



ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21) 2017/0643.1

(22) 31.07.2017

(45) 08.05.2019, бюл. №19

(72) Марченко Александр Борисович; Ивасенко Светлана Александровна; Ларюшина Елена Михайловна; Турмухамбетова Анар Акылбековна

(73) Некоммерческое акционерное общество "Медицинский университет Караганды"

(56) Zeneng Wang, Bruce S. Levison, Jennie E. Hazen, Lillian Donahue, Xin-Min Li, and Stanley L. Hazen Measurement of trimethylamine-N-oxide by stable isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Biochem.* 2014 Jun 15; 455: 35-40.

Awwad HM, Geisel J, Obeid R Determination of trimethylamine, trimethylamine N-oxide, and taurine in human plasma and urine by UHPLC-MS/MS technique. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2016 Dec 1;1038:12-18. doi: 10.1016/j.jchromb.2016.10.017. Epub 2016 Oct 15.

Wolfgang Stremmel, Kathrin V. Schmidt, Vera Schuhmann, Frank Kratzer, Sven F. Garbade, Claus-Dieter Langhans, Gert Fricker, Jürgen G. Okun. Blood Trimethylamine-N-Oxide Originates from Microbiota Mediated Breakdown of Phosphatidylcholine and Absorption from Small Intestine. January 27, 2017, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170742>

US 2015/0149094 A1, 28.05.2015

(54) **СПОСОБ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ ТРИМЕТИЛАМИН N-ОКСИДА В ПЛАЗМЕ КРОВИ**

(57) Изобретение относится к области медицины, биохимической клинической лабораторной диагностики, молекулярной биологии, в частности, к способам оценки уровня триметиламин N-оксида в организме человека. Предложенный способ определения количественного содержания триметиламин N-оксида предусматривает депротенинизацию плазмы крови ацетонитрилом и анализ исследуемых образцов методом тандемной

высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС).

Технический результат заявляемого изобретения достигается тем, что разработанный способ количественного определения ТМАО включает экспресс-подготовку биологических образцов: к 100 мкл плазмы приливают 600 мкл ацетонитрила с последующим центрифугированием на скорости 20000 об./мин в течение 10 минут, при температуре центрифуги 4°C. Супернатант, в количестве 100 мкл переносят в виалу, к нему приливают 100 мкл воды. Полученный раствор вводят в хроматографическую систему, объем пробы 10 мкл. Далее проводят хроматографическое разделение и масс-спектральный анализ эталонного раствора ТМАО и исследуемых проб. Применяют несложную систему доступных растворителей для разделения - 0,125% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (растворитель «А») и 0,125% раствор муравьиной кислоты в воде (растворитель «В») в соотношении 1:1 со скоростью подачи подвижной фазы 0,250 мл/мин в изократическом режиме, время удерживания ТМАО 2,1 мин., продолжительность анализа одного образца в течение 5 минут.

Способ простой, нетрудоемкий, экономичный и доступный для масштабного рутинного анализа клинических образцов, может найти применение в биохимической клинической лабораторной диагностике, как лабораторный метод прогнозирования болезней системы кровообращения у населения, позволяющий проводить мониторинг риска развития заболеваний системы кровообращения и их осложнений, а также оценивать эффективность лечения и профилактики, что может являться одним из компонентов персонализированной медицины.

Изобретение относится к области медицины, биохимической клинической лабораторной диагностики, молекулярной биологии, в частности, к способам оценки уровня триметиламин N-оксида в организме человека. Предложенный способ определения количественного содержания триметиламин N-оксида предусматривает депротенинизацию плазмы крови ацетонитрилом и анализ исследуемых образцов методом тандемной высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС).

В мировой практике известны способы количественного определения ТМАО в биологическом материале, в которых, в основном, применяется высокоэффективная жидкостная хроматография, с учетом структурных особенностей ТМАО, детектирование осуществляется с использованием тандемной МС/МС-спектроскопии, в некоторых случаях ЯМР-спектроскопии.

Способы количественного определения уровня триметиламин N-оксида в биологическом материале:

Способ 1 - Авторами (Marzo, A., N. Monti, M. Ripamonti et al. Determination of aliphatic amines by gas and high-performance liquid chromatography // J. Chromatogr. - 1990. - V. 507. - P. 241-245.) разработан способ определения содержания ТМАО в плазме с применением ГХ/МС. Данная методика с использованием твердофазной микроэкстракции (ТФМЭ) позволяла определить уровень ТМАО в человеческой плазме. В работе использовался газовый хроматограф Varian Star 3400 CX, с колонкой SPB-1 sulfur (30м x 0.32мм, 4.0 мкм) и масс-детектором Varian Saturn 2000. Температура испарителя 250°C, температура колонки 120°C, в качестве газа-носителя использовался изотермический гелий при подаче 60 мл/мин. Для ТФМЭ использовалось карбоксен-полидиметилсилоксановое волокно (75мкм). Пробоподготовка: к плазме приливались 0,01М соляная кислота и сульфат титана (III) растворенный в серной кислоте (10 мкл, 45% w/v). В качестве внутренних стандартов использовались дейтерированные ТМА и ТМАО, количественный расчет проводился по калибровочной прямой. Время удерживания ТМАО составило 5,07 минут.

Недостатки метода - единичный способ определения содержания ТМАО в плазме с применением газовой хроматографии с масс-спектрометром, трудоемкие и времязатратные процедуры пробоподготовки, дейтерирование эталонного образца ТМАО и исследуемых биопроб.

Способ 2 - Во главе с James D. Otvos запатентована методика жидкостного хроматографа с ЯМР-спектроскопией, которая позволяет идентифицировать метаболиты метиламина при исследовании их уровня в моче и крови (Otvos, J.D., Jeyarajah, E.J. Wolak-Dinsmore, J.E. et al., NMR quantification of ТМАО. 2015, US Patent 20,150,149,094.). Результаты применения этой методики в лабораторной практике отражены в работе Garscia E. и соавторов (Garcia, E., Wolak-

Dinsmore, J., Wang, Z. et al., NMR quantification of trimethylamine-N-oxide in human serum and plasma in the clinical laboratory setting // Clin Biochem. - 2017. - <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009912017301959>). Тошачковая кровь собрана в K₂EDTA содержащие пробирки, с помощью центрифугирования получена плазма или сыворотка, с последующей заморозкой при -80°C. Пробоподготовка: перед анализом кровь размораживалась и подготавливалась, путем смешивания 240 мкл пробы и 80 мкл цитратного буфера pH 4,4 (3:1), достигая целевого значения pH 5,3. Процесс пробоподготовки, выполнения анализа проводился автоматически, с помощью Vantera® Clinical Analyzer (LipoScience, now LabCorp, Raleigh, NC), имеющим 400MHz спектрометр Agilent, 4мм зонд не прямой детекции и неподвижную проточную ячейку, уравновешенную при температуре 47°C через модуль управления переменной температурой. Общее время сбора для каждого спектра составляло примерно 6 минут (5,5 минут основной ход анализа плюс 30 секунд на спектральную обработку и генерацию результатов). Каждый спектр заполнялся нулями до 64 Кбит данных, а перед преобразованием Фурье применялась функция экспоненциальной аподизации (уширение линии = 0,1 Гц). После преобразования Фурье сигнал частотной области корректировался для смещения фазы, наклона и постоянного тока, прошедшего автоматическую проверку качества с использованием интенсивности сигнала цитрата и ширины линии, а пик ТМАО в спектре определяли количественно с использованием математического анализа линии и деконволюции. Пик ТМАО определялся путем создания алгоритма, который разделял пик на его потенциальные компоненты. Комбинация лоренцевой и Гауссовой линий была использована для математического моделирования пика ТМАО при 3,29-3,30 м.д. Амплитудные коэффициенты, соответствующие установленному пику ТМАО, были преобразованы в единицы концентрации (мкМ) с использованием эмпирически определенного конверсионного коэффициента. Коэффициент пересчета был получен путем вычисления сигнала ТМАО из спектров, собранных из диализованной сыворотки с известными концентрациями ТМАО и связывающих области пикового сигнала с ожидаемыми концентрациями. Линейность была продемонстрирована в пределах отчетного диапазона от 3,3 до 3000 мкМ.

Недостатки метода - трудоемкие и времязатратные процедуры пробоподготовки, применение ЯМР-спектроскопии для детектирования является очень дорогостоящим способом, поэтому не всегда доступным и не рентабельным для масштабного рутинного анализа клинических образцов.

Способ 3 - Для определения метаболического профиля использовалась жидкостная хроматография в сочетании с МС/МС-спектрометрией. Структурная идентификация таргетированных аналитов проводилась с использованием комбинации методов: ВЭЖХ/МС/МС, мультядерная ЯМР-

спектроскопия, ГХ/МС. Пробоподготовка проводилась путем депротеинизации плазмы с помощью ледяного метанола. После центрифугирования супернатант вводили в колонку Rexchrom Phenyl (4,6×250 мм, 5 мкм), со скоростью потока подвижной фазы 0,8 мл/минуту. Было использовано градиентное элюирование, сначала более 0,5 минут использовался 1 ОмМ формиат аммония с переходом на 5мМ формиат аммония, 25% метанол и 0,1% муравьиную кислоту (в течении 8 минут), в дальнейшем использовался 100% метанол и вода, для разделения аналитов (Wang, Z., E. Klipfell, B.J. Bennett et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease // Nature. - 2011. - V.472. - №7341. - P. 57-63.). В режиме анализа MSI положительных ионов, были получены аналиты с m/z 76, 104, 118. В качестве внутреннего стандарта использовался d9-TMAO. Количественное определение проводилось по калибровочной прямой.

Недостатки метода - трудоемкие и времязатратные процедуры пробоподготовки - использование в качестве внутреннего стандарта дейтерированного эталонного образца ТМАО, применение сложной комбинации состава растворителей для разделения биопробы.

Способ 4 - В 2013 году была усовершенствована методика определения уровня ТМАО в биологическом материале (Wang, Z., B.S. Levison, J.E. Hazen, L. Donahue, X.M. Li, S.L. Hazen Measurement of trimethylamine-N-oxide by stable isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry /Wang, Z., B.S. Levison, J.E. Hazen, L. Donahue, X.M. Li, S.L. Hazen // Anal Biochem. - 2014. - V. 455. - P. 35-40.). Анализ проводился с использованием ВЭЖХ с масс-спектрометром. Пробоподготовка включала в себя смешивание 20 мкл плазмы крови исследуемого с 10 мкМ внутреннего стандарта (d9-TMAO) в метаноле, количеством 80 мкл. С последующим центрифугированием в течение 10 минут на скорости 20000 об./мин, при температуре 4°C. Полученный супернатант ввели в колонку Luna silica (4,6 ×250 мм, 5 мкм) со скоростью подачи подвижной фазы 0,8 мл/минуту при градиентном элюировании. Прерывистый градиент использовался для лучшего разделения аналитов путем смешивания смеси элюента «А» (0,1% пропановая кислота в воде) с элюентом «В» (0,1% уксусная кислота в метаноле), в разном соотношении, начиная от 2% «В» линейно до 15% «В» в пределах 11 минут, затем линейно до 100% «В» в течение 5 минут с последующим возвратом к 2% «В». Искомое вещество мониторировалось с использованием электрораспылительной ионизации в режиме положительных ионов с множественным реакционным мониторингом (МРМ) с характерными продукционными переходами m/z 76→58 и 85→66 а.е.м. Время удерживания составило ≈ 9 минут, минимальный порог количественного детектирования составил 0,05 мкмоль, максимальный >200 мкмоль.

Недостатки метода - трудоемкие и времязатратные процедуры пробоподготовки, использование в качестве внутреннего стандарта дейтерированного эталонного образца ТМАО, применение сложной комбинации состава растворителей для разделения биопробы.

Способ 5 - Группа латвийских ученых разработала и провела валидацию метода для одновременного определения уровня ТМАО в комбинации с L-карнитином и его биологическим предшественником γ-бутиробетайном (ГББ) в человеческой плазме посредством ВЭЖХ/МС/МС (Grinberga, S., M. Dambrova, G. Latkovskis et al. Determination of trimethylamine-N-oxide in combination with 1- camitine and gamma-butyrobetaine in human plasma by UPLC/MS/MS // Biomed Chromatogr. - 2015. - V.29, №11. - P. 1670-1674.). Для пробоподготовки к 40 мкл плазмы приливалось 900 мкл раствора ацетонитрила и метанола (3:1 v/v) содержащего метчик (200 нг/мл). После центрифугирования (13000 об./мин, 10 минут) супернатант использовали для проведения анализа. Для разделения аналитов была использована система ВЭЖХ Acquity с колонкой Acquity HILIC VEN (2,1×50 мм, 1,7 мкм). Элюирование проводилось по градиентному принципу, от 75 до 55% ацетонитрила в 10 мМ водного раствора ацетата аммония (рН4), со скоростью ПФ 0,25 мл/мин. Аналиты мониторировались с использованием электрораспылительной ионизации в режиме положительных ионов с множественным реакционным мониторингом на тройном квадрупольном масс-спектрометре. Масс-спектрометр был настроен следующим образом: капиллярное напряжение 3,3 kv, температура источника и десольватации 120 и 350°C соответственно. Скорость потока азота 500 л/ч. Продукт-ионные переходы для ТМАО составили m/z 75,8→58,3, для L- карнитина m/z 146,11→87,11 и для ГББ m/z 175,44→86,0. Время детектирования ТМАО - 1,95 мин., L-карнитина - 1,85 мин., ГББ - 2,21 мин. Количественное определение проводилось по калибровочной прямой.

Недостатки метода трудоемкие и времязатратные процедуры пробоподготовки, дейтерирование эталонного образца ТМАО и исследуемых биопроб, применение сложной комбинации состава растворителей для разделения аналитов.

Способ 6 - Наиболее близким к заявленному изобретению является способ определения ТМАО, а также холина, бетаина, ТМА, который усовершенствовали Xueqing Zhao с соавторами (Zhao, X., S.H. Zeisel, S. Zhang Rapid LC-MRM-MS assay for simultaneous quantification of choline, betaine, trimethylamine, trimethylamine N-oxide, and creatinine in human plasma and urine // Electrophoresis. - 2015. - V.36. - №18. - P. 2207-2214.). Пробоподготовка проводилась следующим образом: подкисленный исследуемый материал (плазма, моча) экстрагировали и проводили дериватизацию с помощью трет-бутилового бромацетата в ацетонитриле и гидроксидом аммония в воде. После проведения центрифугирования, супернатант

переносили в вials для последующего анализа. Хроматографическое разделение проводилось на колонке Atlantis Silica HILIC (4,6×50 мм, 3 мкм). Температура колонки 40°C, скорость потока элюента 1 мл/мин. В качестве растворителя «А» использовали смесь ацетонитрила и воды (1:9) с 10 мМ формиата аммония и 0,125% муравьиной кислоты, растворитель «В» состоял из ацетонитрила и воды (9:1) с 10 мМ формиата аммония и 0,125% муравьиной кислоты. Использовалось градиентное элюирование. Аналиты и их соответствующие изотопы контролировали с помощью характерных ионных переходов: 104→45 для холина, 118→59 для бетаина, 174→59 для ТМА, 76→58 для ТМАО. Время удерживания для ТМАО составило 2,41 мин.

Недостатки метода - трудоемкие и времязатратные процедуры пробоподготовки, дейтерирование эталонного образца ТМАО и исследуемых биопроб, применение сложной комбинации состава растворителей для разделения аналитов.

Задачей изобретения является разработка простого, нетрудоемкого, специфического и высокочувствительного ВЭЖХ-МС/МС способа количественного определения уровня триметиламин N-оксида в плазме крови, пригодного для масштабного рутинного анализа клинических образцов для проведения ранней диагностики болезней системы кровообращения.

Технический результат заявляемого изобретения достигается тем, что разработанный способ количественного определения ТМАО включает экспресс-подготовку биологических образцов, которая позволяет нивелировать влияние биологической матрицы на получаемый результат и определять с необходимой точностью низкие концентрации аналита в надосадочной жидкости без применения трудоемких и времязатратных процедур: к 100 мкл плазмы приливают 600 мкл ацетонитрила с последующим центрифугированием на скорости 20000 об./мин в течение 10 минут, при температуре центрифуги 4°C. Супернатант, в количестве 100 мкл переносили в вials, к нему приливают 100 мкл воды. Полученный раствор вводят в хроматографическую систему, объем пробы 10 мкл. Далее проводят хроматографическое разделение и масс-спектральный анализ эталонного раствора ТМАО и исследуемых проб. Применение несложной системы доступных растворителей для разделения 0,125% раствора муравьиной кислоты в ацетонитриле (растворитель «А») и 0,125% раствора муравьиной кислоты в воде (растворитель «В») в соотношении 1:1 со скоростью подачи подвижной фазы 0,250 мл/мин в изократическом режиме, время удерживания ТМАО 2,1 мин., продолжительность хроматографирования одного образца в течение 5 минут, делает данный способ простым, нетрудоемким, экономичным и доступным для масштабного рутинного анализа клинических образцов.

Триметиламин N-оксид (ТМАО) является конечным продуктом метаболизма фосфатидилхолина, поступающего в организм с

пищей животного происхождения (в частности красное мясо, яичный желток, морепродукты), который под воздействием кишечной микробиоты метаболизируется до триметиламина (ТМА), тот в свою очередь с током крови попадает в печень, где при помощи фермента семейства флавиномоноксигеназы (ФМО3) окисляется до своей конечной формы ТМАО (рисунок 1) (Wang, Z., E. Klipfell, B.J. Bennett et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease // Nature. - 2011. - V. 472, №7341. - P. 57-63. Rak, K., D.J. Rader Cardiovascular disease: the diet-microbe morbid union // Nature. - 2011. - V. 472, № 7341.-P. 40-41.).

Исходно, в клинической практике, уровень ТМА и ТМАО в крови и моче рассматривался в качестве диагностического признака генетически обусловленного заболевания триметиламинурии (недостаточное синтезирование фермента ФМО3 в печени), а также в диагностике патологии почек. С позиции охраны окружающей среды, уровень ТМАО и других метиламинов, важен как компонент органического аэрозоля азота, в областях с повышенным уровнем этих веществ, влияющих на климат и здоровье человека в целом (Erupe, M.E., A. Liberman-Martin, P.J. Silva et al. Determination of methylamines and trimethylamine-N-oxide in particulate matter by non-suppressed ion chromatography // J. Chromatogr. A. - 2010. - V. 1217, №13. - P. 2070-2073.). Так же, ТМАО можно рассценивать как новый, условно модифицируемый фактор риска развития болезней системы кровообращения (Wang, Z., E. Klipfell, B.J. Bennett et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease // Nature. - 2011. - V. 472, №7341. - P. 57-63. Rak, K., D.J. Rader Cardiovascular disease: the diet-microbe morbid union // Nature. - 2011. - V. 472, №7341. - P. 40-41. Tang, W.W., Z. Wang, B.S. Levison et al. Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk // New England Journal of Medicine. - 2013. - V. 368, №17. - P. 1575-1584.), это тем более актуально, что данная группа заболеваний в мировом здравоохранении лидирует по заболеваемости и смертности во всем мире (Moran, A.E., G.A. Roth, J. Narula et al. 1990-2010 global cardiovascular disease atlas // Glob Heart. - 2014. - V. 9, №1. - P. 3-16.). По последним данным, контроль уровня ТМАО позволяет проводить мониторинг риска развития атеросклероза и его осложнений, а также оценивать эффективность лечения и профилактики, что может являться одним из компонентов персонализированной медицины.

Предлагаемый способ количественного определения уровня триметиламин N-оксида в плазме крови заключается в следующем, определение уровня ТМАО в плазме крови человека проводят методом ВЭЖХ/МС/МС на жидкостном хроматографе Agilent 1260 Infinity с масс-спектрометром. Пробоподготовку проводят следующим образом: аликвоту образца 100 мкл (плазмы) помещают в пробирку Эпендорф на 1,5 мл и добавляют 600 мкл ацетонитрила, проводят

вихревое перемешивание с последующим центрифугированием в течение 10 минут на скорости 20000 об./мин, при температуре 4°C, затем супернатант извлекают. 100 мкл супернатанта переносят в чистую пробирку Эпендорф на 1,5 мл, приливают 100 мкл деионизированной дистиллированной воды в виалу, проводят вихревое перемешивание. 0,5 мл полученной пробы переносят в виалу и помещают в автосамплер хроматографической системы для ввода в хроматограф.

Приготовление растворов стандартного образца триметиламин N-оксида:

Раствор №1. 1 мг (точная навеска) стандартного образца ТМАО помещают в мерный цилиндр вместимостью 10 мл и растворяют в смеси ацетонитрил/вода (1:1). Доводят объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивают.

Раствор №2. 1 мл раствора №1 помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора до метки тем же раствором и перемешивают.

0,5 мл раствора №2 переносят в виалу и помещают в автосамплер хроматографической системы для ввода в хроматограф.

По 10 мкл анализируемой пробы и раствора №2 стандартного образца ТМАО попеременно хроматографируют на жидкостном хроматографе с масс-спектрометром, получая не менее 3 хроматограмм для каждого из растворов в следующих условиях:

- защитная предколонка: Analutical Guard Column XDB C-18, 4,6×12,5 мм с размером частиц 5 мкм;

- аналитическая колонка, заполненная сорбентом ЛЮМЭКС Kromasil SIL, 80×2,1мм с размером частиц 5мкм;

- подвижная фаза: 0,125% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле - 0,125% раствор муравьиной кислоты в воде, соотношение растворителей 1:1, изократический режим элюирования;

- скорость подачи подвижной фазы 0,250 мл/мин;

- температура термостата колонки - 30°C;

- время анализа: 5 минут.

Время удерживания ТМАО составило 2,1±0,1 мин (Фиг. 2, 3).

Обработка результатов была выполнена с применением программного обеспечения Agilent Lab Advisor.

Количественное содержание ТМАО (X) в мг/мл в анализируемых образцах рассчитывают методом внешнего стандарта по формуле:

$$X = \frac{S \cdot m_0 \cdot 1 \cdot 0,6 \cdot 0,1 \cdot P}{S_0 \cdot 100 \cdot 100 \cdot V \cdot 0,1 \cdot 100};$$

где, S - площадь пика ТМАО на хроматограмме исследуемого образца плазмы крови;

S₀ - площадь пика на хроматограмме раствора стандартного образца ТМАО;

V - объем образца плазмы крови, мл;

m₀ - навеска стандартного образца ТМАО, мг;

P - процентное содержание ТМАО в стандартном образце ТМАО;

1 - аликвота раствора №1 стандартного образца ТМАО, мл;

0,1 - аликвота супернатанта, мл;

0,1; 0,6; 100; 100 - разведения, мл.

Характеристики разработанного способа количественного определения уровня триметиламин N-оксида в плазме крови, установленные в процессе его полной валидации, полностью соответствовали утвержденным национальным и международным требованиям (OECD/WHO по GLP, FDA, EMA), и служат подтверждением высокой специфичности, чувствительности, точности и воспроизводимости разработанного нами способа.

Экспресс-подготовка биологических образцов позволяет нивелировать влияние биологической матрицы на получаемый результат и определять с необходимой точностью низкие концентрации аналита в надосадочной жидкости без применения трудоемких и времязатратных процедур. Применение несложной системы доступных растворителей для разделения аналитов, продолжительность анализа одного образца в течение 5 минут, делает данный способ простым, нетрудоемким, экономичным и доступным для масштабного рутинного анализа клинических образцов.

Пример 1. Предложенный нами способ оценки уровня триметиламин N-оксида в организме человека был использован в масштабном, 350 определений, рутинном анализе клинических образцов плазмы крови для проведения ранней диагностики болезней системы кровообращения у населения Республики Казахстан в рамках НТП «Экологические риски и здоровье населения». Образцы крови были отобраны у городского и сельского населения Карагандинской области, в возрасте от 18 до 65 лет, давшие информированное согласие на участие в исследовании. Из исследования исключены беременные женщины, лица с тяжелыми неврологическими и психическими заболеваниями. Помимо определения уровня ТМАО, у исследуемых были изучены клинические и лабораторные показатели. По результатам исследования сформированы 2 группы лиц: с нормальным значением ТМАО и уровнем, превышающим нормальные показатели. Для определения референсных значений использованы данные литературы (Tang W. W., Wang Z., Fan Y. et al. Prognostic value of elevated levels of intestinal microbe-generated metabolite trimethylamine-N-oxide in patients with heart failure //Journal of the American College of Cardiology. - 2014. - V. 64, №18. - P. 1908-1914.; Senthong V., Li X.S., Hudec T. et al. Plasma trimethylamine N-oxide, a gut microbe-generated phosphatidylcholine metabolite, is associated with atherosclerotic burden //Journal of the American College of Cardiology. - 2016. - V.67, №22. - P. 2620-2628.). В последующем при анализе клинических и лабораторных данных, в группе лиц с уровнем ТМАО превышающим нормальные значения, диагностированы высокий и очень высокий суммарный сердечно-сосудистый риск (риск развития инфаркта миокарда и инсульта в

ближайшие 10 лет), выявлена корреляция с такими факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний как гиперхолестеринемия, избыточная масса тела, артериальная гипертензия, сахарным диабетом.

В процессе выполнения рутинного анализа клинических проб, использование данного способа позволило получить стабильные и воспроизводимые результаты, которые полностью соответствовали критериям приемлемости.

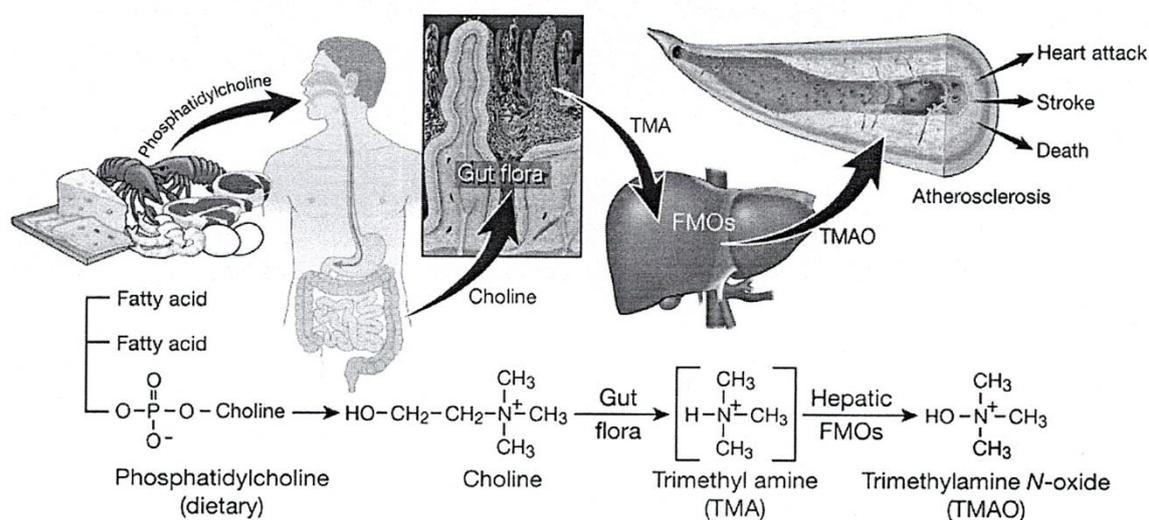
Таким образом, предлагаемый способ количественного определения уровня триметиламин N-оксида в плазме крови, за счет экспресс-подготовки биологических образцов (плазмы крови), которая позволяет нивелировать влияние биологической матрицы на получаемый результат и определять с необходимой точностью низкие концентрации аналита в надосадочной жидкости без применения трудоемких и времязатратных процедур, а также применение несложной системы доступных растворителей для разделения аналитов, продолжительность анализа одного образца в течение 5 минут, делает данный способ простым, нетрудоемким, экономичным и доступным для масштабного рутинного анализа клинических образцов.

Способ может найти применение в биохимической клинической лабораторной диагностике, как лабораторный метод прогнозирования болезней системы кровообращения у населения, позволяющий проводить мониторинг риска развития заболеваний системы кровообращения и их осложнений, а также оценивать эффективность лечения и профилактики,

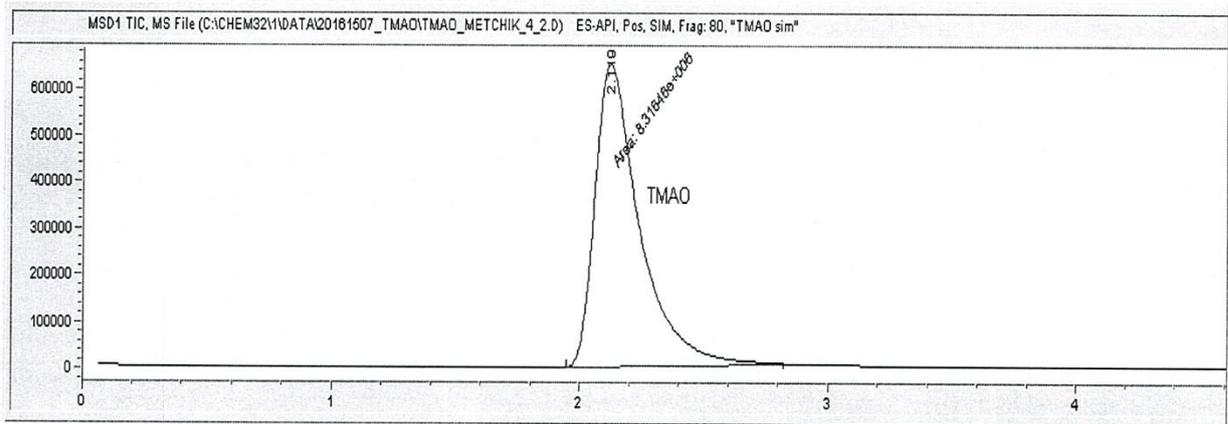
что может являться одним из компонентов персонализированной медицины.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

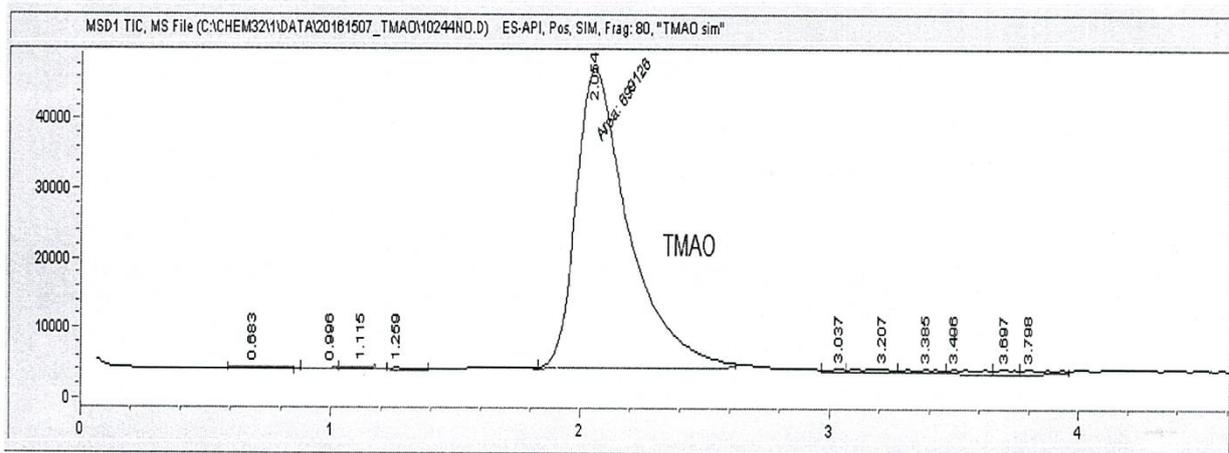
Способ количественного определения уровня триметиламин N-оксида в плазме крови, включающий пробоподготовку и анализ образцов методом tandemной высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием, отличающийся тем, что используют экспресс-подготовку биологических образцов: к 100 мкл плазмы приливают 600 мкл ацетонитрила с последующим центрифугированием на скорости 20000 об./мин в течение 10 минут, при температуре центрифуги 4°C, супернатант, в количестве 100 мкл переносят в виалу, к нему приливают 100 мкл воды, полученный раствор вводят в хроматографическую систему, объем пробы 10 мкл., далее проводят хроматографическое разделение и масс-спектральный анализ эталонного раствора ТМАО и исследуемых проб, применяют несложную систему доступных растворителей для разделения аналитов - 0,125% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле растворитель «А» и 0,125% раствор муравьиной кислоты в воде растворитель «В» в соотношении 1:1 со скоростью подачи подвижной фазы 0,250 мл/мин в изократическом режиме, время удерживания ТМАО 2,1 мин., продолжительность анализа одного образца в течение 5 минут.



Фиг. 1. Схема образования ТМАО в организме



Фиг. 2. Хроматограмма стандартного образца ТМАО



Фиг. 3. Хроматограмма исследуемого образца плазмы крови