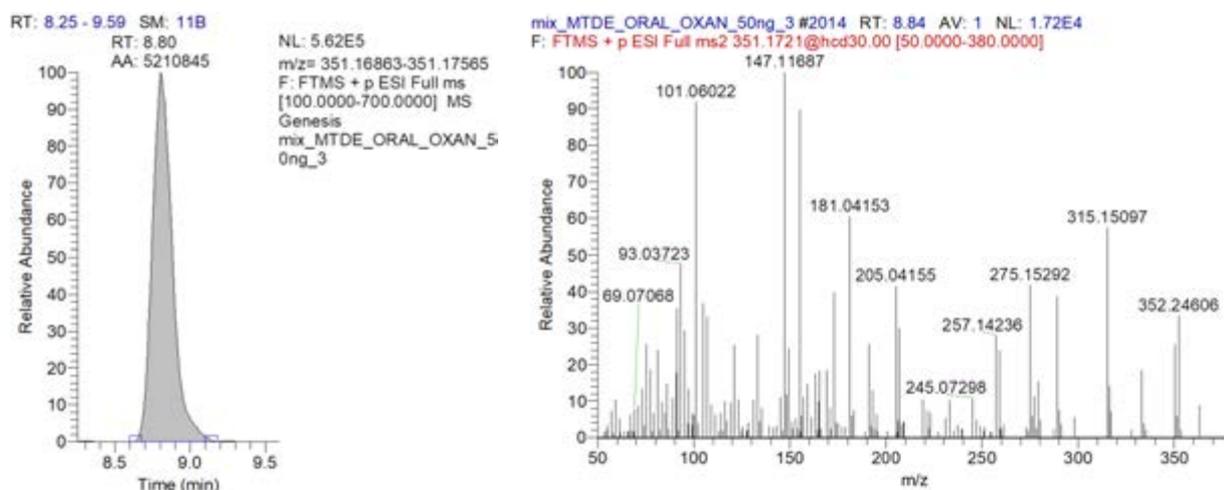


Рисунок 3 — Хроматограммы разделения и МС/МС-спектры β -гидроксиметандиенона (а) и β -гидроксиоралтуринабола (б), полученные методом ВЭЖХ-МС/МС

Для исследования метаболизма лекарственных средств с помощью стероидгидроксилазы CYP3A4 в экспериментах *in vitro* необходимо проведение реакции β -гидроксилирования тестостерона в соответствии с рекомендациями по применению новых лекарственных средств, регулируемых Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA), Европейским агентством лекарственных средств (EMA) и Министерством здравоохранения, труда и социального обеспечения Японии (MHLW) [7]. Тестостерон — типичный андроген, гидроксилирование которого в β -положении преимущественно катализируется подсемейством CYP3A [3].

Таким образом, на втором этапе выполнения работы с целью исследования возможно-

сти получения гидроксипроизводных ряда синтетических ААС с использованием β -стероидгидроксилазы CYP3A4 была осуществлена постановка данной реакции в отношении эндогенного ААС — тестостерона. В работе для исследования метаболизма ААС *in vitro* использовали очищенный рекомбинантный CYP3A4 человека.

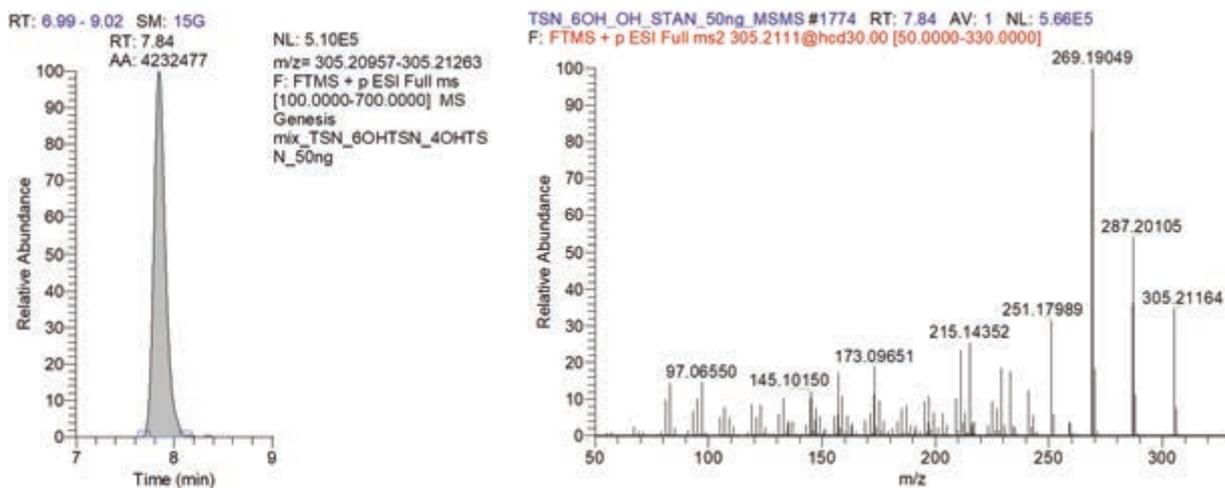
CYP3A4 катализирует реакцию β -гидроксилирования эндогенных стероидов и нуждается в электронах, поступающих от окислительно-восстановительных партнеров — НАДФН-цитохром Р450 редуктазы (CPR) и цитохрома *b5*. В работе были использованы рекомбинантные препараты данных белков (чистота > 95 % по гель-электрофорезу в денатурирующих условиях): микросомальный цитохром *b5* (*b5*) и CPR.

В результате проведения реакции гидроксилирования тестостерона с участием ферментативной системы СУР3А4 было выявлено образование четырех моногидроксилированных метаболитов, в том числе β -гидрокситестостерона. Для установления структуры ААС и определения сайтов гидроксилирования был проведен МС/МС анализ образцов. Подтверж-

дение наличия гидроксилирования по β -положению осуществлялось по дочерним ионам стандарта метаболита тестостерона.

Как видно из данных, представленных на рисунке 4, СУР3А4 катализирует гидроксилирование тестостерона с образованием β -гидрокситестостерона (время удерживания 7,8 мин) в качестве основного метаболита.

а



б

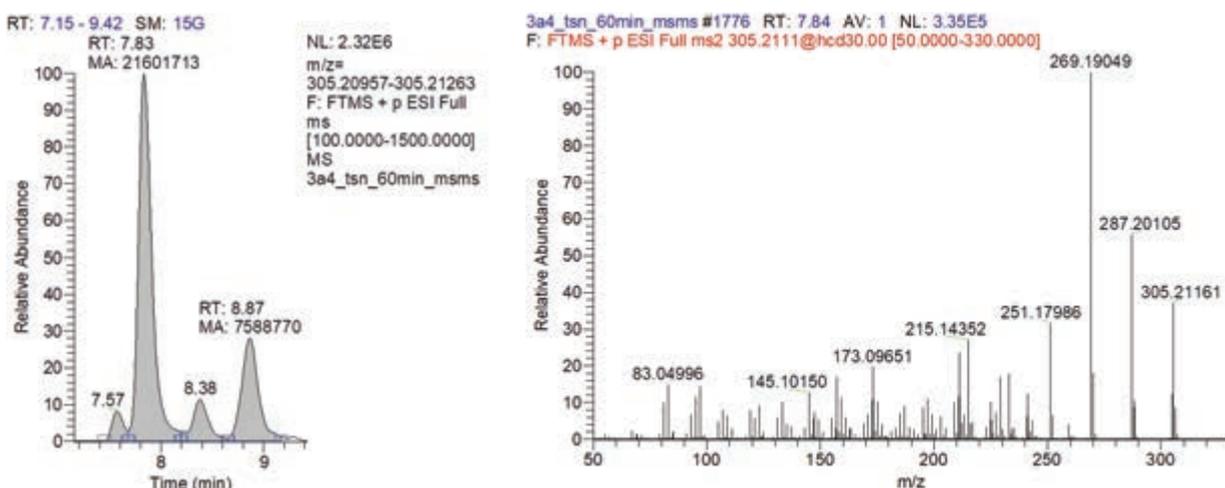


Рисунок 4 — Хроматограммы и МС/МС-спектры стандарта β -гидрокситестостерона (время удерживания 7,8 мин) (а) и моногидроксипроизводных тестостерона, полученных при протекании реакции с участием ферментативной системы СУР3А4 (б)

На третьем этапе выполнения работы с целью получения β -гидроксипроизводных ряда синтетических ААС (станозолол, оралтуринабол, метандиенон, оксандролон, оксиметолон) с использованием β -стероидгидроксилазы СУР3А4 была осуществлена апробация работы ферментативной системы в отношении данных ААС.

Образование β -гидроксипроизводных метандиенона и оралтуринабола в результате проведения реакций с участием СУР3А4 было подтверждено при сравнении с имеющимися стандартами метаболитов. Подтверждение идентичности продуктов реакций целевым β -гидроксипроизводным станозолола, оксандролона и оксиметолон было получено при

сравнении МС/МС-спектров продуктов реакций гидроксилирования с участием СУР3А4 с МС/МС-спектрами исходных ААС и данными по МС/МС-распаду данных соединений, имеющих в литературе.

На рисунке 5 представлена хроматограмма и МС/МС-спектр моногидроксипроизводных метандиенона, полученных из метандиенона в результате реакции, катализируемой

СУР3А4. Продемонстрировано точное совпадение времени удерживания стандарта β -гидроксиметандиенона и одного из метаболитов метандиенона, полученных в результате проведения реакции. Следует отметить, что СУР3А4 катализирует гидроксилирование метандиенона с образованием β -гидроксиметандиенона в качестве основного метаболита.

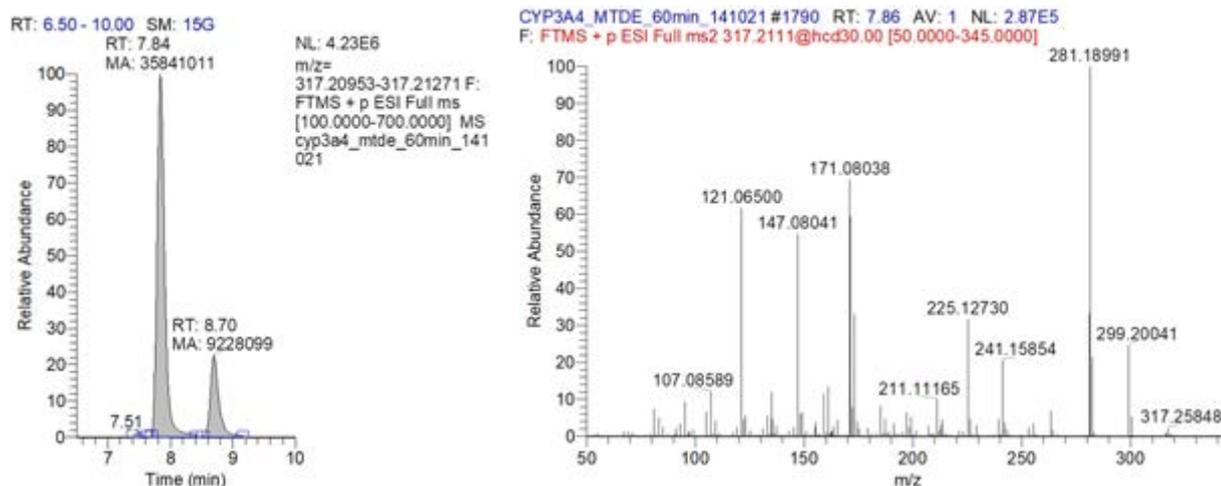


Рисунок 5 — Хроматограмма двух моногидроксипроизводных метандиенона (время удерживания β -гидроксиметандиенона — 7,8 мин) и МС/МС-спектр β -гидроксиметандиенона, полученных из метандиенона при протекании реакции с участием ферментативной системы СУР3А4

На рисунке 6 приведены хроматограмма и МС/МС-спектр β -гидроксиоралтуринабола, полученного из оралтуринабола в результате реакции, катализируемой СУР3А4.

Сходные данные были получены в реакциях гидроксилирования станозолола, оксандролона и оксиметолонна с участием ферментативной системы СУР3А4.

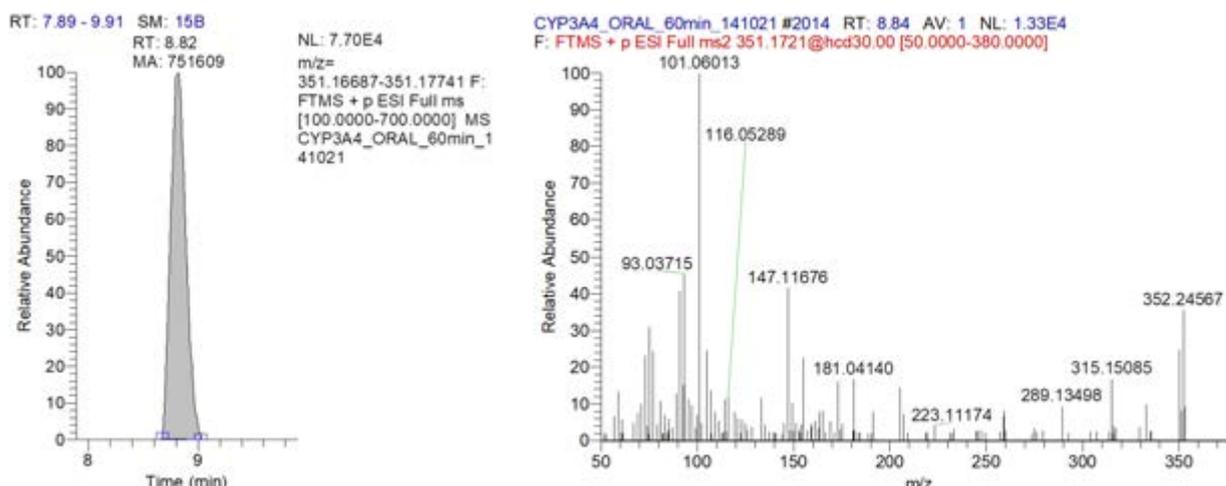


Рисунок 6 — Хроматограмма и МС/МС-спектр β -гидроксиоралтуринабола, полученного из оралтуринабола при протекании реакции с участием ферментативной системы СУР3А4

Таким образом, в результате проведенной работы были получены 6 β -гидроксипроизводные исследованных в работе синтетических ААС (станозолол, оралтуринабол, метандиенон, оксандролон, оксиметолон). Следует отметить, что для двух из них (метандиенон, оралтуринабол) имеются стандарты 6 β -гидроксипроизводных, что позволяет точно оценить их образование в реакции. Так, процентные значения количества метаболитов, образовавшихся в реакции с участием СУР3А4, относительно количества ААС, взятого для проведения реакции (25 нмоль), для 6 β -гидроксиметандиенона составило 16 %, для 6 β -гидроксиоралтуринабола — 25 %.

Заключение. В ходе выполнения работы разработан метод получения 6 β -гидроксипроизводных значимых в допинг-контроле ААС с использованием рекомбинантной ферментативной системы СУР3А4 человека и подобраны условия для хроматографического разделения и масс-спектрометрической детекции синтетических ААС и их метаболитов с использованием ВЭЖХ-МС/МС. Была осуществлена постановка реакции гидроксилирования ряда синтетических ААС (станозолол, оралтуринабол, метандиенон, оксандролон, оксиметолон),

различающихся по структурным характеристикам, с участием СУР3А4 и показано образование 6 β -гидроксипроизводных данных соединений.

В исследованиях по экскреции ААС с мочой после однократного приема было показано, что 6 β -гидроксилирование В-кольца является основным путем метаболизма ААС, в частности для оралтуринабола, метандиенона и станозолола. Однако окно обнаружения данных метаболитов было довольно небольшим — до 5 дней. Следует отметить, что 6 β -гидроксипроизводные ААС не являются конечными продуктами метаболизма ААС. Дальнейшие метаболические пути фазы I биотрансформации ААС включают восстановление А-кольца и гидроксилирование по С11-, С12- и С16-положениям. Данные метаболиты обнаруживаются в биологических жидкостях в течение длительного промежутка времени — до 50 дней. В связи с этим исследования, которым посвящена данная статья, являются частью комплексной научно-практической работы по получению долгоживущих метаболитов ААС с участием ферментов семейства цитохромов Р450, в частности гидроксистероид дегидрогеназ и стероидгидроксилаз.

Список цитированных источников

1. World Anti-Doping Agency. The 2021 prohibited list [Electronic resource]. — Mode of access: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2021list_en.pdf. — Date of access: 10.05.2022.
2. Anti-doping testing figures report — executive summary. 2020 [Electronic resource]. — Mode of access: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/2022-01/2020_anti-doping_testing_figures_executive_summary_final.pdf. — Date of access: 10.05.2022.
3. Human steroid biosynthesis, metabolism and excretion are differentially reflected by serum and urine steroid metabolomes: a comprehensive review / L. Schiffer [et al.] // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* — 2019. — Vol. 194. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2019.105439.
4. Intracrine androgen biosynthesis, metabolism and action revisited / L. Schiffer [et al.] // *Mol. Cell. Endocrinol.* — 2018. — Vol. 465. — P. 4–26.
5. Sensitivity of GC-EI/MS, GC-EI/MS/MS, LC-ESI/MS/MS, LC-Ag(+) CIS/MS/MS, and GC-ESI/MS/MS for analysis of anabolic steroids in doping control / E. Cha [et al.] // *Drug Test. Anal.* — 2015. — Vol. 7. — P. 1040–1049.
6. Dried urine microsampling coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for the analysis of unconjugated anabolic androgenic steroids / M. Protti [et al.] // *Molecules.* — 2020. — Vol. 25. — DOI: 10.3390/molecules25143210.
7. U.S. Food and Drug Administration, Drug development and drug interactions: table of substrates, inhibitors and inducers. 2020 [Electronic resource]. — Mode of access: <http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DevelopmentResources/DrugInteractionsLabeling/ucm093664.htm#4>. — Date of access: 10.05.2022.

Preparation of 6 β -hydroxy derivatives of anabolic steroids using human recombinant CYP3A4 enzyme system for doping control purposes

Bakakina Y. S.¹, Babaryko D. V.¹, Efimovich D. D.¹, Shkel T. V.², Svirid A. V.², Kisel M. S.², Pakhadnia Y. G.¹, Gilep A. A.², Syakhovich V. E.¹

¹Health Care Institution “National Anti-Doping Laboratory”, Lesnoy, Republic of Belarus;

²The State Scientific Institution “The Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus”, Minsk, Republic of Belarus

The use of anabolic androgenic steroids (AAS) by athletes is the most significant problem in doping control. AAS are almost completely metabolized in the human body as a result of phase I and phase II biotransformation reactions, including the participation of cytochrome P450 (CYP) enzyme family. The presence of standard substances or certified AAS metabolites reference materials is obligatory for determining the spectrum of prohibited substances in the body fluids of athletes. Within the framework of this work, the method for the preparation of 6 β -hydroxy derivatives of significant in doping control AAS was developed using human recombinant CYP3A4 enzyme system and parameters for synthetic AAS and their metabolites detection were selected using high-performance liquid chromatography mass spectrometry (HPLC-MS/MS).

Keywords: human recombinant CYP3A4, synthetic anabolic-androgenic steroids, metabolites, liquid chromatography-mass spectrometry.