

УДК 543.63+543.544.5.068.7

ИЗУЧЕНИЕ МЕТАБОЛИЗМА СЕКРЕТАГОГА ГОРМОНА РОСТА ИБУТАМОРЕНА (МК-677) В МОЧЕ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ УЛЬТРАВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

© 2024 г. Е. В. Дмитриева^{a,*}, А. З. Темердашев^a, Э. М. Гашимова^a, А. А. Азарян^a

^aКубанский государственный университет
ул. Ставропольская, 149, Краснодар, 350040 Россия

*E-mail: catherine_dmitrieva@outlook.com

Поступила в редакцию 07.04.2023 г.

После доработки 27.04.2023 г.

Принята к публикации 28.04.2023 г.

Изучен метаболизм непептидного секретатога гормона роста ибутаморена (МК-677) путем анализа образцов мочи человека, полученных в течение двух недель после однократного перорального употребления препарата. Подготовку проб к анализу осуществляли при помощи разбавления образцов и ферментативного гидролиза с последующей жидкостно-жидкостной экстракцией. Для детектирования соединений применяли обращенно-фазовую ультравысокоэффективную жидкостную хроматографию с квадруполь-времетраплетным масс-спектрометрическим детектированием с электрораспылительной ионизацией в режиме регистрации положительно заряженных ионов. В пробах мочи обнаружили соединение в неизменной форме, а также его метаболиты, при этом детектирование гидроксилированного аналита возможно спустя четыре дня после однократного перорального употребления соединения, что делает его наиболее перспективным объектом для детектирования.

Ключевые слова: ибутаморен, МК-677, моча, метаболизм, УВЭЖХ-МС, допинг-контроль.

DOI: 10.31857/S0044450224020057, **EDN:** vywoys

Гормон роста приводит к увеличению мышечной массы тела, уменьшению жировой массы, укреплению мышц, а также выполняет ряд других важных функций в организме человека [1]. Для увеличения выработки гормона роста применяют так называемые “секретатоги гормона роста”, одним из которых является ибутаморен (МК-677, схема 1), разработанный компанией Merck (Германия). Данное соединение имеет низкую молекулярную массу и характеризуется пероральной биодоступностью с увеличенным временем полувыведения [2–4].

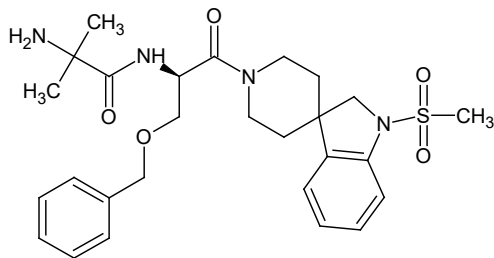


Схема 1. Структурная формула ибутаморена.

При проведении исследований на собаках показано, что данное соединение увеличивает уровень гормона роста с высокой специфичностью [2]. Употребление ибутаморена здоровыми мужчинами, имеющими избыточный вес, в течение двух месяцев привело к устойчивому повышению сывороточных уровней гормона роста, инсулиноподобного фактора роста 1 и белка-3, связывающего инсулиноподобный фактор роста 1 [5]; у пожилых людей МК-677 стимулирует обновление костной ткани [6]. В другом исследовании употребление ибутаморена привело к увеличению уровней гормона роста и инсулиноподобного фактора роста 1, увеличению как мышечной, так и жировой массы тела с небольшим влиянием на минеральную плотность костей. Наиболее частыми побочными эффектами были повышение аппетита, которое уменьшалось в течение нескольких месяцев, а также временные легкие отеки нижних конечностей и мышечные боли [1, 7].

Ибутаморен проходит клинические испытания в виде мезилатной соли — МК-0677 [2]. В рандомизированном исследовании по изучению безопасности и эффективности применения мезилата ибутаморена у пациентов с переломом шейки бедра получены данные о том, что этот препарат увеличивает риск сердечной недостаточности [3, 8]. Несмотря на то, что ибутаморен не прошел клинические испытания, возможно его приобретение на “черном рынке”.

Благодаря заявленным эффектам возможно употребление ибутаморена профессиональными спортсменами, поэтому он внесен в перечень запрещенных к употреблению препаратов Всемирного антидопингового агентства (категория S2, пептидные гормоны и их рилизинг-факторы) [9, 10]. В связи с этим представляет интерес разработка методик определения ибутаморена в биологических жидкостях. Для решения этой задачи использовали несколько подходов. В плазме данное соединение определяли с применением жидкостно-жидкостной экстракции метил-*трет*-бутиловым эфиром [11]. В моче ибутаморен определяли разбавлением образца [12] и твердофазной экстракцией, применяя патроны Oasis HLB после однократного перорального употребления препарата [13], а также используя патроны Oasis WCX [14]. Описано [15] определение ибутаморена путем гидролиза ферментом β -глюкуронидазой *E. coli* и жидкостно-жидкостной экстракции (ЖЖЭ) диэтиловым эфиром с последующим детектированием методом ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии-тандемной масс-спектрометрии (УВЭЖХ–МС/МС). В перечисленных ранее исследованиях определяли только соединение в неизменной форме. Поиск метаболитов МК-677 проводили в образцах мочи и плазмы лошади [16], однако, поскольку пути метаболизма у животных и людей могут отличаться [17], важным является поиск метаболитов в биологических жидкостях человека для целей допинг-контроля.

Преимуществами мочи в качестве анализируемой матрицы являются неинвазивность, отсутствие болевых ощущений и простота получения образца. Кроме того, моча является предпочтительной матрицей при проведении скрининговых исследований, поскольку обеспечивает более широкое окно для обнаружения соединений, а концентрации соединений и их метаболитов обычно выше в моче по сравнению с плазмой и слюной [18].

Цель данного исследования — изучение метаболизма и кинетики выведения ибутаморена

для его определения в моче человека методом УВЭЖХ–МС.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и реагенты. Стандартный образец МК-677 приобретали у Soyoung Biotech. Inc. (Китай). Использовали β -глюкуронидазу *Escherichia coli* (*E. coli*) (Roche Diagnostics, Германия) и арил-сульфатазу *Helix pomatia* (*H. pomatia*) (Sigma-Aldrich, США). В ходе эксперимента использовали также ацетонитрил (Biosolve, Израиль), метанол (J.T. Baker, Великобритания) квалификации “для ВЭЖХ”, муравьиную кислоту (98%) (Вектон, Россия). Для приготовления фосфатного буферного раствора с pH 6.5 использовали $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 и азид натрия. Для приготовления карбонатного буферного раствора с pH 10 применяли карбонат и гидрокарбонат калия. Ацетатный буферный раствор готовили с использованием ацетата натрия и уксусной кислоты (98%). Все реагенты для приготовления буферных растворов приобретали в Вектон (Россия).

Стандартный раствор ибутаморена с концентрацией 1 мг/мл готовили в ацетонитриле. Для получения растворов с меньшими концентрациями также использовали ацетонитрил.

Оборудование. Для детектирования ибутаморена и его метаболитов использовали ультравысокоэффективный жидкостный хроматограф Bruker Elute, оснащенный аналитической колонкой Phenomenex Kinetex C18 (100×2.1 мм, 1.7 мкм) с соответствующей предохранительной колонкой, соединенный с квадруполь-времяпролетным масс-спектрометром Bruker MaXis Impact с источником электрораспылительной ионизации. Для обработки результатов использовали программное обеспечение Bruker Data Analysis 4.4. Условия масс-спектрометрического детектирования: температура источника ионизации — 250 °С; напряжение на капилляре — 4 кВ; напряжение на экстрагирующей линзе — 500 В; давление газа-распылителя (азот) — 100 кПа; скорость потока газа-осушителя — 5 л/мин; скорость сканирования — 3 Гц; диапазон сканирования масс — 100–1 500 m/z ; давление газа-мишени (азот) — 1.5 мТорр.

Градиентное элюирование осуществляли по программе, представленной в табл. 1, при скорости потока подвижной фазы 0.4 мл/мин, температуре термостата колонки 40 °С и объеме анализируемого образца — 10 мкл. Температура термостатирования образцов была 5 °С.

Таблица 1. Условия градиентного элюирования

Время, мин	0.1%-ная муравьиная кислота в метаноле, %	0.1%-ная муравьиная кислота в воде, %
0.00	5	95
1.00	5	95
2.70	60	40
4.00	60	40
5.00	90	10
7.50	90	10
7.51	5	95
9.00	5	95

Употребление препарата. Доброволец употребил 10 мг соединения, поскольку это количество является безопасным [19]. Сбор образцов проводили в течение двух недель после однократного употребления препарата. Также получили контрольный образец до употребления препарата.

Подготовка проб мочи к анализу. Для изучения метаболизма ибутаморена использовали несколько способов пробоподготовки. Прежде всего проводили пятикратное разбавление образца смесью ацетонитрил–вода (70:30, по объему) с последующим центрифугированием в течение 10 мин при 10 000 об/мин. Надосадочный слой переносили в вialу и анализировали.

Для пробоподготовки, включающей ферментативный гидролиз β -глюкуронидазой *E. coli*, использовали следующие условия: в аликвоту мочи объемом 3 мл вносили 1 мл фосфатного буферного раствора, содержащего фермент β -глюкуронидазу *E. coli*. Затем инкубировали смесь в течение 30 мин при 50 °С для деконъюгации глюкуронидов. После охлаждения до комнатной температуры переносили 100 мкл образца в вialу для анализа. В оставшийся образец (2.9 мл) вносили 1 мл карбонатного буферного раствора (pH 9) и 0.5 г сульфата натрия в качестве высаливателя. Затем добавляли 3 мл диэтилового эфира и перемешивали образец на орбитальном перемешивателе с последующим центрифугированием в течение 5 мин при 4 000 об/мин. Водную фазу вымораживали при –35 °С, затем перенесли органическую фазу в твердотельный нагреватель для упаривания. После этого сухой остаток вновь растворяли в 300 мкл смеси метанол–вода (1:1, по объему) для анализа.

Проводили также ферментативный гидролиз арил-сульфатазой *H. Pomatia*, для чего 1 мл образца мочи инкубировали с данным ферментом в ацетатном буферном растворе (pH 5) в течение 2 ч при 50 °С с последующим анализом образца.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Использование комплексного подхода позволило установить, что ибутаморен подвержен метаболизму по двум фазам.

Анализ разбавленного образца мочи показал, что нативное соединение можно определить спустя практически двое суток (43 ч) в моче с момента его однократного употребления с применением данного подхода, при этом глюкуронид или сульфат ибутаморена не образуются.

В образцах разбавленной мочи присутствовали соединения с m/z 439.2010, что предположительно соответствует отщеплению бензильного фрагмента (29 ч), m/z 455.1959 (отщепление бензильного фрагмента и гидроксилирование, 5 ч), m/z 544.2356 (гидроксилирование, 29 ч), m/z 561.2377 (дигидроксилирование, 10 ч) (рис. 1). Для двух метаболитов ибутаморена, предположительно моно- и дигидроксилированного, происходило частичное образование глюкуронидов (рис. 2). В то же время образование сульфатированных конъюгатов не наблюдали на хроматограмме.

Методика с ферментативным гидролизом и жидкостно-жидкостной экстракцией диэтиловым эфиром позволила детектировать приведенные ранее метаболиты первой фазы, а также предположительно тригидроксилированный метаболит с m/z 577.2323. Поскольку одним из этапов пробоподготовки является жидкостно-жидкостная экстракция с целью концентрирования аналитов, возможность обнаружения соединений увеличивается по сравнению с анализом разбавленного образца (см. табл. 2).

В анализируемых образцах мочи, полученных после ферментативного гидролиза и жидкостно-жидкостной экстракции, наиболее высокую концентрацию нативного соединения наблюдали в первом образце, полученном спустя 1.7 ч после

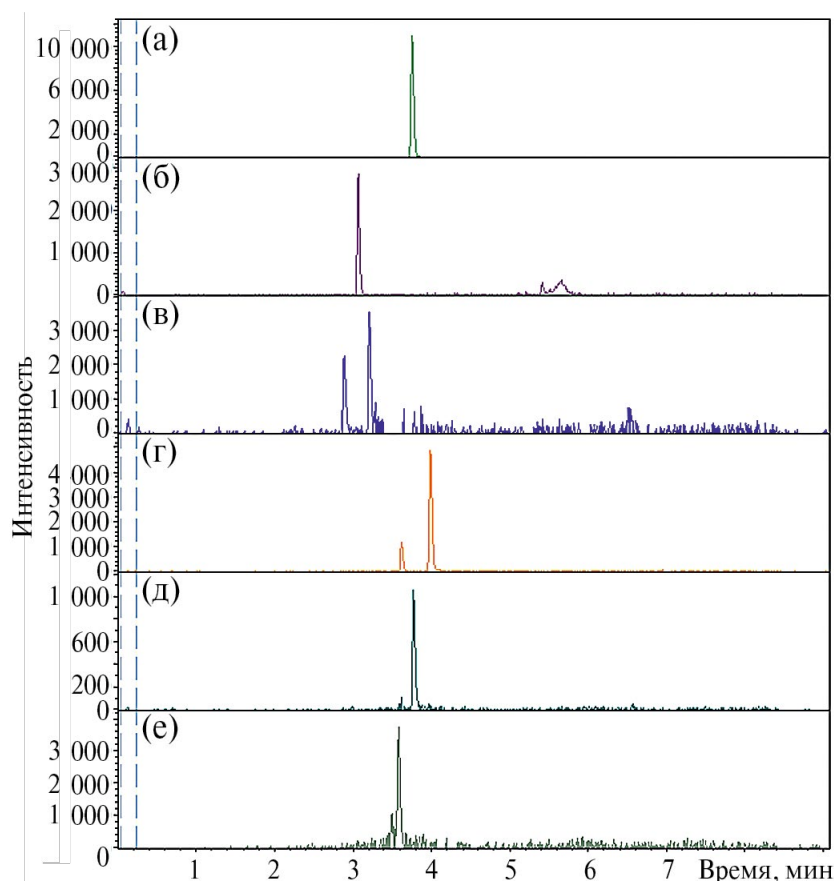


Рис. 1. Хроматограмма по выделенным ионам образца мочи после употребления ибутаморена. m/z : (а) 529.2479, (б) 439.2010, (в) 455.1959, (г) 545.2428, (д) 561.2377, (е) 577.2323.

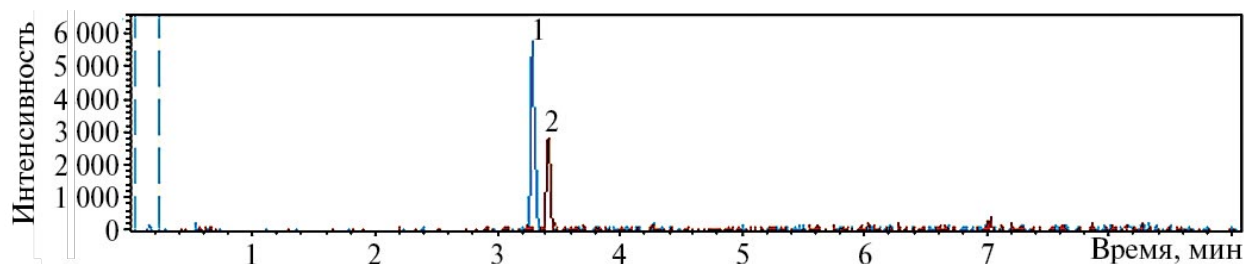


Рис. 2. Хроматограмма по выделенным ионам разбавленного образца мочи после употребления ибутаморена. m/z : 1 – 721.2749, 2 – 737.2698.

употребления вещества, затем она уменьшалась вплоть до 70 ч по экспоненциальной зависимости. Что касается предположительно гидроксилированного метаболита, имеющего время удерживания 3.6 мин, его максимальное содержание наблюдали во втором образце, полученном спустя 5.5 ч после употребления препарата, после чего его содержание в образцах уменьшалось в течение 88.5 ч.

Полученные результаты согласуются с данными Соболевского и соавт. [20], однако в настоящем исследовании не удалось детектировать метаболиты, соответствующие отщеплению

2-метил-2-аминопропильного фрагмента, в то время как обнаружено соединение, предположительно соответствующее процессу тригидроксилирования.

* * *

Таким образом, установлено, что для выявления присутствия ибутаморена в организме человека наиболее перспективно детектирование гидроксилированного метаболита в моче. Следует отметить, что проведение количественного анализа ограничено отсутствием стандартных образцов метаболитов. В этом случае возможно определение

Таблица 2. Предполагаемые пути метаболизма ибупрофена в моче человека

Соединение	Предполагаемый путь метаболизма	Молекулярная формула	Моноизотопная масса, Да	[M+H] ⁺ , m/z	t _R , мин	Временной диапазон обнаружения, ч	
						разбавление	гидролиз и ЖЖЭ
МК-677	Нативное соединение	C ₂₇ H ₃₆ N ₄ O ₅ S	528.2406	529.2479	3.8	43	70
M1	Отщепление бензильного фрагмента	C ₂₀ H ₃₀ N ₄ O ₅ S	438.1937	439.2010	3.1	29	23
M2	Отщепление бензильного фрагмента и гидроксиглирование	C ₂₀ H ₃₀ N ₄ O ₆ S	454.1886	455.1959	2.9, 3.2	5	5
M3	Гидроксиглирование	C ₂₇ H ₃₆ N ₄ O ₆ S	544.2356	545.2428	3.6, 4.0	29	94
M4	Дигидроксиглирование	C ₂₇ H ₃₆ N ₄ O ₇ S	560.2305	561.2377	3.8	10	35
M5	Тригидроксиглирование	C ₂₇ H ₃₆ N ₄ O ₈ S	576.2254	577.2323	3.5	—	5
M6	Гидроксиглирование и глюкуронидация	C ₃₃ H ₄₄ N ₄ O ₁₂ S	720.2676	721.2749	3.3	23	—
M7	Дигидроксиглирование и глюкуронидация	C ₃₃ H ₄₄ N ₄ O ₁₃ S	736.2626	737.2698	3.4	5	—

соединения в нативной форме, особенно при проведении скрининговых исследований.

Исследования проводили в рамках выполнения Госзадания Минобрнауки РФ № FZEN-2023-0006 с использованием научного оборудования ЦКП “Эколого-аналитический центр” Кубанского государственного университета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sigalos J.T., Pastuszak A.W. The safety and efficacy of growth hormone secretagogues // *Sex. Med. Rev.* 2018. V. 6. № 1. P. 45.
<https://doi.org/10.1016/j.sxmr.2017.02.004>
2. Patchett A.A., Nargund R.P., Tata J.R., Chen M.H., Barakat K.J., Johnston D.B., Cheng K., Chan W.W., Butler B., Hickey G. Design and biological activities of L-163,191 (MK-0677): A potent, orally active growth hormone secretagogue // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. V. 92. № 15. P. 7001.
<https://doi.org/10.1073/pnas.92.15.7001>
3. Ishida J., Saitoh M., Ebner N., Springer J., Anker S.D., von Haehling S. Growth hormone secretagogues: History, mechanism of action, and clinical development // *JCSM Rapid Commun.* 2020. V. 3. № 1. P. 25.
<https://doi.org/10.1002/rco2.9>
4. Copinschi G., Van Onderbergen A., L'Hermite-Balériaux M., Mendel C.M., Caufriez A., Leproult R., Bolognese J.A., De Smet M., Thorner M.O., Van Cauwter E. Effects of a 7-day treatment with a novel, orally active, growth hormone (GH) secretagogue, MK-677, on 24-hour GH profiles, insulin-like growth factor I, and adrenocortical function in normal young men // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1996. V. 81. № 8. P. 2776.
<https://doi.org/10.1210/jcem.81.8.8768828>
5. Svensson J., Lönn L., Jansson J.O., Murphy G., Wyss D., Krupa D., Cerchio K., Polvino W., Gertz B., Boseaus I., Sjöström L., Bengtsson B.A. Two-month treatment of obese subjects with the oral growth hormone (GH) secretagogue MK-677 increases GH secretion, fat-free mass, and energy expenditure // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1998. V. 83. № 2. P. 362.
<https://doi.org/10.1210/jcem.83.2.4539>
6. Murphy M.G., Bach M.A., Plotkin D., Bolognese J., Ng J., Krupa D., Cerchio K., Gertz B.J. Oral administration of the growth hormone secretagogue MK-677 increases markers of bone turnover in healthy and functionally impaired elderly adults // *J. Bone Miner. Res.* 1999. V. 14. № 7. P. 1182.
<https://doi.org/10.1359/jbmr.1999.14.7.1182>
7. Nass R., Pezzoli S.S., Oliveri M.C., Patrie J.T., Harrell Jr F.E., Clasey J.L., Heymsfield S.B., Bach M.A., Vance M.L., Thorner M.O. Effects of an oral ghrelin mimetic on body composition and clinical outcomes in healthy older adults: A randomized trial (trials) // *Ann. Int. Med.* 2008. V. 149. № 9. P. 601.
<https://doi.org/10.7326/0003-4819-149-9-200811040-00003>
8. Adunsky A., Chandler J., Heyden N., Lutkiewicz J., Scott B.B., Berd Y., Liu N., Papanicolaou D.A. MK-0677 (ibutamoren mesylate) for the treatment of patients recovering from hip fracture: A multicenter, randomized, placebo-controlled phase IIb study // *Arch. Gerontol. Geriatr.* 2011. V. 53. № 2. P. 183.
<https://doi.org/10.1016/j.archger.2010.10.004>
9. World Anti-Doping Agency. World Anti-Doping Code. The 2021 Prohibited List. https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2021list_en.pdf (2021) (31.01.2023).
10. Baumann G.P. Growth hormone doping in sports: A critical review of use and detection strategies // *Endocr. Rev.* 2012. V. 33. № 2. P. 155.
<https://doi.org/10.1210/er.2011-1035>
11. Constanzer M.L., Chavez-Eng C.M., Matuszewski B.K. Determination of a novel growth hormone secretagogue (MK-677) in human plasma at picogram levels by liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* 1997. V. 693. № 1. P. 131.
[https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(97\)00035-2](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(97)00035-2)
12. Дмитриева Е.В., Темердашев А.З., Азарян А.А., Гашимова Э.М. Определение андарина (S-4), селективного модулятора андрогенных рецепторов, и ибутаморена (МК-677), непептидного секретаргога гормона роста, в моче ультравысокоэффективной жидкостной хроматографией с tandemным масс-спектрометрическим детектированием // *Журн. аналит. химии.* 2018. Т. 73. № 7. С. 523. (Dmitrieva E.V., Temerdashev A.Z., Azaryan A.A., Gashimova E.M. Determination of andarine (S-4), a selective androgen receptor modulator, and ibutamoren (MK-677), a nonpeptide growth hormone secretagogue, in urine by ultra-high performance liquid chromatography with tandem mass-spectrometric detection // *J. Anal. Chem.* 2018. V. 73. № 7. P. 674.
<https://doi.org/10.1134/S1061934818070031>)
13. Дмитриева Е.В., Темердашев А.З., Азарян А.А., Гашимова Э.М. Использование твердофазной экстракции для определения используемых в спорте лекарственных средств в моче человека методом УВЭЖХ–МС/МС // *Аналитика и контроль.* 2018. Т. 22. № 3. С. 236.
<https://doi.org/10.15826/analitika.2018.22.3.008>
14. Cuervo D., Loli C., Fernández-Álvarez M., Muñoz G., Carreras D. Determination of doping peptides via solid-phase microelution and accurate mass quadrupole time-of-flight LC–MS // *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2017. V. 1065–1066. P. 134.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.08.044>
15. Sobolevsky T., Krotov G., Dikunets M., Nikitina M., Mochalova E., Rodchenkov G. Anti-doping analyses at the Sochi Olympic and Paralympic Games 2014 // *Drug Test. Anal.* 2014. V. 6. № 11–12. P. 1087.
<https://doi.org/10.1002/dta.1734>

16. *Cutler C., Viljanto M., Taylor P., Habershon-Butcher J., Van Eenoo P.* Equine metabolism of the growth hormone secretagogue MK-0677 in vitro and in urine and plasma following oral administration // *Drug Test. Anal.* 2022. V. 14. № 7. P. 1273.
<https://doi.org/10.1002/dta.3252>
17. *Темердашев А.З., Дмитриева Е.В.* Методы определения селективных модуляторов андрогенных рецепторов // *Журн. аналит. химии.* 2020. Т. 75. № 7. С. 579. (*Temerdashev A.Z., Dmitrieva E.V.* Methods for the determination of selective androgen receptor modulators // *J. Anal. Chem.* 2020. V. 75. № 7. P. 835. <https://doi.org/10.1134/S1061934820070187>)
18. *Viette V., Fathi M., Rudaz S., Hochstrasser D., Veuthey J.-L.* Current role of liquid chromatography coupled to mass spectrometry in clinical toxicology screening methods // *Clin. Chem. Lab. Med.* 2011. V. 49. № 7. P. 1091.
<https://doi.org/10.1515/CCLM.2011.182>
19. *Chapman I.M., Bach M.A., Van Cauter E., Farmer M., Krupa D., Taylor A.M., Schilling L.M., Cole K.Y., Skiles E.H., Pezzoli S.S., Hartman M.L., Veldhuis J.D., Gormley G.J., Thorner M.O.* Stimulation of the growth hormone (GH)-insulin-like growth factor I axis by daily oral administration of a GH secretagogue (MK-677) in healthy elderly subjects // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1996. V. 81. № 12. P. 4249.
<https://doi.org/10.1210/jcem.81.12.8954023>
20. *Sobolevsky T., Prasolov I., Rodchenkov G.* Urinary metabolism of ibutamoren, a small molecule growth hormone secretagogue / Recent advances in doping analysis (21): Proceedings of the Manfred-Donike-Workshop; 31th Cologne Workshop on Dope Analysis. Köln: Sportverl. Strauß (Verlag), 2013. P. 182.