

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГИГИЕНЫ,
ПРОФПАТОЛОГИИ И ЭКОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА»
ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА

На правах рукописи

ОРЛОВА Ольга Игоревна



ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АДДУКТОВ
АЛКИЛИРУЮЩИХ АГЕНТОВ С ДНК И АЦЕТИЛЦИСТЕИНОМ В БИОПРОБАХ

Специальность 02.00.02 – аналитическая химия

Диссертация
на соискание учёной степени кандидата химических наук

Научный руководитель
д.х.н., Савельева Е.И.

Санкт-Петербург,
2019

ОГЛАВЛЕНИЕ.....	2
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
1.1 Химический анализ как инструмент биомониторинга	10
1.2 Аддукты цитостатиков с ДНК как аналиты в методиках для диагностики и бимониторинга	13
1.3 Роль масс-спектрометрии в определении ДНК-аддуктов	20
1.4 Методы определения аддуктов с ДНК на примере сернистого иприта	21
1.4.1 Постлейблинг – метод пост-введения радиоактивного изотопа....	23
1.4.2.Иммуноанализ	24
1.4.3 Флуоресцентный анализ.....	24
1.4.4 Газовая хроматография-масс-спектрометрия	25
1.4.5 Высокоэффективная жидкостная хроматография-масс- спектрометрия.....	26
1.5 Методы выделения ДНК.....	31
1.6 Методы гидролиза ДНК.....	38
1.7 Методы определения аддуктов ДНК с цитостатиками на примере циклофосамида	40
1.7.1 Существующие методы определения аддуктов ДНК с ЦФА и другими препаратами ряда оксафосфоринов	43
1.8 Применение N-ацителлцистеина (АЦЦ) в качестве сквенджера.....	44
2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	48
2.1 Синтез стандартного образца N7-[2-[(2-гидроксиэтил)тио]этил]- гуанина.....	48
Синтез N7-[2-[(2-гидроксиэтил)тио]этил]-гуанина	48

2.1.1. Подтверждение структуры и чистоты синтезированного образца N7-НЕТЕГ	49
2.1.2 Очистка синтезированного образца N7-НЕТЕГ	50
2.1.3 Оптимизация условий масс-спектрометрического детектирования N7-НЕТЕГ. Определение характеристичных продукт-ионов	50
2.2 Разработка методики определения N7-НЕТЕГ в моче	51
2.3 Разработка методики определения N7-НЕТЕГ в крови	54
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	55
3.1 Выбор основного биомаркера воздействия сернистого иприта на ДНК	55
3.1.1. Синтезированный образец N7-НЕТЕГ в качестве аналитического стандарта	57
3.1.2 Подтверждение структуры и чистоты синтезированного образца N7-НЕТЕГ	58
3.1.3. Процедура очистки стандартного образца N7-НЕТЕГ	59
3.2 Разработка методик определения N7-НЕТЕГ в моче и крови.....	63
3.2.1 Методика определения N7-НЕТЕГ в моче	63
3.2.2 Методика определения N7-НЕТЕГ в крови.....	65
3.3 Апробация методик определения N7-НЕТЕГ в моче и крови при анализе биообразцов, полученных в экспериментах <i>invivo</i>	66
3.4 Разработка и апробация методики совместного определения аддуктов сернистого иприта с ДНК и АЦЦ в моче	68
3.4.1 Модификация разработанной методики определения N7-НЕТЕГ в моче.....	71
3.4.2 Апробация разработанной методики в опыте <i>in vivo</i>	75

3.5 Адаптация разработанной методики для определения аддуктов ДНК с другими цитостатиками на примере циклофосфида.	78
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	82
ВЫВОДЫ.....	87
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	89

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

АИ - азотистый иприт

АЦЦ – N-ацетилцистеин

БОВ – боевые отравляющие вещества

ВЭЖХ-МС – жидкостная хроматография-масс-спектрометрия

ВЭЖХ-МС/МС – тандемная жидкостная хроматография-масс-спектрометрия

ВЭЖХ-ЭС-МС/МС - тандемная высокоэффективная жидкостная хроматография с ионизацией в электроспрее

ГХ-МС – газовая хроматография-масс-спектрометрия

ОВ – отравляющие вещества

ТХ – токсичные химикаты

СБАЦЭ – 1,1'-сульфонилбис[2-S-(N-ацетилцистеинил) этан

СИ-АЦЦ – аддукт сернистого иприта с ацетилцистеином

ТФЭ – твердофазная экстракция

УВЭЖХ-МС/МС – ультрабыстрая тандемная жидкостная хроматография-масс-спектрометрия

ФИ - фосфорамид-иприт

ЦФА – циклофосфамид

N7-HETEG - N7-гидроксиэтилтиоэтил гуанин

G-NOR - N-[2-(N7-гуанинил)этил]-N-[2-хлорэтил]-амин

G-NOR-G - N,N-bis[2-(N7-гуанинил) этил] амин

G-NOR-OH - N-[2-(N7-гуанинил)этил]-N-[2-гидроксиэтил]-амин

ВВЕДЕНИЕ

Химико-аналитические процедуры в токсикологической экспертизе постепенно трансформируются, отвечая на запрос нового системного подхода к анализу биологических объектов, охватывающего множество токсикологических взаимодействий, протекающих внутри живых организмов, находящихся под влиянием химических факторов. Важной задачей аналитической химии в токсикологической экспертизе является достоверное установление факта воздействия токсичных химикатов (ТХ) на организм человека или животного на основании результатов идентификации этих соединений или продуктов их трансформации (метаболитов) в биологических жидкостях или тканях. Измерение концентраций ТХ и их метаболитов в биосредах традиционно проводится в целях исследования токсикокинетики ТХ, оценки дозы воздействия. Если определяемый аналит является биомаркером не только воздействия ТХ, но и глубины наносимых повреждений, химический анализ становится средством изучения токсикодинамики, а также эффективности детоксикации с помощью антидотов или скавенджеров. По мере развития гибридных хромато-спектральных методов увеличивается объем знаний о взаимодействии ТХ с биомолекулами. Наряду с малыми молекулами в качестве аналитов рассматриваются биомолекулярные аддукты ТХ. С появлением МАЛДИ масс-спектрометрии в биоаналитической химии стало развиваться новое направление – аддуктомика. По мере опережающего развития высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) объектами анализа все чаще становятся ферментные перевары биопроб, содержащие фрагментированные аддукты. Фрагментирование аддуктов биомолекул с ксенобиотиками происходит и в организме (в печени, почках и других органах) в процессе их почечной экскреции. По этой причине моча во многих случаях является наиболее информативным объектом для ВЭЖХ-МС/МС анализа.

Молекулярные процессы взаимодействия ксенобиотиков с нуклеиновыми кислотами (ДНК, РНК) изучены далеко не в полной мере. Появление высокочувствительных аналитических приборов и разработка аналитических

методик позволяют на молекулярном уровне исследовать образование, устойчивость и репарацию аддуктов химических соединений с ДНК. Современные аналитические методики определения аддуктов ксенобиотиков с ДНК в биообразцах необходимы для изучения механизмов мутагенного и канцерогенного эффектов. Аддукты отравляющих веществ с ДНК входят в перечень аналитов, подлежащих определению в ежегодных международных квалификационных тестах Организации по запрещению химического оружия (ОЗХО), однако до настоящего времени ни одна из лабораторий-участников не представила соответствующих процедур, обоснованных аналитических методик и результатов в своих отчетах. Иприты и, в частности, сернистый иприт, как наиболее изученный алкилирующий агент с позиций его повреждающего воздействия на ДНК, могут рассматриваться в качестве оптимальной экспериментальной модели в аналитических исследованиях, направленных на разработку и применение методик определения биомолекулярных аддуктов в биопробах, в том числе и в условиях терапии скавенджерами. Применение скавенджеров влияет на концентрации и формы существования аналитов, определяемых в биопробах, что необходимо учитывать при разработке аналитических методик.

Идентификация и определение аддуктов сернистого иприта с ДНК позволят более достоверно оценивать степень повреждения генетического материала и устанавливать связи между образованием аддуктов и биологическими показателями. На базе ипритов разработан ряд лекарственных препаратов, обладающих выраженным цитостатическим эффектом, важнейшим из которых до настоящего времени остается циклофосфамид (ЦФА). Актуальной задачей является изучение степени и характера химических взаимодействий между алкилирующим агентом, протектором (скавенджером) и внутренними системами организма. Реализация этой задачи требует достоверного аналитического обеспечения. В качестве одного из наиболее эффективных и безопасных скавенджеров в настоящее время рассматривается ацетилцистеин (АЦЦ). В то же время, одним из основных мочевых метаболитов сернистого иприта является его

аддукт с АЦЦ. Естественно предположить, что терапия АЦЦ будет влиять на образование и кинетику выведения аддукта сернистого иприта с АЦЦ. Отсутствие валидированных методик для определения аддуктов сернистого иприта с ДНК и АЦЦ в биопробах, как и общего подхода к определению депурированных аддуктов алкилирующих агентов с ДНК, обуславливают **актуальность цели** настоящей работы, которая заключалась в разработке аналитической схемы хроматомасс-спектрометрического анализа биологических образцов и методического обеспечения молекулярного биомониторинга генотоксического действия алкилирующих агентов на примере сернистого иприта в условиях терапии скавенджером (ацетилцистеином).

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Обоснование и выбор оптимального биомаркера в ряду аддуктов сернистого иприта с ДНК;

2. Изучение возможности синтеза стандартного образца выявленного биомаркера;

3. Разработка методики определения выявленного аддукта сернистого иприта с ДНК в моче и крови - N7-(2-гидроксиэтилтиоэтил)-2'-гуанина (N7-НЕТЕГ);

4. Оценка возможности совместного определения выявленного аддукта сернистого иприта с ДНК и продукта взаимодействия сернистого иприта с белками и скавенджером - *1,1'-сульфонилбис[2-S-(N-ацетилцистеинил)этан]а*(СБАЦЭ) в оптимальной биоматрице;

5. Апробация разработанной методики при анализе мочи лабораторных животных, экспонированных сублетальной дозой сернистого иприта в условиях терапии скавенджером и в отсутствие терапии;

6. Изучение возможности применения разработанной аналитической схемы для целей биомониторинга воздействия других цитостатиков на примере циклофосфида (ЦФА, 2-[бис-(2-хлорэтил)амино]-тетрагидро-2Н-1,3,2-оксазафосфорин-2-оксида).

Научная новизна работы определяется тем, что:

Разработана методика совместного определения наиболее значимого аддукта сернистого иприта с ДНК (N7-НЕТЕГ) и белками (СБАЦЭ) в моче, позволяющая на молекулярном уровне установить биомаркеры воздействия сернистого иприта на ДНК и оценить повреждения организма. Подобраны условия анализа проб мочи, позволившие в эксперименте *in vivo* изучить кинетику экскреции N7-НЕТЕГ и СБАЦЭ: определены масс-спектрометрические характеристики аналитов, установлена стабильность выявленного биомаркера.

Показана возможность определения кинетических профилей аддуктов ДНК с лекарственными препаратами алкилирующего действия на примере ЦФА. Определены основные продукты взаимодействия активного метаболита ЦФА с ДНК, получены их масс-спектральные характеристики. Предложена аналитическая схема изучения кинетики выведения аддуктов ЦФА с ДНК в условиях терапии АЦЦ и в отсутствие терапии.

Практическая значимость работы отвечает как задачам международных исследований Организации по запрещению химического оружия фактов незаконного применения боевых отравляющих веществ, так и задачам клинической токсикологии и химиотерапии онкологических заболеваний.

Предложенные методики анализа позволили на молекулярном уровне оценить повреждения ДНК вследствие воздействия алкилирующего агента, а также сделать выводы о влиянии скавенджера на объем наносимых повреждений и кинетику выведения аддуктов ксенобиотиков с ДНК. Данный факт имеет значимость при проведении терапии поражений сернистым ипритом, а также при оценках сроков воздействия при проведении расследования возможных инцидентов с применением химического оружия. Показана возможность переноса методики в медицинскую область для определения аддуктов ДНК с лекарственными препаратами, обладающими алкилирующим действием. Методики обеспечивают возможность персонализированного подхода к терапии и детоксикации.

Разработанные методики определения аддуктов сернистого иприта с ДНК и ацетилцистеином в моче включены в сборник рабочих процедур «Лаборатории химико-аналитического контроля и биотестирования» как часть научно-методического обеспечения участия российских лабораторий в международных профессиональных тестах ОЗХО по анализу биопроб.

1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Химический анализ как инструмент биомониторинга

Средствами химического анализа возможно предсказать потенциальные токсические эффекты алкилирующих агентов, произвести максимально точную и целостную оценку полученных организмом внешних воздействий, а также выявить влияние взаимодействий факторов внешней среды и генетического материала на этиологию заболеваний [1]. На настоящий момент общепризнанным является тот факт, что понимание причины возникновения экологически обусловленных заболеваний невозможно без рассмотрения отклика организма на внешние токсические воздействия. Идентификация токсичных химикатов (ТХ), поступающих в организм из внешних источников (загрязнения воздуха и воды, радиация, пища, лекарственные препараты и проч.) должна проводиться совместно с определением эндогенных продуктов их метаболизма [2].

Биомониторинг призван устранить неопределенность при оценке воздействия химического фактора, которая неизбежно возникает при использовании косвенных методов, опирающихся на расчетные подходы и не способных учитывать индивидуальные особенности организма, реальный сценарий поступления токсиканта и многие другие параметры. Поэтому биомониторинг может рассматриваться как основной инструмент для оценки тяжести и характера воздействия поражающего фактора (в частности, химического) на организм человека [3].

В качестве биомаркера воздействия может выступать экзогенное соединение (или его метаболит), продукт взаимодействия между соединением (или метаболитом) и эндогенным компонентом, либо другое событие, связанное с

воздействием. Обычно при определении биомаркеров воздействия стабильных соединений производят измерение концентрации этого соединения в соответствующих биологических образцах, таких как кровь, сыворотка или моча. В случае летучих химических веществ, можно оценить их концентрацию в выдыхаемом воздухе (после ингаляции воздуха, не содержащего загрязнителей). Если соединение активно метаболизируется в организме, в качестве биомаркеров воздействия могут быть выбраны один или несколько метаболитов; метаболиты чаще всего определяют в образцах мочи[4].

Результаты многолетних количественных химико-аналитических определений, проводившихся в контексте «биологического мониторинга», используются для оценки экспозиции работающих на производстве, а в клинических условиях — для оценки эффективности применения лекарственных средств. Полученные при этом показатели, или биомаркеры, позволяющие установить связь между экспозицией к веществу, его внутренней дозой и нарушением здоровья, представляют большую ценность при оценке риска.

В рамках мониторинга с помощью аналитического определения биомаркеров можно подтверждать экспозицию индивидов в данной популяции к определенному веществу [5].

Общепризнано [6, 7], что биомаркеры играют важнейшую роль в оценке воздействия на организм человека экзогенных токсикантов. На схеме (рисунок 1), составленной на основе источника [8], показано, что биомаркеры могут быть использованы на любой стадии токсикологического процесса, начиная от измерения внешней дозы токсиканта как индикатора воздействия и заканчивая изменениями функционирования клеток как биомаркера эффекта. Все приведенные на рисунке биомаркеры являются важными характеристиками биологических процессов в конкретных обстоятельствах. Например, биомаркеры в правой части схемы характеризуют влияние ТХ на здоровье, в то время как биомаркеры в левой части дают информацию о природе ТХ, его источнике и концентрации.



Рисунок 1 – Оценка риска с помощью биомаркеров воздействия и эффекта

Современные методы химического анализа позволяют определить изменения в структуре ДНК или других макромолекул, вызываемые связыванием с химически активными веществами. Эти методы приобретают исключительно важное значение в исследовании биомаркеров, при этом более низкие пороги определения и повышенная достоверность анализов делают их использование более эффективным. Особенную актуальность такие исследования имеют в области биомаркеров воздействия мутагенных химических веществ. Эти соединения являются химически активными и образуют аддукты с такими макромолекулами, как белки и ДНК. Аддукты с ДНК могут быть обнаружены в клетках крови или тканях биопсий, а специфические фрагменты ДНК могут выводиться с мочой. Аддукты можно определять с помощью таких чувствительных методов, как высокоэффективная жидкостная хроматография, а также ряда иммунологических методов.

Оценка биомаркеров воздействия должна проводиться с учетом времени и характера воздействия и применительно к различным отделам (компартаментам) организма. Так, для правильной интерпретации результата, степень, с которой измеренная концентрация биомаркера соотносится с имевшим место фактом воздействия и оценка аккумулированной нагрузки на организм, должна определяться на базе токсикокинетических данных. Также следует учитывать

содержание биомаркера в конкретных органах-мишенях. Хотя образцы крови часто используются в исследованиях, периферийная кровь, как правило, не рассматривается как компартмент как таковой, хотя она выступает как средство переноса между компартментами. Зависимость между концентрацией в крови различных химических веществ и их содержанием в различных органах варьирует в широком диапазоне и обычно зависит от длительности воздействия и времени, прошедшего с момента воздействия [9]. В этой связи следует уделить особое внимание использованию широко употребляемых в современной медицине сквенджеров, т.е. препаратов, способных смягчить токсическое воздействие ОВ и изменить кинетику их элиминации.

1.2 Аддукты цитостатиков с ДНК как аналиты в методиках для диагностики и бимониторинга

В работе [10] отмечается, что аддукты с ДНК являются идеальными биомаркерами для оценки воздействия ТХ на организм человека. Измерение содержания ДНК-аддуктов используется для установления ПДК токсичных промышленных соединений, а также для оценки риска канцерогенеза [11, 12]. Развитие приборной базы позволило сделать шаг в направлении нецелевого скрининга ковалентных аддуктов ДНК методом тандемной ВЭЖХ-МС [13].

Аддукты с ДНК представляют собой важную категорию биомаркеров для детектирования и контроля воздействия потенциальных канцерогенных и генотоксичных соединений, а также мероприятий по оценке риска [14]. Традиционно такие оценки проводились на основе измерений, проводимых при воздействии высоких доз ТХ, а также на основе теоретических моделей. Для оценки повреждений, нанесенных организму в результате воздействия какого-либо генотоксичного ТХ и, соответственно, оценки риска, необходимо учесть такие процессы, как абсорбция ТХ организмом, метаболизм, процессы детоксикации и репарации ДНК. Измерение концентрации ДНК-аддуктов и выявление связи концентрации аддукта с полученной дозой позволяет учесть все эти факторы. Таким образом, количественное определение ДНК-аддуктов

токсичных веществ является мощным инструментом биомониторинга и представляет собой обширное поле для исследований, позволяющих проникнуть в суть процесса канцерогенеза [15]. Как правило, содержание аддуктов с ДНК в биопробах находится на крайне низком уровне, что делает необходимым наличие чувствительных и специфичных методов определения.

Изучение строения и количественного содержания аддуктов имеет важное значение не только для целей биомониторинга, но также вносит существенный вклад в получение фундаментальных знаний о механизме токсического действия химических соединений. Авторы [16] отмечают, что изучение аддуктов с ДНК способно пролить свет на механизм проявления генотоксичных свойств актуальных ТХ. Задачи подобного рода решаются на настоящий момент с помощью методов масс-спектрометрии.

Ряд ТХ вступает в непосредственное взаимодействие с ДНК, образуя аддукты, другим же соединениям требуется предварительная метаболическая активация. Источников поступления в организм генотоксичных соединений множество, начиная от ежедневного воздействия эко- или промышленных токсикантов до веществ, получаемых с медицинскими препаратами (химиотерапия) или табачным дымом. Установлено [17], что некоторые генотоксичные вещества имеют эндогенное происхождение, являясь продуктами метаболизма. На настоящий момент принято выделять несколько основных классов химических соединений, способных образовывать аддукты с ДНК: полиароматические углеводороды [18], эстрогены [19], нитрозоамины [20]. В зависимости от источника получения, генотоксичные ТХ можно условно поделить на: канцерогены табачного дыма [21]; продукты перекисного окисления липидов [22], гетероциклические ароматические амины [23], входящие в состав автомобильных выхлопов [24].

Согласно определению NIH Study Group [25], биомаркер представляет собой объективно измеренную и оцененную характеристику, являющуюся индикатором нормального физиологического процесса, патологического процесса, либо фармакологического отклика на проводимую терапию. Сегодня

термин чаще всего употребляется в контексте «молекулярный» или «клеточный» биомаркер, фокусируясь на небольшой подгруппе биомаркеров, характеризующих роль реакционноспособных молекул, образующих аддукты с ДНК, которые, в свою очередь, считаются вовлеченными в процесс канцерогенеза, а также аддуктах с белками и мочевых метаболитах. Эта группа определяется как *биомаркеры воздействия*.

Образование аддуктов с ДНК в случаях, когда репликация происходит до момента репарации, может приводить к мутациям ДНК. Мутация на геномном или хромосомном уровне, представляет собой необратимые изменения в структуре ДНК, изменяющие генную информацию. В отличие от образования аддуктов, мутация не подвергается процессам репарации и передается по наследству потомкам первоначальной мутировавшей клетки. Мутации в таком случае являются *биомаркерами эффекта* [26].

Исследование молекулярных биомаркеров является важной частью системы оценки риска возникновения онкологических заболеваний [27, 28]. Так, исследование соотношения доза-эффект для аддуктов ТХ с ДНК и белками способно значительно расширить диапазон контролируемых параметров для оценки риска.

Появление высокочувствительных методов анализа сделало возможным определение структуры и количественного содержания аддуктов, изучение скорости их выведения и процессов репарации ДНК. Обнаружение ковалентного связывания вещества (или его метаболитов) с ДНК имеет важное значение для выявления его канцерогенного действия. Такие способы оценки риска получили название «молекулярная дозиметрия» (molecular dosimetry). Масштабные исследования в этой области проводились на примере изучения афлатоксина В1 (AFB1), способного образовывать аддукты с ДНК по положению N-7 гуанина. Исследования на крысах и людях подтвердили образование аддукта, возможность его депуринизации вследствие процессов репарации ДНК с последующим выведением из организма с мочой, а также возможность образования персистентных формамидопиримидиновых аддуктов (FAPY adduct), которые

обладают мутагенными свойствами [29]. Полученные данные позволили авторам [30] предположить, что снизить молекулярную дозу ДНК-аддуктов возможно путем детоксикации метаболита афлатоксина, 8,9-эпокси-АФВ1 с помощью глутатиона-S (GST) путем выделения их с мочой в виде афлатоксиновых меркаптатов. Дальнейшее развитие этой теории позволило распространить ее на другие цитостатики. Таким образом, молекулярная дозиметрия является мощным инструментом, позволяющим снизить токсичность и предотвратить тяжелые повреждения, возникающие при воздействии ТХ, обладающих цитотоксическим действием.

Развитие направления молекулярной дозиметрии способно сделать существенный вклад в процедуру оценки риска. Исследования в этой области позволяют установить закономерности доза-эффект для большого количества ТХ, способных образовывать ковалентные аддукты с ДНК и создавать протоколы по оценке воздействия (по аналогии с оценкой онкогенности). Молекулярная доза включает в себя такие процессы, как абсорбция, распределение, метаболизм, детоксикация, репарация ДНК, схематично эта концепция изображена на рисунке2, цитируемом из источника [26]. При этом те же авторы указывают, что зависимость количества образовавшихся аддуктов от степени воздействия может быть как линейной, так и нелинейной в области высоких доз ТХ.

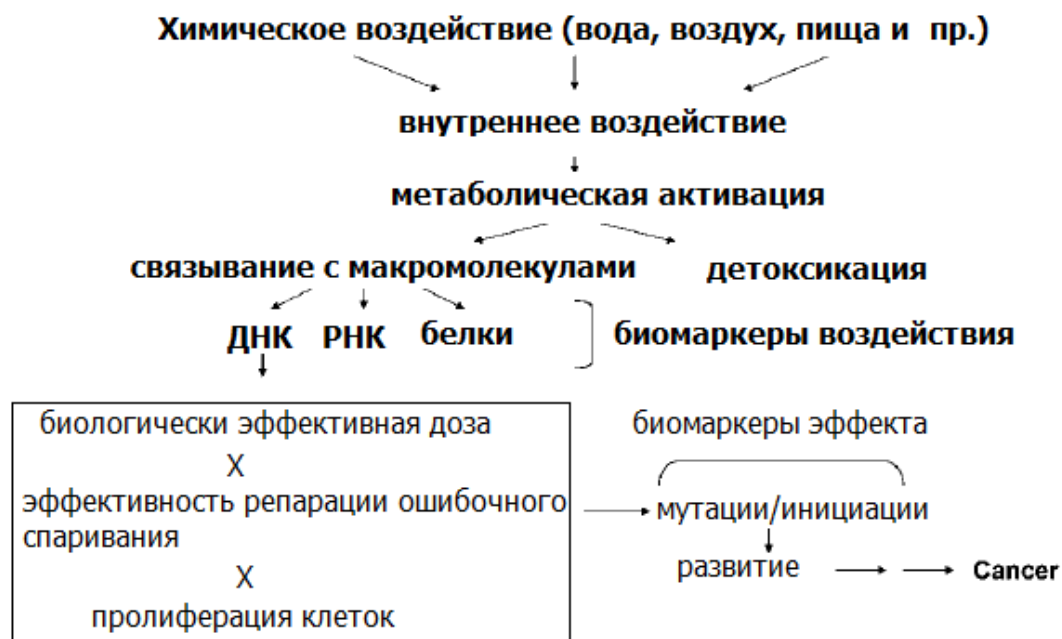


Рисунок 2 – Схематичное пошаговое изображение процессов, вносящих вклад в понятие молекулярной дозы биомаркеров воздействия и эффекта.

Таким образом, на настоящий момент не подвергается сомнению, что использование аддуктов токсичных соединений с ДНК в качестве биомаркеров воздействия обладает большим положительным потенциалом в системе оценки риска. Более того, поскольку ДНК-аддукты представляют собой ту часть дозы генотоксичного вещества, которая успешно прореагировала с молекулой ДНК конкретного индивидуума, они могут выступать как биомаркеры биологически эффективной дозы определенного генотоксиканта по отношению к конкретному индивидууму[31, 32]. Целостная оценка всех типов ДНК-аддуктов и их содержания (картирование) является мощным инструментом, помогающим в оценке биологического эффекта генотоксичных соединений.

На распределение ДНК-аддуктов по клеткам и тканям оказывают влияние несколько параметров (молекулярный сайт, по которому произошло прикрепление, химическая стабильность образовавшегося соединения). Неустойчивые электрофильные метаболиты ТХ способны формировать аддукты в локальной области метаболической активации, в то время как стабильные

метаболиты способны циркулировать с кровью, образуя аддукты в различных тканях организма. Период полураспада у различных ДНК-аддуктов может достаточно сильно различаться в зависимости от химической стабильности вещества, процессов репарации ДНК и фактов клеточной смерти. Молекулярная доза также определяется органом-мишенью. Так, в литературе [33, 34] есть данные о том, что, при воздействии ТХ, Об-алкилгуанины, образующиеся в печени, где за процессы репарации отвечают гепатоциты, более активно подвергаются репарации, чем в мозге, где процессы восстановления протекают значительно менее интенсивно. Таким образом, в случае однократного воздействия, молекулярная доза аддукта будет значительно снижаться со временем в тканях, способных к самовосстановлению, и будет относительно стабильной в других тканях организма.

Несмотря на отсутствие каких-либо общих структурных элементов, характерных для генотоксичных ТХ, на настоящий момент разработана некая общая концепция, согласно которой большинство ТХ должны либо проявлять электрофильные свойства, либо метаболизироваться с образованием активной электрофильной частицы [35]. Пуриновые и пиримидиновые основания ДНК содержат нуклеофильные сайты, являющиеся мишенью для таких ТХ, причем степень сродства к конкретному сайту определяется структурой ТХ. Так, наиболее реакционноспособными центрами являются атомы азота аденина и гуанина, в частности, наиболее часто реакции протекают по N2, N-3, O6, N-7 и C-8 атомам гуанина, N-1, N-3, N6 и N-7 аденина, O2, N-3 и N4 цитозина и O2 и O4 тимина, рисунок 3 [35].

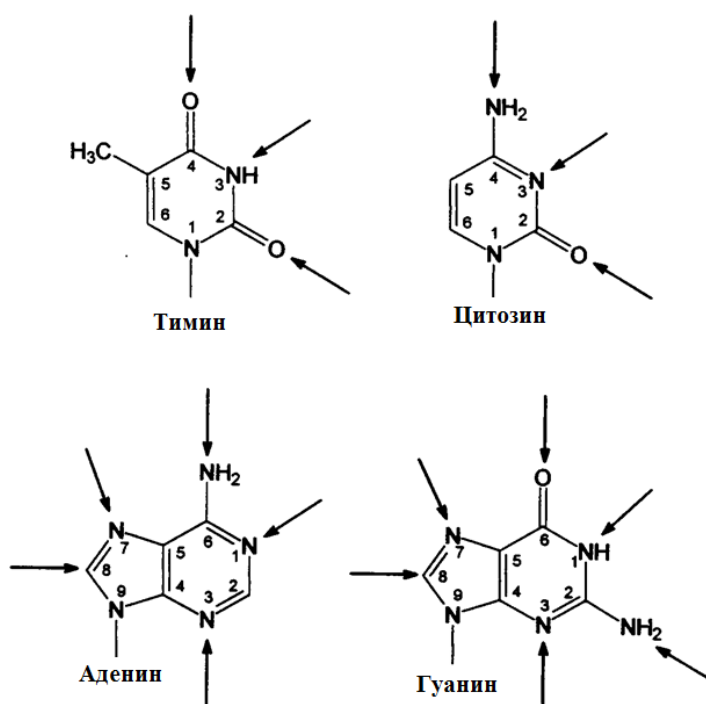


Рисунок 3 – Нуклеофильные сайты оснований ДНК

Поскольку содержание аддуктов в исследуемом биоматериале коррелирует с полученной дозой токсиканта, количественная оценка содержания аддуктов ДНК является важной составляющей в процедуре оценки риска возникновения опухолей.

Таким образом, аддукты ТХ с ДНК могут быть ценными источниками информации: а) о самом факте воздействия ТХ на организм; б) о величине молекулярной дозы, т.е. канцерогенного риска. Накопленные на настоящий момент знания, основанные на исследовании канцерогенеза отдельных генотоксичных ТХ на животных, позволяют сделать вывод, что, хотя отношение полученная доза/образовавшийся аддукт имеет сложную природу, в области малых доз зависимость в большинстве случаев носит линейный характер. Таким образом, определение количества образовавшихся в результате экспозиции аддуктов позволяет предсказать биологически эффективную дозу ТХ, полученную организмом.

Применение полученных знаний к исследованиям на людях вызывает ряд затруднений, связанных, главным образом, с выбором биоматрицы. Для выделения ДНК в количествах, обеспечивающих возможность представительного

анализа, требуется достаточно большой объем образца. Если же говорить о тканях, то возможное количество отобранной пробы варьируется в пределах 100 мкг. В то же время, степень образования аддуктов при имевшем место воздействии ТХ может составлять 1 случай на 10^8 нуклеотидов, что означает, что выделенный образец ДНК содержит лишь 1 пг связанного в аддукт нуклеотида. Предпочтительной матрицей является кровь и моча. Причем, последняя имеет преимущество, связанное с отсутствием необходимости стадии выделения и гидролиза ДНК, поскольку аддукты содержатся в ней уже в депуринизированном виде.

Масс-спектрометрия играет важнейшую роль в характеристике и количественной оценке аддуктов ТХ с ДНК.

1.3 Роль масс-спектрометрии в определении ДНК-аддуктов

На протяжении многих лет, для определения ДНК-аддуктов использовался метод метода постстведения радиоактивного изотопа ^{32}P (постлейблинга). Он обеспечивал высокую чувствительность, однако довольно часто давал ложноположительный результат или артефакты другого рода[15]. Масс-спектрометрические методы детектирования способны не только обеспечить достоверную идентификацию аддукта, но и предоставить информацию о структуре соединения[36]. На настоящий момент масс-спектрометрия является общепризнанным методом, позволяющим произвести высокоточные определения как качественного, так и количественного содержания ДНК-аддуктов в биологическом образце [37]. В подавляющем большинстве публикаций на тему определения аддуктов ТХ с ДНК используется техника ВЭЖХ-МС/МС с ионизацией в электроспрее [38, 39, 11, 15, 40].

Весомым преимуществом масс-спектрометрических методов является как возможность детектирования целевых ДНК-аддуктов, так и нецелевой скрининг, проводящийся в режиме полного сканирования в широком диапазоне масс. Целевое определение ДНК-аддуктов (т.н., «профилирование», «profiling») заключается в детектировании известных типов аддуктов, когда масс-

спектрометр сканирует только по определенным массам, отбрасывая все остальные части диапазона. В ходе нецелевого анализа (метод «отпечатков пальцев», «fingerprinting»), детектируются все присутствующие в пробе компоненты [41]. Анализируя данные полного сканирования масс-спектра пробы биологического образца, можно делать предположения о присутствии/отсутствии различных ДНК-аддуктов, как известных, так и неизвестных, а также получить другую значимую информацию о составе пробы. Целевому определению ДНК-аддуктов соответствует восходящий подход, в то время как нецелевое картирование (фингерпринтинг) ДНК-аддуктов имеет в своей основе нисходящий принцип.

В ряду доступных типов масс-спектрометров, авторы [37] выделяют приборы с орбитальной ловушкой (Orbitrap), обеспечивающие высокое (до 100000) разрешение, как наиболее перспективные для исследований в области ДНК-аддуктомики. ДНК-аддуктомика является новым, весьма перспективным направлением, позволяющим произвести оценку риска канцерогенности и установить молекулярную дозу воздействия ТХ на организм. Существующие подходы позволяют проводить не только целевой анализ ДНК-аддуктов, но также осуществлять скрининговое исследование присутствующих в пробе аддуктов ДНК.

1.4 Методы определения аддуктов с ДНК на примере сернистого иприта

Установлено, что на клеточном уровне иприты и активные промежуточные продукты их метаболизма взаимодействуют с нуклеофильными группами молекул клеточных мембран и внутриклеточных структур, вызывая их алкилирование[42]. Основными функционально значимыми мишенями являются белки и нуклеиновые кислоты. Взаимодействием с белками можно объяснить ингибиторную активность ипритов в отношении ряда ферментов: гексокиназы, холинацетилазы, ацетилхолинэстеразы, супероксиддисмутазы и т.д. Однако особое значение придают их повреждающему действию на дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК), формирующие генетический код

клетки. В этой связи иприты относят к группе генотоксикантов (вещества, повреждающий генетический код) [43]. Несмотря на относительно высокий для БОВ ПДК ($2 \cdot 10^{-4}$ мг/м³ в воздухе рабочей зоны, для сравнения для вещества Vx этот показатель составляет $5 \cdot 10^{-6}$ мг/м³), при поражении ипритом на первый план выходят отставленные последствия, связанные с его канцерогенными свойствами. На рисунке представлена схема присоединения сернистого иприта по N7-положению гуанина в ДНК, составленная на основе источника [44].

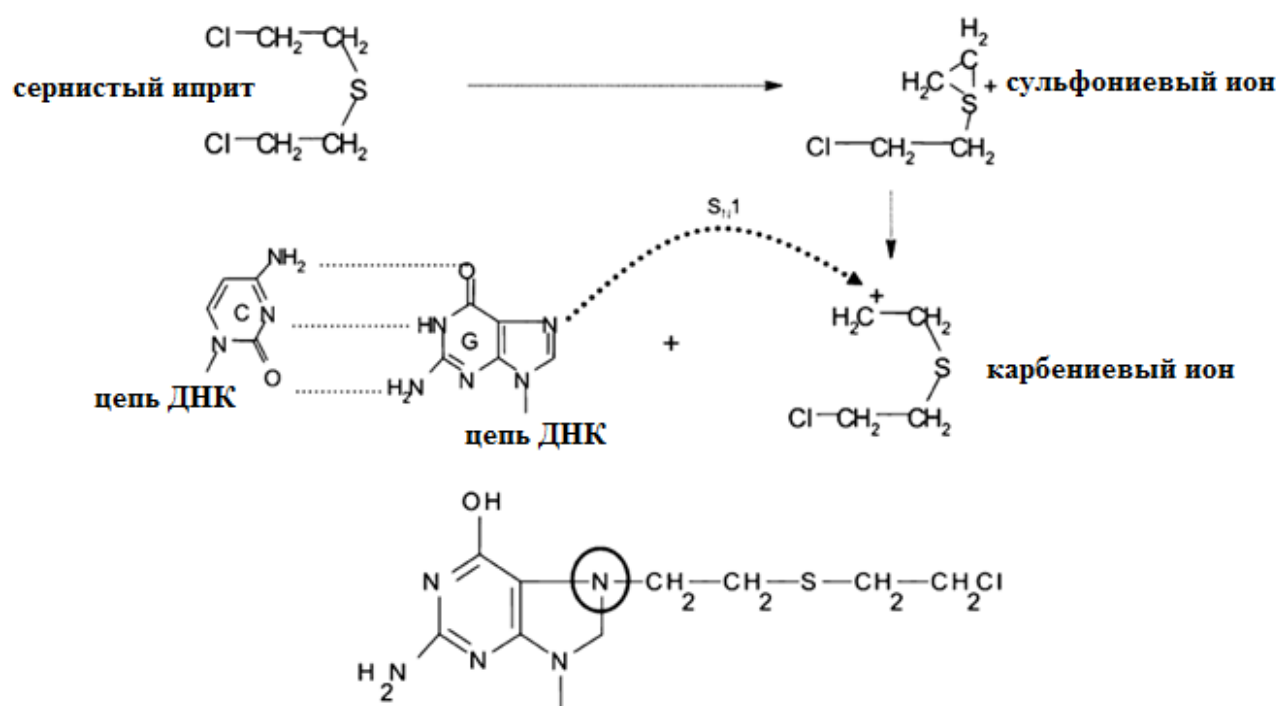


Рисунок 4 – Схема реакции присоединения иприта по N7-положению гуанина в ДНК

Иприт образует промежуточный сульфониевый ион, который затем преобразуется в карбениевый ион, являющийся сильным электрофилом, реагирующим с гуанином, входящим в состав молекулы ДНК.

Поскольку различные повреждения ДНК могут приводить к разным последствиям и восстанавливаться с неодинаковой скоростью, важно обладать информацией о каждом из таких нарушений по каждому образцу. Для

идентификации образующихся аддуктов могут применяться различные аналитические методики, как то: метод поствведения радиоактивного изотопа ^{32}P (постлейблинг), иммуноанализ, газовая хроматография-масс-спектрометрия (ГХ-МС), высокоэффективная жидкостная хроматография-масс-спектрометрия (ВЭЖХ-МС).

1.4.1 Постлейблинг – метод пост-введения радиоактивного изотопа

Для постлейблинга характерна достаточно высокая чувствительность [45], однако его применение несколько ограничено необходимостью использовать радиоактивные материалы, а также неспособностью обеспечить высокоточные количественные определения. Методика чаще всего включает в себя ферментный гидролиз ДНК до нуклеозидов 3'-монофосфатов, процедуры отделения связанных нуклеотидов от несвязанных (обычно, экстракция н-бутанолом), ферментный гидролиз нуклеазой P1, иммуноаффинная хроматография или ВЭЖХ. Конечный продукт подвергают фосфорилированию ($[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$) и хроматографируют методом ТСХ или ВЭЖХ. В более поздних исследованиях ТСХ заменяют на разделение методом электрофореза на акриламидном геле, значительно повышая таким образом производительность анализа.

Авторы [46] с помощью такого метода успешно идентифицировали 5'-фосфат 7-гидроксиэтилтиоэтилдеоксигуанозин, полученный в ходе эксперимента *in vitro*. Структура образующегося соединения приведена на рисунке 5.

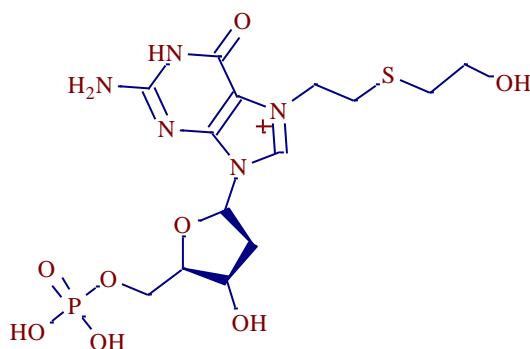


Рисунок 5 - Структурная формула 5'-фосфата 7-гидроксиэтилтиоэтилдеоксигуанозина

На процедуру постлейблинга оказывает существенное влияние ряд моментов:

- корректный выбор внутреннего стандарта, позволяющего оценить потери при пробоподготовке;
- способ гидролиза ДНК, минимизирующего депуринизацию.

В работе [46] предложена многоступенчатая процедура постлейблинга для определения аддукта СИ-ДНК, извлечённого из фибробластов человека, экспонированных низкой дозой иприта. Авторы отмечают существенное влияние выбора органического растворителя для экстракции на выход аналита.

1.4.2. Иммуноанализ

Для иммуноанализа характерна относительно низкая стоимость в сочетании с достаточно высокой производительностью и чувствительностью [47,48]. Следует, однако, иметь в виду, что применение методов иммуноанализа часто затруднено необходимостью приготовления антител и неизбежными перекрестными реакциями с веществами сходной структуры.

Авторы [49] разработали стандартную операционную процедуру для идентификации одного из ДНК-аддуктов иприта (N7-НЕТЕГ) в пробах крови и кожи иммуноанализом методом слот-блоттинга, осуществимого в рамках «полевого анализа». Минимальный детектируемый уровень экспозиции ипритом, которого удалось достичь, составил 50нМ в человеческой крови *in vitro*. В работе [50] проанализированы реальные образцы крови, отобранные у пострадавших в ходе ирано-иракского конфликта в 1988 г. Кровь хранилась в замороженном виде. Для анализа использованы специфичные моноклональные антитела для N7-НЕТЕГ- 5'-гуанозина. Согласно проведенной экспертизе, в составе лимфоцитов и гранулоцитов двух исследуемых образцов крови пострадавших были обнаружены ДНК-аддукты иприта.

1.4.3 Флуоресцентный анализ

Чаще всего в литературе встречаются упоминания об использовании флуоресцентного анализа в сочетании с разделением методом ВЭЖХ применительно к определению аддуктов ДНК с ПАУ [51, 52] и афлатоксином В1 [53]. Область применения метода ограничена тем, что не все ДНК-аддуки

обладают нужными флуоресцентными свойствами. В работе [54] высокая селективность достигнута за счет применения метода синхронной флуоресцентной спектрофотометрии. Люминесценция с лазерным возбуждением в сочетании с разделением методом капиллярного электрофореза или ВЭЖХ может обеспечивать крайне низкий предел обнаружения при определении аддуктов ДНК-ПАУ[55, 56, 57]. Применительно к определению ДНК-аддуктов иприта в ходе литературного поиска удалось обнаружить работу [58], где авторы определяли N7-НЕТЕГ методом ВЭЖХ с флуоресцентным детектированием в белых клетках крови, экспонированных *in vitro* 131 мМ иприта. При этом содержание аддукта в образце составило 470 пМ N7-НЕТЕГ на мг ДНК. Предел обнаружения метода составил 10 пМ.

1.4.4 Газовая хроматография-масс-спектрометрия

Применительно к рассматриваемым объектам исследования, ГХ-МС, несмотря на высокую селективность и чувствительность, требует проведения дополнительных стадий пробоподготовки и дериватизации, усложняя и удлинняя тем самым процедуру анализа. Так, авторы [58] разработали чувствительную методику определения НЕТЕГ методом ГХ-МС, позволяющую определить триметилсилильное производное НЕТЕГ на уровне субпикомолей. При этом необходимой стадией анализа являлась обработка концентрированного раствора НЕТЕГ *bis*-триметилсилилтрифторацетамидом (BSTFA). Однако при уменьшении концентрации НЕТЕГ в реакционной смеси, наблюдалось значительное падение чувствительности, особенно заметное в присутствии других ДНК-оснований. Авторы пришли к заключению, что именно этап дериватизации ограничивает применение данной аналитической методики.

В целом, хотя ГХ-МС анализ способен дать однозначное подтверждение о присутствии N7-НЕТЕГ в исследуемом образце, однако необходимость дериватизации и перевода выделенного аддукта в летучую форму делают метод неудобным с практической точки зрения.

1.4.5 Высокоэффективная жидкостная хроматография-масс-спектрометрия

Одна из первых публикаций на тему ДНК-аддуктов иприта посвящена синтезу, определению и количественной оценке аддуктов иприта с ДНК в крови и клетках [59]. ДНК клеток тимуса теленка и человеческую кровь инкубировали меченым ипритом [^{36}S], далее следовал ферментный гидролиз ДНК, анализ осуществляли методом ВЭЖХ-УФ.

Следует отметить, что внедрение современных tandemных методов масс-спектрометрии привело к значительному улучшению чувствительности и селективности анализа. Так, авторы [60] полагают, что в будущем определение всех аддуктов с ДНК будет проводиться исключительно методом tandemной высокоэффективной жидкостной хроматографии с ионизацией в электроспрее (ВЭЖХ-ЭС-МС/МС).

Наибольшее количество публикаций посвящено определению аддукта N7-НЕТЕГ в различных биологических средах. Обусловлено это, главным образом, тем, что в пуле известных аддуктов иприта с ДНК он преобладает в количественном отношении. Метод ВЭЖХ-МС/МС был успешно применен для определения N7-НЕТЕГ в человеческой крови, *in vitro* экспонированной ипритом [61]. Хроматографическое разделение осуществляли на колонке С18, в качестве подвижной фазы использовали метанол и воду, элюирование проводили в градиентном режиме, а детектирование аналита - по ионному переходу m/z 256→105. Кроме того, авторы провели исследование стабильности аддукта в плазме крови при хранении в зависимости от количества циклов заморозки-разморозки и установили, что N7-НЕТЕГ остается стабильным 5 циклов заморозки-разморозки и при хранении при -20°C в течение 30 дней. Удалось достичь предела обнаружения 0.330 нг/мл, при этом предел количественного определения в крови составил 0.940 нг/мл.

Авторы [65] впервые представили методику определения N7-НЕТЕГ в моче. В качестве объекта исследования выступали морские свинки, экспонированные ипритом в дозе 0.5, 1 и 5 мг/кг; предел обнаружения N7-

НЕТЕГ составил 0,2 нг в мл мочи. Детектирование проводили по ионному переходу m/z 256→105. Обнаружена линейная зависимость между введенной дозой сернистого иприта и регистрируемым количеством N7-НЕТЕГ в моче. После экспозиции сернистым ипритом в дозе 1 мг/кг максимум экскреции N7-НЕТЕГ (50 нг/мл) приходится на первые 2-3 ч. Далее элиминация N7-НЕТЕГ с мочой происходит менее активно: в период 34-48 ч. установленный уровень N7-НЕТЕГ в моче составил лишь 10 нг/мл.

С целью адекватной оценки цитотоксичности важно определить содержание, распределение, дозозависимость и время полувыведения всех четырех известных аддуктов. Для этого необходима надежная аналитическая методика, позволяющая одновременно идентифицировать и количественно оценивать содержание четырех типов аддуктов иприта с ДНК в исследуемой биоматрице на уровне исчезающе низких концентраций. Таким образом, для идентификации N3-НЕТЕА, O6-НЕТЕГ и Bis-G требуются высокочувствительные, специфичные и сверхточные методы анализа. Всем перечисленным параметрам в полной мере отвечает тандемная высокоэффективная жидкостная хроматография [61,62,63,64].

В работе [65] была предложена ВЭЖХ-МС/МС методика одновременной идентификации всех известных аддуктов с ДНК, образующихся при воздействии низких доз иприта. В качестве модели исследования были выбраны культивируемые человеческие клетки. Стадию введения радиоактивной метки удалось исключить путем подбора условий извлечения и анализа. Схема метода также сводилась к гидролизу ДНК с последующим ВЭЖХ-МС/МС анализом гидролизата. После исключения возможных мешающих влияний на измерения со стороны аддуктов с РНК, выделяли ДНК и культивировали человеческие моноциты, экспонированные ипритом. Позднее тот же коллектив авторов распространил разработанную методику на другую область анализа, был проведен эксперимент с накожной аппликацией группе крыс 2, 6 и 60 мг/кг иприта [66]. Через 6 часов, 1, 3, 7, 14 и 21 сутки крыс забивали и исследовали пятно контакта с сернистым ипритом. Выделяли ДНК, гидролизовали и анализировали гидролизат методом ВЭЖХ-МС/МС. Авторам удалось установить,

что зависимость концентрации аддуктов от времени коррелирует с появлением апоптических клеток. Кроме того, аддукты были обнаружены не только в прилегающих к точке нанесения кожных покровах, но и во внутренних органах. Установлено, что образование аддуктов зависит от дозы иприта; максимальное количество аддуктов зафиксировано непосредственно после нанесения, однако, аддукты в значимых количествах детектировали и через 21 день после воздействия.

При проведении количественной оценки содержания аналитов, находящихся в пробе на следовом уровне, методом ВЭЖХ-МС/МС требуется введение внутреннего стандарта. В идеальном варианте в качестве внутреннего стандарта рекомендуется использовать изотопмер исследуемого аналита. Меченый стабильным изотопом внутренний стандарт может использоваться для надежной идентификации пика аналита на сложной хроматограмме.

Авторы [67] синтезировали и охарактеризовали все 4 известных аддукта сернистого иприта с ДНК (N7-НЕТЕГ, N3-НЕТЕА, O6-НЕТЕГ, Bis-G) и их дейтерированные аналоги и разработали методику их совместного обнаружения методом УВЭЖХ-МС/МС с изотопным разбавлением. Методика была успешно апробирована на примере определения указанных аддуктов в коже крыс после экспозиции сернистым ипритом *ex vivo* и *in vivo* в разных дозах. Количественный анализ образующихся соединений показал хорошую корреляцию между опытами *ex vivo* и *in vivo*. Интересным представляется тот факт, что, согласно исследованиям, количество образующегося Bis-G оказалось намного выше, а N3-НЕТЕА – намного ниже, чем в более ранней работе авторов [68]. Так, при обобщении данных по трем различным дозировкам сернистого иприта (0.024, 4.8, и 48 мМ), установлено, что мольные проценты N7-НЕТЕГ, Bis-G, N3-НЕТЕА, и O6-НЕТЕГ составляют 64 - 81%, 18 - 42%, 1.3 - 4.6%, и 0.04 - 0.62%, соответственно.

В работе [69] отмечена противоречивость результатов, полученных разными авторами. Так, ряд авторов рапортует о преобладании Bis-G в пуле аддуктов иприта с ДНК, причем разброс данных достаточно большой и составляет от 17%

до 45% [64, 65, 70, 71]. Разброс данных может объясняться различиями в способах нанесения иприта (накожно, подкожно, ингаляционно и т.д.), графиках отбора проб, способах выделения и гидролиза ДНК и т.д. Стоит, кроме того, принимать во внимание, что в опытах *in vivo* присутствует ряд неконтролируемых моментов, как то: абсорбция иприта, состояние экспериментальных животных, индивидуальный ответ организма на воздействие иприта. Для объективной оценки профилей образования аддуктов иприта с ДНК, по-видимому, на первом этапе должны быть разработаны улучшенные аналитические методики определения аддуктов в различных линиях клеток, полученных из органов и тканей, экспонированных сернистым ипритом *in vitro*. Это позволит создать базис для обоснованной интерпретации результатов экспериментов *in vivo* с учетом распределительных и репарационных процессов, происходящих уже на уровне организма, а не клетки. В работе [72] было проведено исследование зависимости распределения аддуктов иприта с ДНК в моче кроликов от времени воздействия и дозы при условии накожной аппликации иприта. Поскольку в опытах *in vivo* большая часть алкилированных ДНК подвергается репарации, с мочой выводятся только не подвергшиеся репарации алкилированные основания, методика может служить инструментом оценки степени повреждения ДНК и периода, требующегося на репарацию естественным образом. Анализ осуществляли с привлечением техники УВЭЖХ-МС/МС, подготовку проб мочи проводили методом ТФЭ, предел обнаружения при этом составил 5-10 нг/л. Интересно, что аддукты обнаруживались в моче даже на 29-й день после экспозиции, что существенно отличается от данных, полученных в [73].

В работе [74] авторы провели совместное определение N7-НЕТЕГ, O6-НЕТЕГ, N3-НЕТЕА и Bis-G в моче и крови людей, пострадавших от воздействия иприта в результате несчастного случая. Анализ осуществляли методом УВЭЖХ-МС/МС. Для идентификации использовали дейтерированные внутренние стандарты аналитов, которые вводили в пробу крови уже после стадий выделения и гидролиза ДНК. Все четыре ДНК-аддукта иприта были обнаружены в пробах крови пациентов после соответствующей пробоподготовки (выделение ДНК,

кислотный гидролиз при нагревании до 90°C), причем максимальное количество приходится на третий день и составляет 0.03–0.09 нг/мл, затем концентрация аддуктов постепенно снижается до 14 дня с момента воздействия. Среди аддуктов преобладающим оказался N7-НЕТЕГ, содержание Bis-G и N3-НЕТЕА было значительно меньше, в то время, как количество Об-НЕТЕГ оказалось совсем незначительным. В моче, где аддукты находятся в свободном виде, также были идентифицированы все четыре свободных алкилированных основания, их количественное распределение в процентном соотношении совпадало с тем, которое наблюдали для крови: количество N7-НЕТЕГ предсказуемо оказалось максимальным, а Об-НЕТЕГ – минимальным, два других аддукта заняли промежуточное положение. N7-НЕТЕГ достоверно определяли в моче, начиная с третьего дня с момента экспозиции, с максимумом на 4 день (3.55 нг/мл), причем к 13 дню его содержание снизилось до 0.2 нг/мл и наблюдалось на уровне суб-нг до 32 дня с момента воздействия. Результаты количественного определения совпадают с опубликованными ранее теми же авторами данными опытов на кроликах, но пиковые концентрации N7-НЕТЕГ, Bis-G и N3-НЕТЕА несколько ниже, а Об-НЕТЕГ является минорным. При этом процентное соотношение отдельных аддуктов сернистого иприта с ДНК в общем пуле приблизительно сохраняется [75]. Авторы полагают, что все 4 аддукта могут использоваться для достоверного подтверждения факта воздействия сернистого иприта на человека; при этом их концентрации прямо пропорциональны уровню воздействия. В течение периода наблюдений процентное распределение аддуктов оставалось прежним.

Кроме крови и мочи, могут быть исследованы также и другие органы/ткани-мишени. Так, работа [69] посвящена определению аддуктов N7-НЕТЕГ, Bis-G, N3-НЕТЕА и Об-НЕТЕГ в адипоцитах человека в опытах *invitro* и *invivo* методом УВЭЖХ-МС/МС. Были установлены профили N7-НЕТЕГ, Bis-G и N3-НЕТЕА в зрелых адипоцитах человека (НА-s), отделенных от подкожных преадипоцитов (НРА-s). Метод также был использован для профилирования трех других клеточных линий, включая человеческие кератиноциты (HaCaT), человеческие

гепатоциты (L-02) и человеческие фибробласты (HLF). В опытах *in vitro* в экспонированных сернистым ипритом адипоцитах был в большом количестве обнаружен долгоживущий аддукт Bis-G. В опытах *in vivo*, проводимых на крысах, экспонированных ипритом в дозировке 1-10 мг/кг, было установлено, что содержание аддуктов ДНК в жировой ткани намного ниже, по сравнению с другими органами. В отличие от крови, где основным регистрируемым аддуктом является N7-НЕТЕГ, в жировой ткани содержится преимущественно Bis-G. Авторы предположили, что в жировой среде преобладают процессы, приводящие к образованию, главным образом, аддукта Bis-G, а также вероятно протекание специфичных механизмов репарации ДНК, приводящих к устойчивости аддукта и выживаемости адипоцитов после воздействия иприта.

1.5 Методы выделения ДНК

Необходимым этапом процедур определения аддуктов ксенобиотиков с ДНК является выбор способа выделения ДНК из выбранной матрицы (цельная кровь, органы и т.д.) От этой стадии во многом зависит успех всей аналитической процедуры.

ДНК может быть выделена из любого типа тканей и клеток, содержащих ядра, но реализация этого процесса в различных матрицах и количественный выход ДНК может различаться. Основные этапы выделения ДНК включают быстрый лизис клеток, удаление фрагментов клеточных органелл и мембран с помощью центрифугирования, биodeградацию белков протеиназами и экстрагирование ДНК из раствора с помощью органических растворителей. Затем ДНК осаждают, как правило, этанолом, центрифугируют и, после удаления надосадочной жидкости, растворяют в буферном растворе. Оценку качества экстрагированной ДНК проводят на основании измерения оптической плотности раствора ДНК в области белкового и нуклеинового спектров поглощения, т.е. при 280 и 260 нм, соответственно. Для чистых образцов ДНК соотношение оптических плотностей, полученных при 260/280 нм, должно быть больше 1,8. Молекула ДНК одной хромосомы среднего размера содержит 150×10^6 пар

нуклеотидов и имеет длину около 4 см. Молекулы такого размера чувствительны к механическим воздействиям, возникающим в растворе в процессе выделения, и часто фрагментируются. В ходе выделения получают молекулы ДНК значительно меньше исходных, но всё равно очень большие - тысячи или десятки тысяч пар нуклеотидов. Такие молекулы неудобны для исследований, и их приходится дополнительно фрагментировать [76].

Для лизиса клеток и денатурации белков часто используется детергент додецилсульфат натрия и хаотропный агент гуанидинизотиоцианат.

На настоящий момент в литературе описан ряд способов выделения ДНК, основанных как на ряде последовательных ручных операций, так и на применении различных коммерчески доступных готовых наборов, позволяющих минимизировать время и трудозатраты данной аналитической стадии.

В таблице 1 перечислены основные способы выделения ДНК.

Таблица 1 – Основные способы выделения ДНК

Метод выделения	Суть метода	Достоинства	Недостатки
Жидкостная экстракция	Лизис биологического материала детергентами или хаотропными агентами. Экстракция органическими растворителями (фенол и/или хлороформ), осаждение белков, спиртовое осаждение ДНК, центрифугирование и промывка осадка ДНК.	- Хорошее качество ДНК; - Высокая концентрация; - Стабильность выделенной ДНК - Широкий круг объектов исследования; - эффективен в отношении старого материала.	- большие времязатраты; - возможность контаминации; - сложно автоматизировать работу с большим количеством растворителей - возможность ингибирования
ТФЭ на	К клеточному экстракту	- Простота	- Требования к

силикагеле	добавляют хаотропный агент (гуанидинтиоцианат), ТФЭ на колонке с силикагелем, промывка колонки от клеточных примесей, элюирование ДНК в раствор	исполнения; - Экономичность; - Возможность автоматизации; - Исключает наличие ингибиторов	минимальному количеству образца;
ТФЭ на стекле	Лизис клеток хаотропным агентом, сорбция ДНК на носителе (стеклянные бусы, диатомовая земля и т. д.). ДНК обратимо связывается со стеклом, затем примеси отмывают хаотропной солью, после чего следует промывка 80 % этанолом. Очищенная ДНК элюируется со стекла буфером с низкой ионной силой.	- Простота исполнения; - Экономичность; - Возможность автоматизации; - Низкие времязатраты (ок. 15 мин)	- Требования к минимальному количеству образца;
ТФЭ на магнитных частицах	Лизис клеток раствором, добавление к раствору магнитных шариков. ДНК связывается с поверхностью шарика. Далее следует промывка буфером и элюирование ДНК	- Возможность выделения больших количеств ДНК; - Минимизация потерь; - Ниже риск контаминации; - Высокая чистота	- Высокая стоимость

		полученной ДНК	
Микроцентрифужные колонки	Лизис клеток; протеиназная обработка и экстракция ДНК в водный раствор. Очистка ДНК на микроцентрифужной колонке.	- Высокая степень очистки образцов ДНК от примесей возможных ингибиторов ПЦР	- Стоимость - Временные затраты
Ионообменные смолы	К образцу добавляют хелатообразующую смолу, инкубируют ок. 30 мин, кипятят, затем центрифугируют и отбирают супернатант.	- Прост в применении; - Низкие временные затраты; Возможность автоматизации; - Удаляет ПЦР-ингибиторы - Применим для любых объектов, кроме кости	- «Грязная» ДНК - Непостоянство экстракции; - Возможность ингибирования - Нестабильность полученной ДНК
Бумажные фильтры	Выделение ДНК на бумаге, пропитанной смесью реагентов. Для выделения наносят каплю образца на карту, после чего вносят на нее буфер для выделения и высушивают.	- Быстрота выделения - возможность автоматизации; - Возможность длительного хранения;	- подходит только для жидких образцов - невозможность количественного анализа -

Классическая процедура выделения ДНК из цельной крови с небольшими изменениями приведена в работе [61]. При этом выход ДНК составил 22 ± 8 мкг/мл крови. Последовательность ключевых стадий процедуры выделения ДНК из

цельной крови представлена в виде схемы на рисунке 6. 1 мл цельной крови промывали 1 мл фосфатного буфера, центрифугировали 15 мин при $3500\times g$, затем осаждающий реагент вновь суспендировали в лизирующем буфере (1 мл состава: 1.21 мг/мл Tris-HCl (pH 7.5), сахараза 109 мг/мл, $MgCl_2$ 475 мкг/мл и TritonX-100 1%) 30 мин при 4 °C. Лизат далее центрифугировали при $6500\times g$ в течение 15 мин. ДНК извлекали из осадителя с помощью 0.5 мл экстрагирующего раствора (1.21 мг/мл of Tris-HCl pH 8.3, KCl 3.72 мг/мл, $MgCl_2$ 237 мкг/мл, NP-40 0.45% и Tween 20 0.45%). РНК удаляли путем обработки РНазой (5 мкг/мл, 37 °C, 1 ч), а затем протеиназой К (2 мг/мл, 55 °C, 3 ч). Содержащий ДНК супернатант осаждали холодным этанолом, затем центрифугировали при 12,000 g в течение 20 мин, далее промывали 70% этанолом. Высушивали досуха, перерастворяли в 0.4 мл воды. Количество и чистоту ДНК определяли методом УФ спектрофотометрии ($20A_{260nm} = 1 \text{ мг/мл ДНК}$).

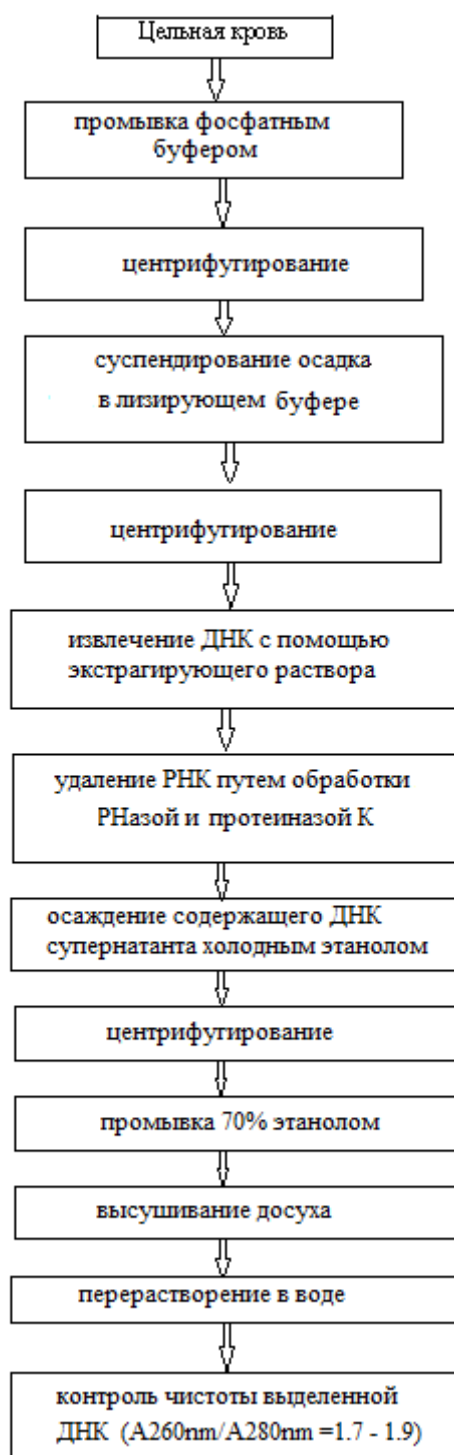


Рисунок 6 – Блок-схема, иллюстрирующая основные этапы классической методики выделения ДНК из крови

В [49] ДНК выделяли из крови следующим образом: белые клетки крови, выделенные путем лизиса эритроцитов, лизировали 1% додецилсульфатом натрия; затем экстрагировали фенолом, смесью фенол/хлороформ и хлороформ/изоамиловый спирт. После осаждали этанолом обрабатывали

эндонуклеазой, расщепляющей РНК (РНазой), протеиназой К и вновь экстрагировали согласно той же процедуре с осаждением этанолом. При выделении ДНК из кожи, процедура усложняется. Необходимо отделить эпидермис от дермы, для чего авторы рекомендуют провести обработку диспазой в течение ночи, а затем следовать процедуре, описанной для белых клеток крови.

Описанные выше процедуры занимают много времени и довольно трудоемки, поэтому альтернативным вариантом является использование готовых наборов для выделения ДНК. К достоинствам их применения относятся: небольшие количества образца (300 мкл крови и 10-20 мм² эпидермиса); значительное снижение затрат (так, лизис белых клеток вместо инкубирования на ночь занимает 1 час). Кроме того, стадию экстракции (фенол/хлороформ/изоамиловый спирт) можно заменить простым осаждением белков, в то время как обработка РНазой, проводящаяся перед осаждением, делает излишней стадию деструкции РНазы протеиназой К. Таким образом, общее время, затрачиваемое на выделение ДНК, может быть сокращено с 1,5 дней до 3-х часов. Следует, однако, отметить, что для растворения осажденной ДНК все же может потребоваться инкубация на ночь. При работе со свежей кровью, время инкубации может быть сокращено до 1-2 часов. В таком случае, общая продолжительность процедуры выделения ДНК составит 4-5 ч. Применение готовых наборов, как правило, не приводит к потерям ДНК.

На настоящий момент существует довольно широкий ряд коммерческих продуктов, как зарубежных, так и отечественных, позволяющих значительно минимизировать трудоемкость процедуры, сократить время ее проведения без существенных потерь ДНК. Как правило, производители предлагают различные комплекты для извлечения ДНК из цельной крови, плазмы, слюны, мочи, фекалий, соскобов со слизистых оболочек и др. культур, бактериальных и животных клеток, свежих, замороженных или высушенных тканей животных и растений.

1.6 Методы гидролиза ДНК

Необходимой стадией анализа, позволяющей выделить из ДНК непосредственно интересующие аналитика аддукты, является гидролиз. Наиболее часто в качестве способа разложения аддуктов с ДНК применяют кислотный или ферментативный гидролиз. Для кислотного гидролиза чаще всего используют фосфорную и муравьиную кислоты. Имеются работы, где для проведения гидролиза не применяют дополнительные химические реагенты. В таблице 2 систематизированы основные используемые методы гидролиза ДНК со ссылкой на первоисточник.

Таблица 2 - Варианты процедуры гидролиза ДНК [77]

Гидролиз	Описание процедуры	Источн ик
Кислотный	рН раствора ДНК (0.3 мл, контрольный и обработанный СИ) доводили до 3.5 H ₃ PO ₄ . При перемешивании, раствор нагревали на кипящей водяной бане в течение 60 мин, затем охлаждали до комнатной температуры. Смесь центрифугировали при 12,000×g в течение 15 мин, 0.3мл супернатанта высушивали в вакууме, затем перерастворяли в 70мкл воды с внутренним стандартом (117 нг/мл) и анализировали методом ВЭЖХ-ЭС-МС/МС.	[61]
	Гидролиз муравьиной кислотой (рН 3,5) проводили при 90°C в течение часа. После охлаждения раствор центрифугировали (12,000 rpm, 15 мин), отбирали надосадочную жидкость (0,3 мл), выпаривали досуха и перерастворяли в 70мкл воды. Анализ осуществляли методом ВЭЖХ-МС/МС.	[74]

Ферментативный	Гидролизовали аддукт инкубированием на ночь при 10°C с микрококковой нуклеазой. Последующий анализ проводили методом постлейблинга.	[46]
Горячей водой	Выделенную ДНК растворяли в воде, добавляли внутренний стандарт, затем смесь нагревали до 70 °С при непрерывном перемешивании в течение часа. После завершения гидролиза растворы охлаждали и анализировали далее методом ВЭЖХ-МС/МС.	[67]

Каждый метод гидролиза имеет свои особенности. Ферментативный гидролиз обладает более избирательным действием и расщепляет связи только между определенными нуклеозидами, он является наиболее «мягким» из перечисленных методов, соответственно, для полного протекания процесса требуется, при прочих равных условиях, значительно больше времени, по сравнению с кислотным гидролизом [78]. Также отмечается, что увеличение степени гидролиза может быть также достигнуто за счет использования смеси дезоксирибонуклеаз, обладающих различной субстратной специфичностью, что ведет, однако, к значительному удорожанию процедуры. Кислотный гидролиз значительно более эффективен, по сравнению с ферментным, однако нельзя исключать возможность разрушения самого аддукта сернистого иприта с ДНК при использовании чрезмерно жестких условий (температура, pH) гидролиза. Увеличение температуры и длительности обработки повышают эффективность гидролиза. Так, в работе [66] после проведения ферментативного гидролиза для получения полной количественной депуринизации полученный раствор нагревали до 90 °С в течение 20 мин. При гидролизе горячей водой в образец не вносятся никаких дополнительных реагентов, которые могут вызвать затруднения при дальнейшем анализе.

1.7 Методы определения аддуктов ДНК с цитостатиками на примере циклофосамида

Циклофосфамид (2-[бис-(2-хлорэтил)амино]-тетрагидро-2Н-1,3,2-оксазафосфорин-2-оксид) (ЦФА) является одним из наиболее распространенных цитостатиков и входит в состав препаратов, используемых для химиотерапии. ЦФА представляет собой пролекарство, которое активируется вследствие воздействия цитохрома Р450, образуя 4-гидрокси-ЦФА, который, в свою очередь, разлагается с образованием фосфорамид-иприта (ФИ) и акролеина. В результате неферментативного разложения ФИ происходит образование азотистого иприта (АИ). Как ФИ, так и АИ действуют как алкилирующие агенты по отношению к гуаниновому основанию ДНК, что влечет за собой ее повреждение и образование моно-аддукта *N*-[2-(*N*7-гуанинил)этил]-*N*-[2-гидроксиэтил]-амина (G-NOR-OH), и перекрестно-сшитого аддукта *N,N*-bis[2-(*N*7-гуанинил)этил] амина (GNOR-G) [79, 80].

Схема образования аддуктов ЦФА с ДНК доступна из литературных источников и представлена на рисунке 12.

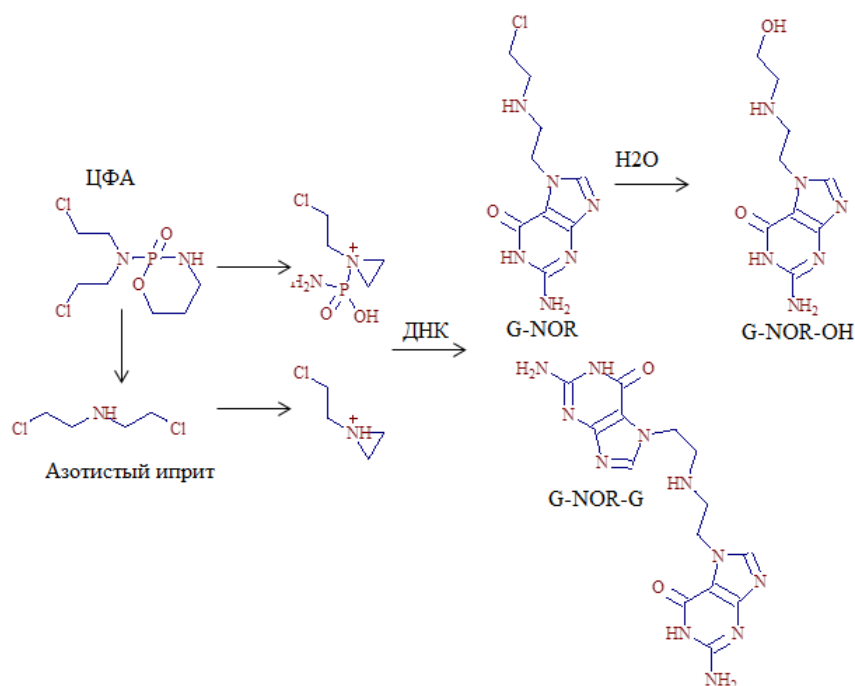


Рисунок 7 – Схема образования аддуктов ЦФА с ДНК

Установлено, что образование аддуктов возможно как *invitro* [81], так и *invivo* [82].

Из всех метаболитов циклофосфида 4-гидроксициклофосфамид обладает самым высоким терапевтическим индексом. Родительское (исходное) вещество имеет $T_{1/2}$ в сыворотке, равный 3-10 час, тогда как фармакодинамический $T_{1/2}$ его алкилирующей активности составляет 8 час [83].

Авторы работ [84, 85] сообщают, что приблизительно 90% повреждений ДНК приходится на образование моно-аддукта. Однако повреждения в результате образования 1,3-межнитевой поперечной сшивки G-NOR-G, вероятно, играют центральную роль в формировании цитотоксического отклика, поскольку предотвращают разделение нитей ДНК, необходимое для протекания процессов репликации и транскрипции ДНК [80, 86].

Поскольку ЦФА, как уже упоминалось ранее, является пролекарством, для оценки токсических явлений правильнее использовать соотношение концентраций его активного метаболита фосфорамид-иприта и аддукта с ДНК G-NOR-G [80]. Такая оценка в сочетании с сопоставлением полученных данных с клиническими результатами позволят скорректировать проводимую терапию, повысить эффективность препарата и снизить токсические эффекты. Однако, данные о повреждениях ДНК в результате терапии ЦФА весьма скудны. Проводились опыты *in vitro* по определению G-NOR-G в ДНК из зубной железы теленка, обработанной азотистым ипритом [79, 87]. Определение аналитов осуществляли методом ВЭЖХ-УФ после гидролиза при нагревании в нейтральной среде. В работах [85, 88] были исследованы повреждения ДНК в лейкозных клетках человека, возникающие вследствие употребления ЦФА, однако структурной информации авторам не удалось получить. Авторы [89], используя в качестве объекта исследования гранулезные клетки яичника крыс, в опытах *in vitro* установили, что клеточная смерть наступает через 48 часов после воздействия фосфорамид-иприта. При этом фосфорамид связывается с ДНК, причем в первые 24 часа преимущественно образуется моно-аддукт, в то время, как через 48 часов происходит образование более цитотоксичного ди-аддукта G-

NOR-G. Полученные авторами данные однозначно свидетельствуют о том, что повреждение ДНК, вызванное воздействием фосфорамид-иприта, связано с образованием аддуктов G-NOR-G и G-NOR-OH.

Авторы [80] исследовали образование перекрестно-сшитых аддуктов с ДНК при терапии ЦФА у двух групп пациентов, в одну из которых были включены люди с диагнозом врожденная апластическая анемия, в другую – без него. В ходе исследования удалось установить, что в плазме крови пациентов с диагнозом апластическая анемия содержание G-NOR-G было сопоставимо с содержанием этого аддукта в плазме крови пациентов второй группы, хотя доза ЦФА для первой группы была на порядок меньше (5–10 мг/кг/день vs. 50–60 мг/кг/день). Исследование проводили методом ВЭЖХ-МС/МС после предварительного выделения ДНК, нейтрального гидролиза и концентрирования образовавшихся аддуктов методом ТФЭ. После нормализации по концентрации ЦФА в плазме крови установлено, что у пациентов с апластической анемией количество G-NOR-G в плазме крови в 15 раз превышает этот показатель в плазме крови пациентов без такого диагноза, что говорит о гиперчувствительности к действию алкилирующих агентов подобных групп пациентов. Этот факт еще раз говорит о важности контроля подобных метаболических параметров при разработке схем лечения.

В опытах на крысах установлено, что клиническая доза ЦФА вызывает образование приблизительно 3 аддуктов с нуклеотидными основаниями на 10^6 нормальных гуаниновых остатков, среди которых более 90% составляет моноаддукт с гуанином (G-NOR-OH), детектируемый в период до 72 ч с момента экспозиции [79, 90].

Авторам [85] удалось количественно определить содержание перекрестно-сшитых аддуктов в крови пациентов, получающих внутривенную терапию ЦФА. Максимальный уровень образования перекрестно-сшитых аддуктов (3 аддукта на 10^6 нуклеотидов) достигался через 24 часа после экспозиции. Недостатком исследования является то, что была исследована кровь только одного пациента, а

также выбор недостаточно специфичного метода исследования (гель-электрофорез).

1.7.1 Существующие методы определения аддуктов ДНК с ЦФА и другими препаратами ряда оксафосфоринов

Развитие лекарственной устойчивости к алкилирующим цитостатикам связана с более высокой внутриклеточной концентрацией глутатиона и повышенной экспрессией ферментов глутатион- S-трансферазы [91]. Механизмы, контролируемые цитотоксическое и тератогенное действие оксафосфоринов на настоящий момент изучены далеко не досконально, что делает особенно актуальным исследование взаимодействий между веществами и их метаболитами и ДНК.

Среди методов исследования можно выделить ЯМР [91, 92, 93, 94], масс-спектрометрические методы [91, 95, 96, 97], а также ВЭЖХ-УФ [84, 90] и ВЭЖХ с флуоресцентным детектированием [98]. В настоящее время для определения перекрестно-сшитых аддуктов ДНК с различными соединениями, среди которых как канцерогенные вещества, так и медицинские препараты, наиболее часто используют метод высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией с изотопным разбавлением [64, 82, 99, 100, 101, 102].

В работе [63] был проведен количественный анализ аддукта G-NOR-G в человеческой крови. ДНК извлекали из белых клеток крови, подвергали термическому гидролизу, затем методом ТФЭ проводили очистку и концентрирование полученного образца и анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС с ионизацией в электроспрее. Методика была опробована на трех пациентах, получающих ЦФА в дозировке 50-60 мг/кг внутривенно. Установлено, что максимальная концентрация G-NOR-G в крови достигается через 4-8 часов после введения препарата. Авторам удалось достичь предела количественного обнаружения 50фМ. Следует отметить, что это первая работа, посвященная

количественному МС/МС анализу перекрестно-сшитых аддуктов в условиях *in vivo*.

Авторы [103] разработали методику ВЭЖХ-МС/МС анализа протеолитического гидролизата, содержащего перекрестно-сшитые аддукты ДНК, полученного в результате обработки клеток АИ. В результате эксперимента было установлено концентрационно-зависимое образование аддукта N-[2-[цистеинил]этил]-N-[2-(гуан-7-ил)этил]амин (Cys-NOR-N7G), подтверждающее образование перекрестных сшивок с тиольными группами цистеина в белках по N-7 положениям гуанина в ДНК.

1.8 Применение N-ацетилцистеина (АЦЦ) в качестве скавенджера

В литературе предложено несколько механизмов защитного действия N-ацетилцистеина (АЦЦ) применительно к ДНК и процессам канцерогенеза, основанных на его нуклеофильных свойствах, антиоксидантной активности, регулировании метаболизма, воздействии на митохондрии, модулирование процессов репарации ДНК, регулирование процессов клеточного выживания и апоптоза. АЦЦ является антиоксидантом, способным захватывать свободные радикалы (быть скавенджером) [104].

Механизм действия АЦЦ изучен достаточно хорошо. Известно, что восстановленный глутатион играет центральную физиологическую роль в гомеостазе организма и защите клетки от оксидантов, токсикантов, повреждающих ДНК веществ и канцерогенов как эндо-, так и экзогенного происхождения [105]. Однако, молекула глутатиона слишком велика, чтобы проникать внутрь клетки.

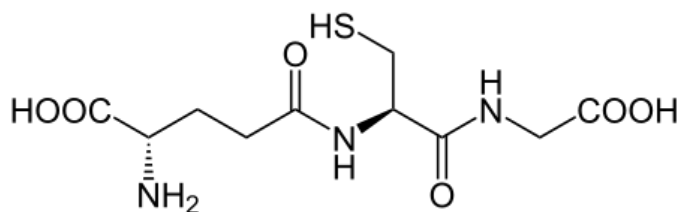


Рисунок 8 - Молекула восстановленного глутатиона

Глутатион не является незаменимым веществом и может синтезироваться внутри клетки из L-цистеина, L-глутаминовой кислоты и глицина. Однако, имеются данные о токсичности L-цистеина, который является скоростью-лимитирующей аминокислотой в процессе внутриклеточного синтеза глутатиона [106]. АЦЦ легко подвергается деацетилированию в клетке с образованием L-цистеина, провоцируя, таким образом, внутриклеточный синтез глутатиона. Помимо активации синтеза глутатиона, АЦЦ сам по себе оказывает защитное действие благодаря своим нуклеофильным и антиоксидантным свойствам, меняя токсикокинетику ксенобиотиков, попадающих в организм [107]. АЦЦ был введен в медицинскую практику еще в 1960-х в качестве муколитического агента, однако, позже область его применения была значительно расширена, в том числе его стали использовать в качестве антидота при острых отравлениях, вызванных передозировкой парацетамола и некоторых токсичных химикатов, а также для снижения токсичности доксорубина, циклофосфамида и ифосфамида [107]. С середины 80-х годов начинают появляться публикации об антигенотоксических и антиканцерогенных свойствах АЦЦ [105].

Вопрос эффективной терапии поражений ипритами остается до сих пор актуальной, поскольку для них не разработано специфических антидотов [108, 109], как и задача снижения токсичности препарата при проводимой химиотерапии. Помощь пострадавшим ограничивается стандартной терапией ожоговых поражений, симптоматической терапией при поражении органов дыхания. В последние годы активно исследуются, так называемые, «чистильщики» или скавенджеры, содействующие быстрому выведению отравляющих веществ из организма. При этом распределение и сроки существования биомаркеров в организме меняются, что необходимо учитывать при разработке и применении биоаналитических методик.

Как уже упоминалось, ЦФА метаболизируется печеночным ферментом цитохром Р450 с образованием 4-гидроксициклофосфамида, продуцирующего химические активные метаболиты фосфорамид-иприт и акролеин, алкилирующие ДНК и белки [110]. Ряд авторов упоминает о том, что при терапии ЦФА

возникают такие побочные явления, как геморрагический цистит, гепатит, страдают легкие, а также проявляется кардио и нефротоксическое побочное действие препарата [111, 112, 113]. Известно, что при некоторых заболеваниях требуется введение высоких доз ЦФА (60 мг/кг), что провоцирует появление кардиологических нарушений (т.наз. кардиотоксичность) с вероятностью смертельного исхода [114]. Патогенез повреждений миокарда досконально не изучен, предполагается, что основным соединением, вызывающим токсические эффекты, является акролеин, образующийся в результате метаболизма ЦФА. ЦФА посредством ферментов печеночного цитохрома Р-450 (СУР2В6/СУР2С19) метаболизируется до 4-гидроксициклофосамида, который, в свою очередь, поступает в клетки в виде своей таутомерной формы альдоциклофосамида, разлагающегося впоследствии с образованием фосфорамид-иприта и акролеина. В качестве альтернативного пути, альдоЦФА может быть окислен до неактивного метаболита о-карбоксиилфосфорамид. Наглядно процесс метаболизма ЦФА представлен на рисунке. Также считается, что акролеин вызывает уротоксические побочные эффекты. Авторы [115] полагают, что измерение содержания акролеина в плазме крови является важным фактором, способным внести вклад в исследование индивидуальных фармакокинетических параметров и общее изучение метаболизма.

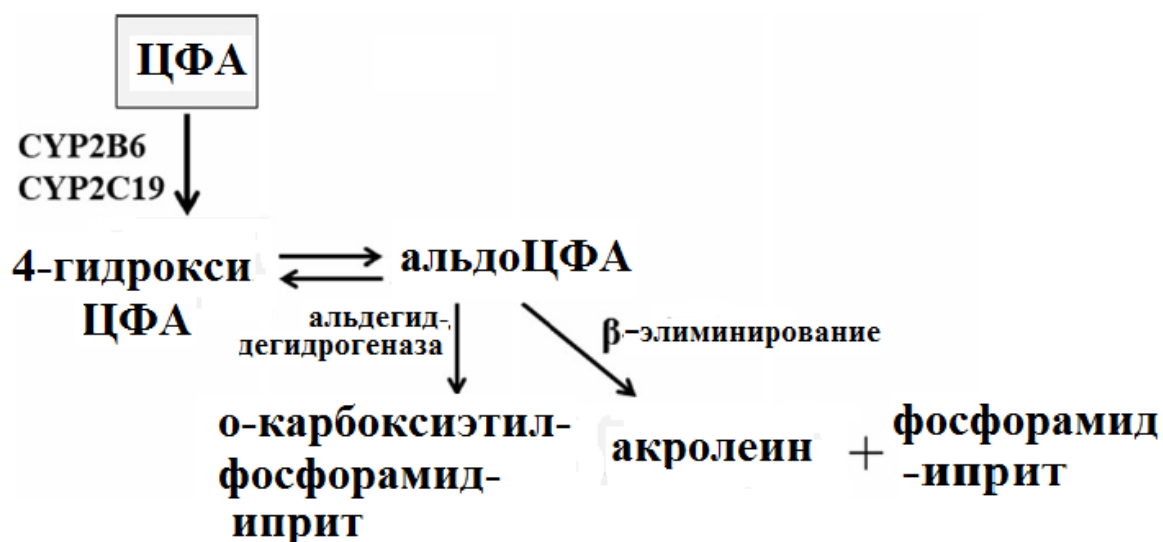


Рисунок 9 – Пути метаболизма ЦФА[116]

Применительно к клинической практике, измерение количества акролеина в крови пациентов в сочетании с сопроводительной терапией АЦЦ может значительно снизить риск развития побочных эффектов, связанных с проявлением кардиотоксичности.

Кардиотоксичность, вызванная терапией высокими дозами ЦФА, связана с образованием активных форм кислорода, уменьшением количества внутриклеточного глутатиона и снижением активности альдегид-дегидрогеназы. Кроме того, образующиеся супероксидные радикалы способны реагировать с другими радикалами с образованием пероксинитрита, что, в свою очередь, запускает каскад реакций, приводящих к значительным повреждениям белков и ДНК и, в конечном итоге, к клеточной смерти [117]. Авторы [116] сообщают о способности АЦЦ нивелировать эти эффекты, снижая, таким образом, кардиотоксичность ЦФА.

2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Синтез стандартного образца *N*7-[2-[(2-гидроксиэтил)тио]этил]-гуанина

Стандартный образец был синтезирован в лаборатории органического синтеза ФГУП НИИГПЭЧ.

Реактивы и материалы: сернистый иприт (ГСО 8248-2003), ацетонитрил (ТУ 6-09-5497-91), муравьиная кислота (ОСЧ, CAS 64-18-6), Картриджи для твердофазной экстракции (ТФЭ) OASIS HLB, 60мг фирмы Waters, кат. № WAT094226.

Для синтеза использованы реактивы: гуанозин (Guanosine-5'-monophosphate disodium (GMP), CAS 5550-12-9), дихлорметан (CAS 75-09-2, sigma-aldrich, кат.номер 650463-1L.), 1,2-дихлорэтан (CAS 107-06-2, sigma-aldrich, кат. номер 284505-100ML), 2-меркаптоэтанол (CAS 60-24-2, sigma-aldrich, кат. номер M6250-100ML), натрий металлический (ГОСТ 3273-75), метанол (CAS 67-56-1, Merck, кат. номер 1060091000), диэтиловый эфир (ТУ 2600-001-43852015-10).

Синтез *N*7-[2-[(2-гидроксиэтил)тио]этил]-гуанина

а) синтез 2-(2-хлорэтилтио)этанола

2-(2-хлорэтилтио)этанол является промежуточным продуктом, необходимым для синтеза *N*7-НЕТЕГ.

Натрий (2.9 г, 0.125 ммоль) растворили в абсолютном метаноле (75 мл) под аргоном. Полученный раствор метилата натрия охладили до комнатной температуры и прилили к 2-меркаптоэтанолу (9 мл, 9.9 г, 0.125 ммоль), при перемешивании. Через 30 мин к реакционному раствору прилили 1,2-дихлорэтан (75 мл), перемешивали 5 мин, затем реакционную колбу поместили в холодильник (+5°C). Через 24 часа осадок хлорида натрия отфильтровывали, маточный раствор упаривали в роторном испарителе при температуре 40°C. Остаток мыли водой (40 мл), водную часть декантировали. Продукт растворяли в диэтиловом эфире (40 мл), сушили над сульфатом магния. Чистота и строение были подтверждены методами MS и GC/MS.

б) Синтез N7-НЕТЕГ

Аликвоту 2-(2-хлорэтилтио)этанола (0,245 ммоль) добавляли по каплям к суспензии гуанозин 5'-монофосфат динатриевая соль гидрат (0,2 г; 0,491 ммоль) в ледяной уксусной кислоте (3 мл). Реакционную смесь перемешивали при 100°C в течение 3-х часов, затем охлаждали до комнатной температуры. Осадок отфильтровывали, маточный раствор упаривали в роторном испарителе при 70°C. Остаток растворяли в 5 мл 1М HCl, промывали дихлорметаном (3×5 мл). Водную часть перемешивали при 100°C в течение 1,5 часов. Полученный раствор упарили, получили 40 мг желтого осадка. Подтверждение структуры и чистоты N7-НЕТЕГ проводили методом ВЭЖХ-МС/МС.

2.1.1. Подтверждение структуры и чистоты синтезированного образца N7-НЕТЕГ

Синтезированный образец N7-НЕТЕГ растворили в деионизованной воде до концентрации 1 мкг/мл. Анализ раствора проводили методом тандемной жидкостной хроматомасс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС) с использованием хроматомасс-спектрометрического приборного комплекса фирмы Thermo, состоящего из хроматографа модели Accela 1250 и масс-спектрометра LTQ Orbitrap Velos с электрораспылительной ионизацией при атмосферном давлении в режиме детектирования положительных ионов. Разделение выполняли на колонке Zorbax SB-C8, Agilent (150 мм × 4.6 мм × 1.8 мкм). Условия хроматографического разделения: подвижная фаза - компонент А – 0,1% раствор муравьиной кислоты в деионизованной воде и компонент В – 0,1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле категории «для градиентной ВЭЖХ»; соотношение компонентов подвижной фазы 90% - А, 10% - В; режим хроматографического элюирования – изократический. Скорость потока элюента - 0,4 мл/мин; температура термостата колонки: 35°C; температура термостата отделения для проб: 5°C; объем ввода пробы: 5,0 мкл; время анализа 14 мин.

Условия работы масс-спектрометрического детектора: поток газа-осушителя 45 у.е.; поток вспомогательного газа 15 у.е.; температура газа-осушителя 300°C; температура вспомогательного потока 380°C; напряжение на капилляре 3500В. Детектирование в режиме сканирования по полному ионному току в диапазоне m/z от 50 до 1000.

2.1.2 Очистка синтезированного образца *N7-НЕТЕГ*

Очистку синтезированного образца *N7-НЕТЕГ* от примесей проводили методом препаративной ВЭЖХ с использованием хроматомасс-спектрометра LCMS-2010 EV с масс-селективным детектором и детектором диодная матрица (SPD-M20A), фирмы «Shimadzu» (Япония). Хроматографическая колонка и условия анализа были аналогичны описанным выше. Для подбора оптимального режима выделения целевого вещества в прибор ввели небольшой объем образца (5 мкл); при этом идентификацию компонентов смеси проводили с помощью УФ-детектора и масс-спектрометра. Было установлено, что целевое соединение *N7-НЕТЕГ*, m/z 256, элюируется с колонки в 7,75 мин, максимум поглощения был установлен при длине волны 260 нм. После подбора оптимальных условий разделения был отключен масс-спектрометрический детектор, а объем аликвоты пробы, вводимой в хроматограф, был увеличен до 100 мкл, сбор очищенной фракции осуществляли вручную. Было выполнено 15 вводов пробы и собрано около 6 мл элюата, содержащего *N7-НЕТЕГ*.

2.1.3 Оптимизация условий масс-спектрометрического детектирования *N7-НЕТЕГ*. Определение характеристичных продукт-ионов

Поскольку целью исследования была разработка процедуры определения аддукта сернистого иприта с ДНК в сложных биологических матрицах (моча, кровь и т.д.), идентификация по точным значениям масс не может обеспечить необходимой селективности. При работе с биологическим пробами предпочтительно определить один или несколько продукт-ионов, по которым осуществляется идентификация искомого аналита в смеси. Для определения

продукт-ионов был выполнен ВЭЖХ-МС/МС анализ водного раствора полученного очищенного препарата N7-НЕТЕГ. В результате установлено, что в предлагаемых условиях регистрируется точное значение m/z 256,08627, соответствующее иону $[M+H]^+$ и m/z 105,03690, соответствующее продукт-иону.

2.2 Разработка методики определения N7-НЕТЕГ в моче

Для анализа использовали тандемный масс-спектрометр высокого разрешения LTQ OrbitrapVelos с электрораспылительной ионизацией при атмосферном давлении и программным обеспечением для управления и обработки данных «Xcalibur» в комплекте с хроматографическим комплексом Accela 1250.

Хроматографическое разделение проводили на колонке Agilent SB-C8 (150 мм x 4,6 мм x 1,8 мкм) в режиме градиентного элюирования.

Состав подвижной фазы: элюент А - $H_2O + 0,1\%$ $HCOOH$, элюент Б - $CH_3CN + 0,1\%$ $HCOOH$, скорость потока 400 мкл/мин, температура термостата колонки $35^\circ C$.

Установлен следующий режим элюирования: 0 мин – 90% А, 2 мин – 90% А, 7 мин – 10% А, 9 мин – 10% А, 9,1 мин – 90% А, 12 мин – 90% А

Реактивы и стандарты

Ацетонитрил (ТУ 6-09-5497-91); муравьиная кислота (ОСЧ, CAS 64-18-6); картриджи для твердофазной экстракции OASIS HLB, 60 мг фирмы Waters, кат. № WAT094226, внутренний стандарт 8-(1-гидроксипутан-2-иламино)-1,3,7-триметил-1-пурин-2,6(3Н,7Н) и N7-гидроксиэтилтиоэтил гуанин (N7-НЕТЕГ), синтезированы в лаборатории химического моделирования ФГУП «НИИ ГПЭЧ».

Подготовка проб мочи к анализу

К образцу мочи объемом 1 мл добавляли 10 мкл раствора внутреннего стандарта с концентрацией 1 мкг/мл, затем проводили ТФЭ согласно схемы, представленной на рисунке 10.

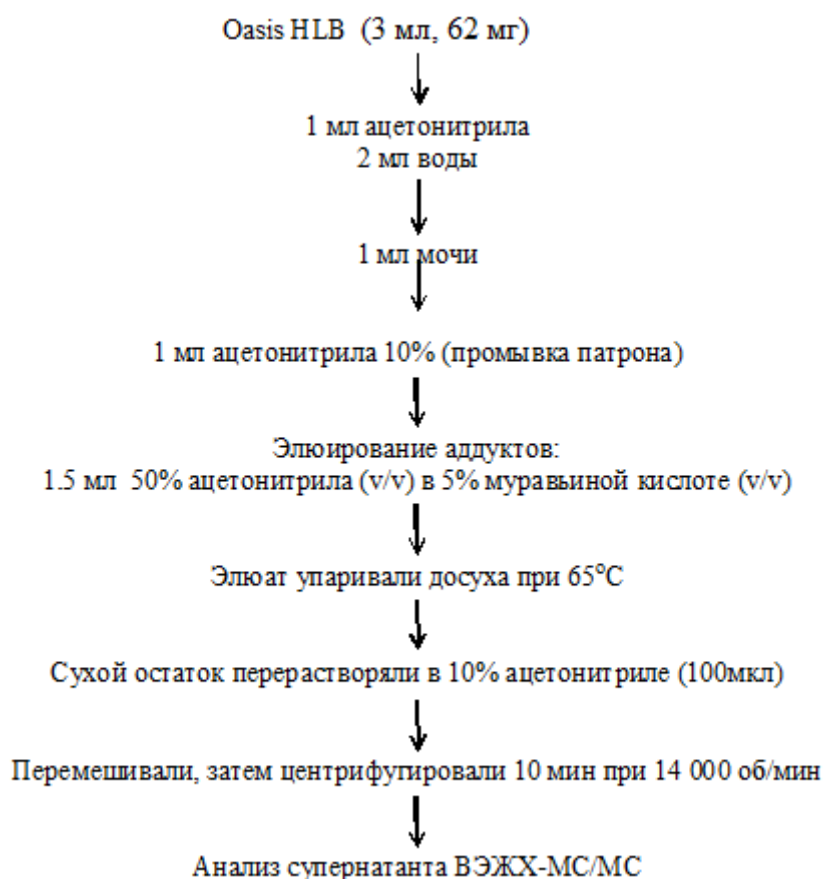


Рисунок 10 – Схема пробоподготовки мочи для определения N7-НЕТЕG

Условия анализа суммированы в таблице 3.

Таблица 3- Условия определения N7-НЕТЕG

Параметр	Аддукт
Метод анализа	ВЭЖХ-МС/МС высокого
Аналитическое оборудование	LTQOrbitrapVelos с электрораспылительной ионизацией при атмосферном давлении и программным обеспечением для управления и обработки
Условия работы масс-спектрометрического детектора	
Поток газа-осушителя	45 у.е.

Температура газа- осушителя	300°C
Поток вспомогательного газа	15 у.е.
Температура вспомогательного потока	380°C
Газ в ячейке соударений	азот
Напряжение на распылителе, В	3500
Нормализ. энергия коллизии, %	35
Полярность ионов	Положительная
Ион прекурсор N7-НЕТЕГ	m/z 256,08627
Продукт-ион N7-НЕТЕГ	m/z 105,03690;
Ион прекурсор внутреннего	m/z 282,15607
Продукт-ион внутреннего стандарта	m/z 210,09855
Разрешение по массам	70000
Время удерживания N7-НЕТЕГ, мин	6,0 ± 0,1
Время удерживания внутреннего стандарта, мин	7,52±0,1

Построение градуировочных зависимостей

Для получения градуировочной характеристики была приготовлена и проанализирована серия проб мочи крыс с внесением N7-НЕТЕГ с концентрациями 1, 10, 100 нг/мл и добавкой внутреннего стандарта с концентрацией 1 нг/мл. На основании полученных данных были вычислены относительные площади пика N7-НЕТЕГ и построен график зависимости относительной площади пика от концентрации.

Определение воспроизводимости методики

Матричный фактор, нормализованный на внутренний стандарт, определяемый отношением матричного фактора аналита к матричному фактору

внутреннего стандарта, составляет 12%. Нижний предел определения аналита в моче 5 нг/мл. Относительная ошибка определения (n=3) менее 30 %.

Апробацию методики проводили с использованием образцов мочи лабораторных животных (крыс). Условия работы с экспериментальными животными соответствовали «Правилам лабораторной практики в Российской Федерации (GLP)» (утв. Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации 19.06.2003 N 267). Для апробации разработанной методики был проведен токсикологический эксперимент с группой крыс в количестве 5 шт., получавших подкожно сернистый иприт в дозе $\frac{1}{4}$ LD50 (2 мг/кг). Предварительно у всех задействованных в эксперименте крыс были взяты образцы мочи (холостая проба). Мочу крыс отбирали с использованием метаболических камер через 2, 3, 7, 14 и 21 сутки после экспозиции. Полученные пробы анализировали согласно разработанной методике. Пулирование проб для каждой точки не проводили, анализируя мочу каждой крысы отдельно и затем усредняя полученный результат.

2.3 Разработка методики определения N7-НЕТЕГ в крови

Подготовка проб крови к анализу

Аликвоту 2 мл размороженной крови встряхивали на вортексе до растворения осадка, затем проводили выделение ДНК с помощью специального коммерческого набора для выделения ДНК Экстран-1. Процедуру проводили согласно инструкции к набору. В полученный раствор ДНК вносили 10 мкл раствора внутреннего стандарта с концентрацией 1мкг/мл, а затем подвергли гидролизу, для чего добавили к раствору ДНК 10 мкл 1% раствора муравьиной кислоты и выдержали 1 час при температуре 80 °С. После этого раствор центрифугировали 12 мин при 12 000 об/мин, высушили досуха в токе азота и перерастворили сухой остаток в 100 мкл подвижной фазы. Параллельно готовили холостую пробу крови.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Выбор основного биомаркера воздействия сернистого иприта на ДНК

Механизм цитотоксического действия ипритов тесно связан с метаболизмом ксенобиотика в клетках. Полагают, что в реакцию алкилирования биологических субстратов (в том числе и ДНК) вступает не сам иприт, а активные промежуточные продукты его метаболизма. В основе повреждающего действия ипритов на ДНК лежит образование ковалентных связей с пуриновыми основаниями нуклеотидов (аденином, гуанином). Еще в 60-х годах авторы [118, 119, 120] в опытах смеченым ^{35}S -СИ установили, что главной мишенью для воздействия сернистого иприта на ДНК является N7 положение гуанина. Последующая потеря атома хлора приводит к образованию N7-гидроксиэтилтиоэтил-20-деоксигуанозина (НЕТЕ-N7dGuo), который, в свою очередь, вследствие депуринизации, превращается в свободный N7-гидроксиэтилтиоэтил гуанин (N7-НЕТЕГ) [121]. Структура образующегося соединения N7-НЕТЕГ приведена на рисунке 11.

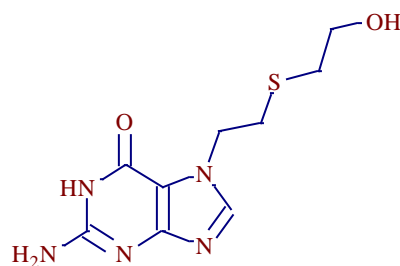


Рисунок 11 – Структурная формула N7-гидроксиэтилтиоэтил гуанина

Авторы [122] на основании серии опытов с накожным введением сернистого иприта морским свинкам обосновывают выбор N7-НЕТЕГ в качестве перспективного биомаркера поражений сернистого иприта. На настоящий момент установлено, что алкилирование ДНК протекает по 3-м основным сайтам: N7, O6 положения в гуанине и N3 –положение в аденине. В настоящее время в качестве биомаркеров воздействия сернистого иприта обычно рассматривают 4 типа

аддуктов: N7-(2-гидроксиэтилтиоэтил)-2'-гуанин (N7-НЕТЕГ), бис(2-этил-N7-гуанин)тиоэфир (*Bis-G*), образующийся в результате реакции по каждому положению N7 двух остатков гуанина в двухцепочечной ДНК, N3 - (2-гидроксиэтилтиоэтил) - 2' -аденин (N3-НЕТЕА) и O6-(2-гидроксиэтилтиоэтил)-2'-гуанин (O6 - НЕТЕГ) [121]. Структурные формулы аддуктов приведены на рисунке 12.

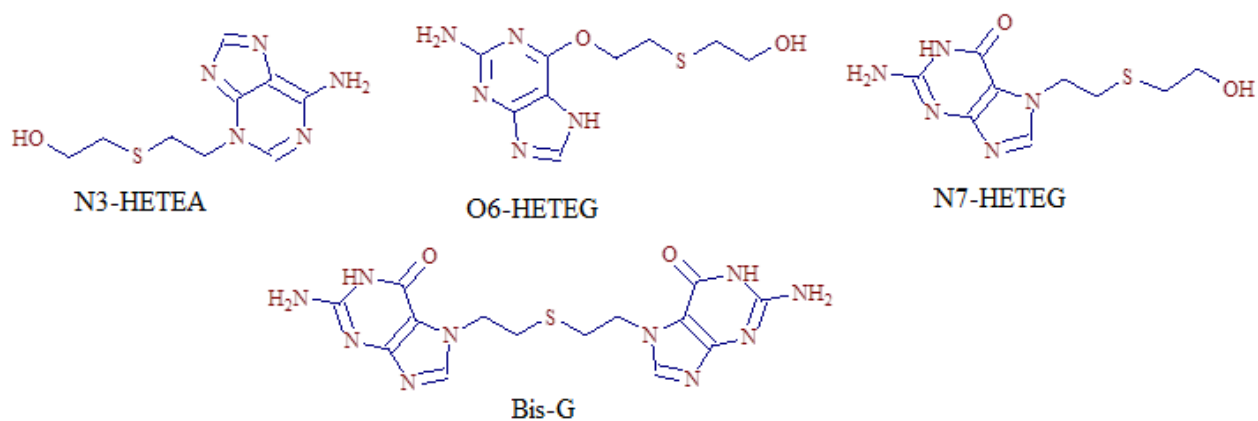


Рисунок 12 – Структурные формулы аддуктов СИ-ДНК

В работе [68] сообщается о том, что образование аддуктов сернистого иприта с ДНК протекает в соответствии со следующим процентным соотношением: по положению N7 гуанина (61%), по положению N3 аденина (16%), по двум положениям N7 гуанина как межнитевая, так и внутрицепочечная сшивка (около 17%), по положению O6 гуанина (0.1%). Именно по причине максимального выхода в качестве биомаркера воздействия сернистого иприта чаще всего используют N7-НЕТЕГ. Его биоаналитическая значимость ограничена как вследствие химической нестабильности, так и того, что он не участвует в спаривании оснований по Уотсону-Крику [123]. Тем не менее, этот аддукт в количественном отношении преобладает в значительной степени над остальными, что обуславливает его выбор в качестве целевого вещества при разработке методик определения аддуктов сернистого иприта с ДНК в биологических образцах.

Для разработки и валидации биоаналитической методики в лаборатории химического моделирования ФГУП «НИИ ГПЭЧ» при участии к.х.н.

В.В.Абзианидзе был синтезирован стандартный образец N7-НЕТЕГ, который не производится ни одной фирмой в качестве коммерческого образца.

3.1.1. Синтезированный образец N7-НЕТЕГ в качестве аналитического стандарта

Разработка аналитической методики неосуществима без стандартного образца определяемого вещества. Вместе с тем, аддукты ТХ с ДНК представляют собой биогенные вещества, зачастую имеющие сложное строение, и синтез таких не всегда представляется возможным.

В работе [124] описана процедура синтеза N7-НЕТЕГ путем обработки гуанозинмонофосфата 2 мМ раствором сернистого иприта в кислой среде. Метод отличается длительностью и сложностью процедуры и последующей очистки образца. В [125] предложена более простая процедура синтеза, также основанная на обработке гуанозинмонофосфата раствором сернистого иприта в водной среде с образованием соли N-7-[2-[(2-гидроксихлороэтил)тио]этил]гуанозина монофосфата. Соль подвергли очистке путем экстракции дихорметаном, депуринизации соляной кислотой, затем полученный водный экстракт гидрохлорида N7-НЕТЕГ нейтрализовали аммиачным раствором с получением нерастворимого органического основания (N-7-[2-[(2-гидроксиэтил)тио]этил]гуанина).

Для селективного протекания синтеза N7-моноалкильного гуанинового аддукта сернистого ипритаважно правильно выбрать растворитель, рН раствора и субстрата.

При планировании нашей работы, мы отдали предпочтение синтезу, процедура которого предложена в [126]. В этом варианте не используют токсичный сернистого иприта, заменяя его на, так называемый, полуиприт (2-(2-хлорэтилтио)этанол), который синтезируют по методике [127]. Схемы синтеза приведены на рисунке 13.

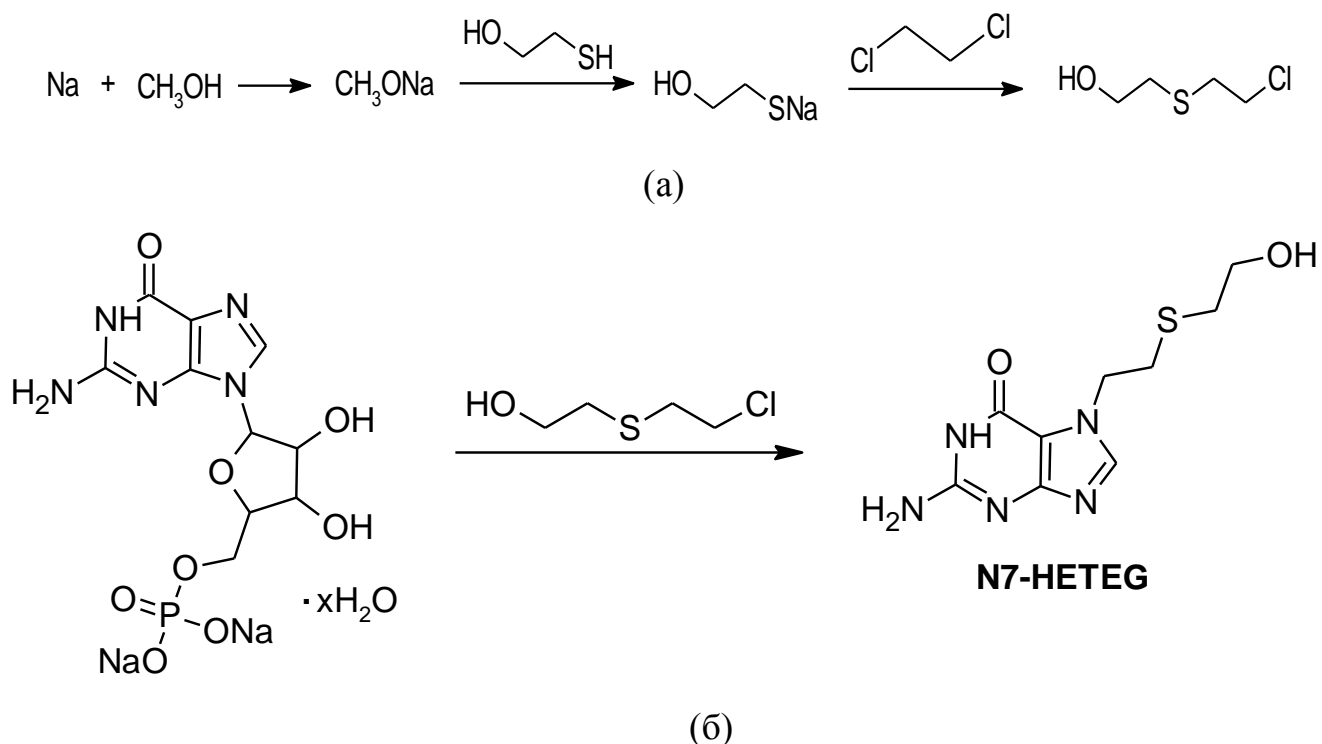


Рисунок 13 - Схема синтеза: а) 2-(2-хлорэтилтио)этанола; б) N7-HETEG

3.1.2 Подтверждение структуры и чистоты синтезированного образца N7-HETEG

Для подтверждения структуры и контроля примесей синтезированный образец N7-HETEG растворяли в деионизованной воде до концентрации 1 мкг/мл и анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС высокого разрешения. В результате сканирования в широком диапазоне масс установлено, что в предлагаемых условиях регистрируется пик соединения с точным значением m/z 256,08627, соответствующее иону $[\text{M}+\text{H}]^+$.

На рисунке 14 представлена ВЭЖХ-МС/МС хроматограмма синтезированного образца N7-HETEG.

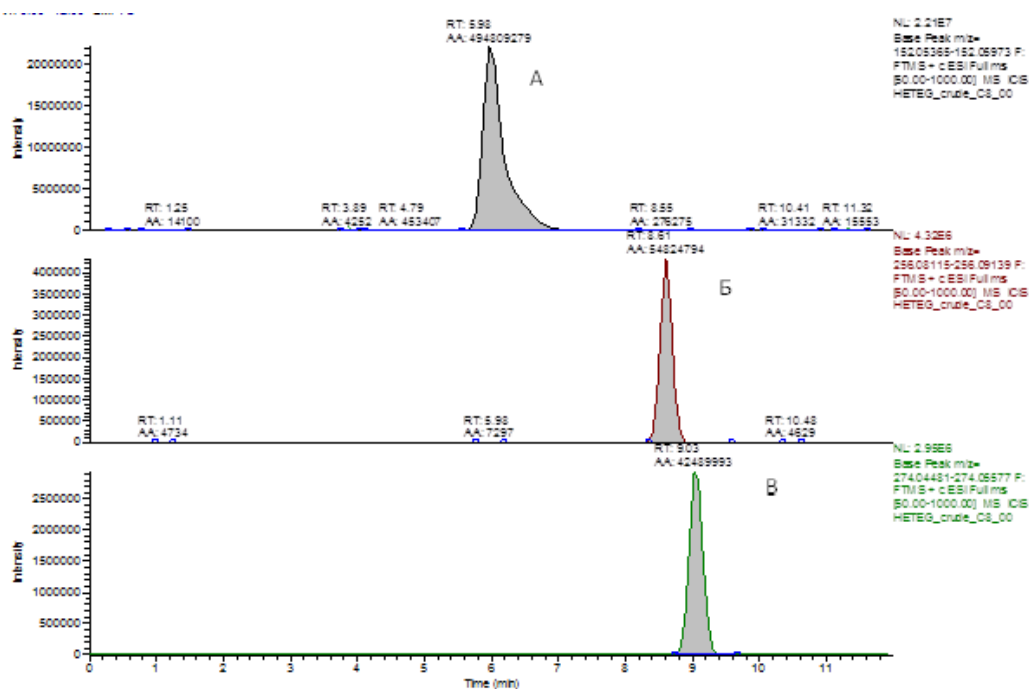


Рисунок 14 - ВЭЖХ-МС/МС хроматограмма синтезированного образца *N7*-НЕТЕГ. (А) – примесь 1, m/z 152,0566; (Б) – *N7*-НЕТЕГ, m/z 256,0862 - $[M+H]^+$; (В) – примесь 2, m/z 274,0502

По данным ВЭЖХ-МС анализа синтезированный образец *N7*-НЕТЕГ содержит примеси, элюирующиеся с колонки до (рисунок 3А) и после (рисунок 3В) основного вещества. Примесь А представляет собой непрореагировавший в реакции гуанин. Очистку синтезированного образца *N7*-НЕТЕГ от примесей проводили методом препаративной ВЭЖХ.

3.1.3. Процедура очистки стандартного образца *N7*-НЕТЕГ

Очистку синтезированного образца *N7*-НЕТЕГ от примесей проводили методом препаративной ВЭЖХ. В результате очистки содержание примесей в образце по отношению к содержанию целевого вещества уменьшилось в 2000 раз. Образец *N7*-НЕТЕГ после очистки был высушен в роторном испарителе и использовался в дальнейших исследованиях в качестве аналитического стандарта с установленным содержанием основного вещества не менее 90 %.

Для определения характеристичных ионов и подбора условий элюирования аддукта была приготовлена и проанализирована серия растворов *N7*-НЕТЕГ в

деионизованной воде с концентрацией от 1 мкг/мл до 10 нг/мл. На рисунке 7 приведена масс-хроматограмма стандартного раствора с концентрацией 10 нг/мл. Идентификация по точным значениям масс не может обеспечить необходимой селективности в сложных биологических матрицах (моча, кровь и т.д.), поэтому предпочтительно определить один или несколько продукт-ионов, по которым осуществляется определение искомого аналита. Для определения продукт-ионов в аналогичных условиях был выполнен ВЭЖХ-МС/МС анализ водного раствора синтезированного препарата *N7-НЕТЕГ*, в результате чего удалось установить используемый для идентификации характеристичный переход (256,08→105,03690).

RT: 0.00 - 12.04 SM: 7G

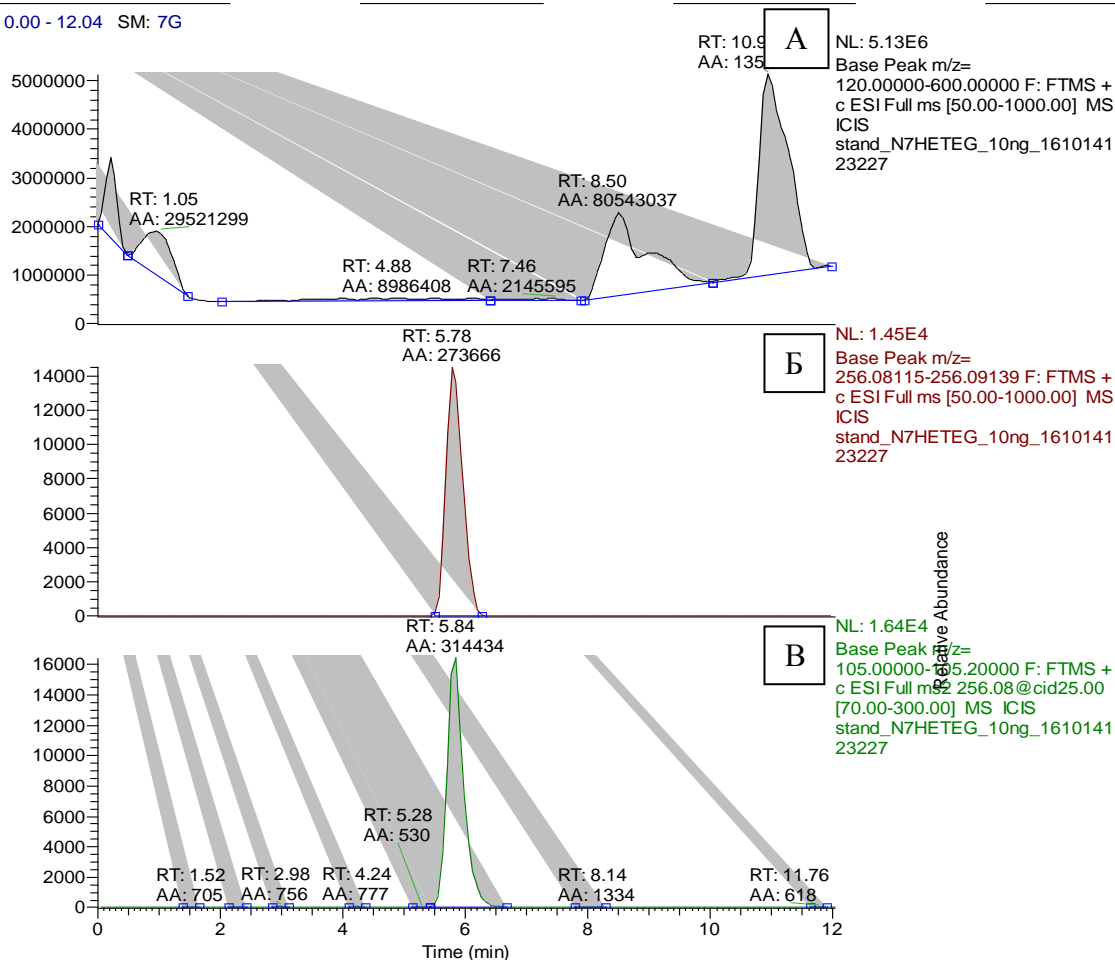


Рисунок 15 - Масс-хроматограмма стандартного раствора N7-НЕТЕГ в воде

- (А): Масс-хроматограмма мочи крысы, реконструированная по общему ионному току
- (Б): Масс-хроматограмма, реконструированная по выделенным ионам иона-предшественника N7-НЕТЕГ(m/z 256,08)
- (В) Масс-хроматограмма, реконструированная по выделенным ионам продукт-иона N7-НЕТЕГ(m/z 105,0369)

Как видно из масс-хроматограммы, соединение имеет четкие пики иона-предшественника с m/z 256,08627 (рисунок 7 Б) и продукт-иона с m/z 105,03690 (рисунок 7 В).

Предполагаемый механизм процесса фрагментации и структура ионов представлены на рисунке 16.

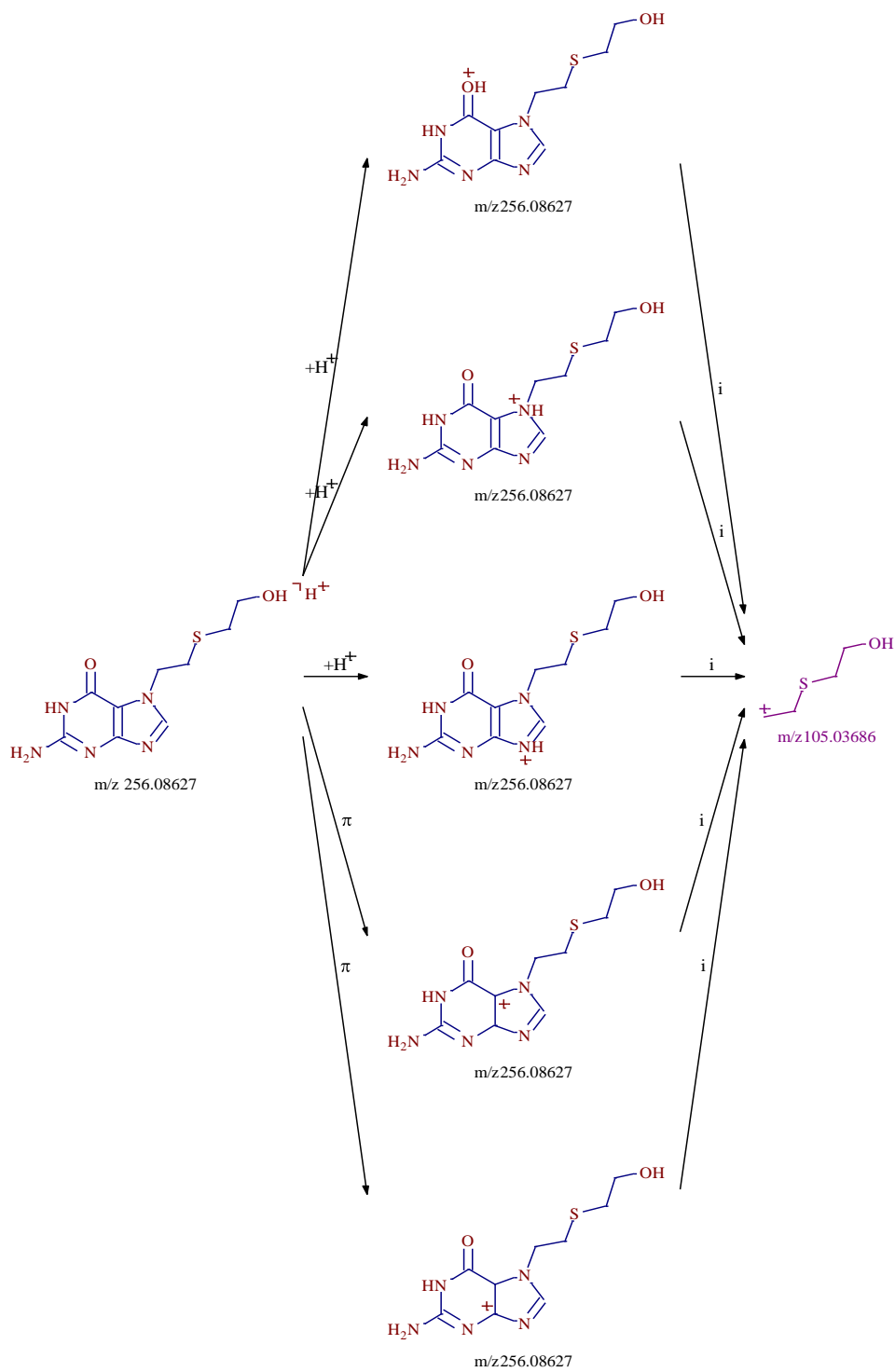


Рисунок 16 – Предполагаемый механизм образования продукт-ионов N7-НЕТЕГ

3.2 Разработка методик определения N7-НЕТЕГ в моче и крови.

Выбор биоматрицы является важным этапом разработки методики. В случае аддуктов цитостатиков с ДНК в качестве матрицы может выступать либо цельная кровь, в таком случае, требуется выделение и затем гидролиз ДНК с целью обнаружения аддуктов, либо моча, в которой аддукты находятся уже в депурированном состоянии и достаточно их просто сконцентрировать. С целью выбора оптимальной матрицы, нами были опробованы оба варианта. Для оценки полноты извлечения к образцу биологической жидкости добавляли внутренний стандарт. В качестве последнего использовали 8-(1-гидроксипропан-2-иламино)-1,3,7-триметил-1-пурин-2,6(3Н,7Н), синтезированный в лаборатории химического моделирования ФГУП «НИИ ГПЭЧ». Его структурная формула приведена на рисунке 17.

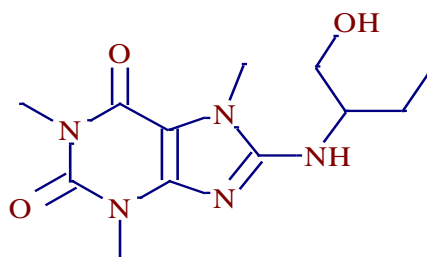
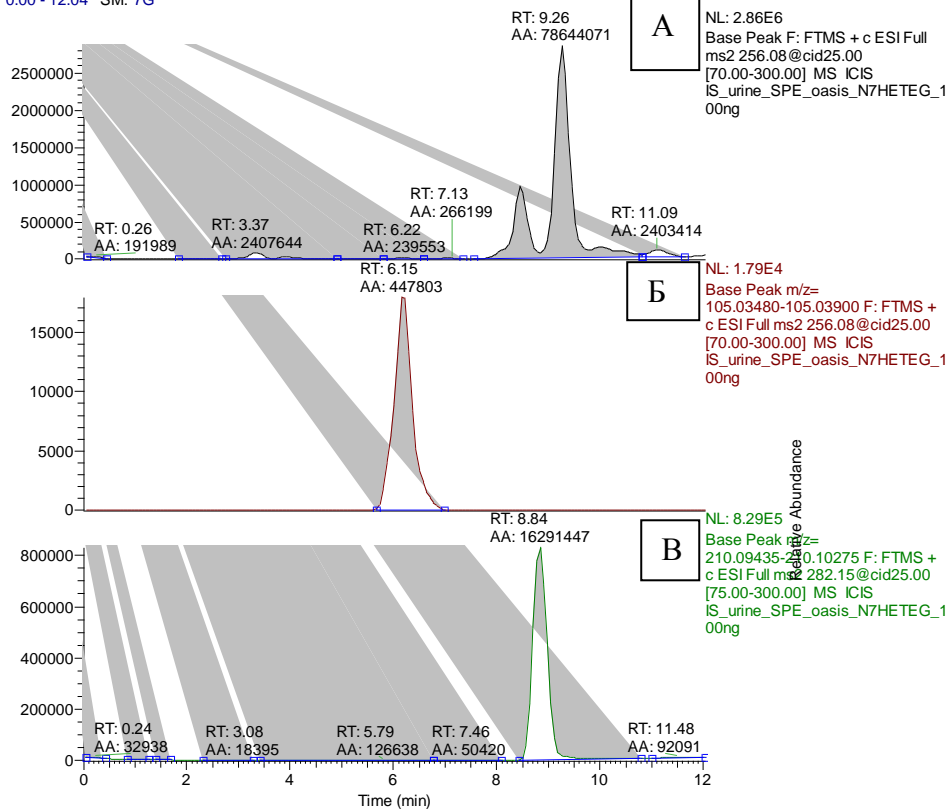


Рисунок 17 - Структурная формула внутреннего стандарта

3.2.1 Методика определения N7-НЕТЕГ в моче

При разработке стадии очистки и концентрирования нами учитывалась не только степень извлечения, но и чистота полученной пробы, т.к. загрязнение ко-элюирующимися компонентами мочи крыс негативно влияет на чувствительность анализа и работу детектора. В качестве иллюстрации на рисунке 18 приведена масс-хроматограмма пробы мочи крыс с внесением 100 нг N7-НЕТЕГ и внутреннего стандарта, подготовленной согласно разработанной методике.

RT: 0.00 - 12.04 SM: 7G



IS_urine_SPE_oasis_N7HETEG_100ng #402 RT:

F: FTMS + c ESI Full ms2 256.08@cid25.00 [70 ...

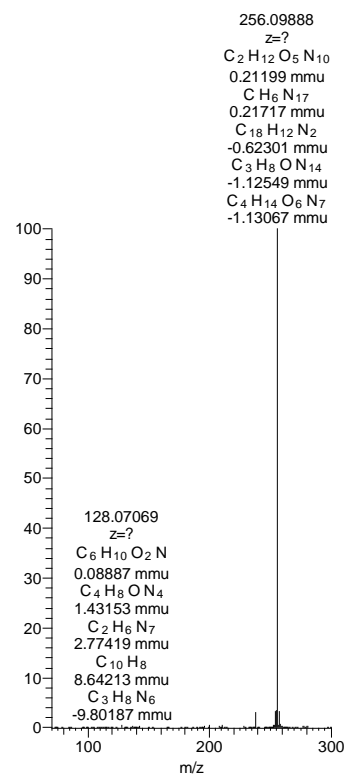


Рисунок 18 - Масс-хроматограмма пробы мочи крыс:

(А): Масс-хроматограмма мочи крысы, реконструированная по m/z 256,08, характерному для иона-предшественника N7-НЕТЕГ.

(Б): Масс-хроматограмма, реконструированная по выделенным ионам характерного для N7-НЕТЕГMRM-перехода (256,08→105,0369)

(В): Масс-хроматограмма, реконструированная по выделенным ионам характерного для внутреннего стандарта MRM-перехода (282,16→210,09855)

Из рисунка 18 видно, что в моче крыс в высокой концентрации присутствует соединение, продуцирующее сигнал с m/z 256,08, которое при пробоподготовке элюируется с патрона вместе с аналитом и вызывает помехи при идентификации и количественной оценке содержания N7-НЕТЕГ в пробе, в связи с чем идентификацию аддукта следует проводить только по продукт-иону и использовать нормировку по внутреннему стандарту. Матричные эффекты удалось снизить лишь незначительно путем разбавления экстракта 100 мкл воды, а также подбором условий хроматографирования.

Для получения градуировочной характеристики была приготовлена и проанализирована серия проб мочи крыс с внесением N7-НЕТЕГ в концентрациях 1, 10, 100 нг/мл и добавкой внутреннего стандарта в концентрации 1 нг/мл. На основании полученных данных были вычислены относительные площади пика N7-НЕТЕГ и построен график зависимости относительной площади пика от концентрации (рисунок 19).

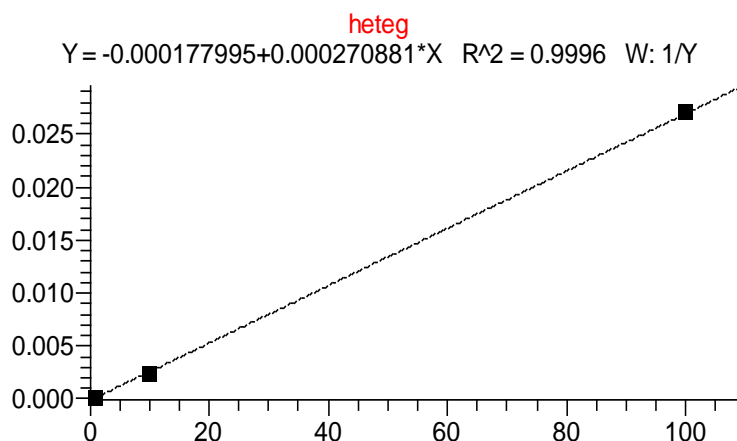


Рисунок 19 - Градуировочный график зависимости нормализованной площади пика N7-НЕТЕГ от концентрации

Матричный фактор, нормализованный на внутренний стандарт, определяемый отношением матричного фактора аналита к матричному фактору внутреннего стандарта, составляет 12%. Нижний предел определения аналита в моче 5 нг/мл. Относительная ошибка определения (n=3) менее 30 %.

Результаты разработки методики опубликованы в [128, 129, 130, 131].

3.2.2 Методика определения N7-НЕТЕГ в крови

В эксперименте *in vitro* серия проб крови человека и крыс (1 мл) была экспонирована раствором сернистого иприта с концентрациями 10 нг/мл, 50 нг/мл, 100 нг/мл, 1 мкг/мл и 10 мкг/мл. К 1 мл цельной крови добавляли раствор сернистого иприта, встряхивали на вортексе 10 мин и инкубировали 1 ч при температуре 37°C.

Было установлено, что N7-НЕТЕГ детектируется в крови только в режиме *in vitro* при внесении чрезвычайно высоких доз сернистого иприта (от 1 мг/мл). На рисунке 20 приведена масс-хроматограмма пробы крови человека, экспонированной сернистым ипритом с концентрацией 10 мг/мл. Эффективность гидролиза ДНК контролировали по площади пика гуанина. Это приблизительно совпадает с литературными данными [132].

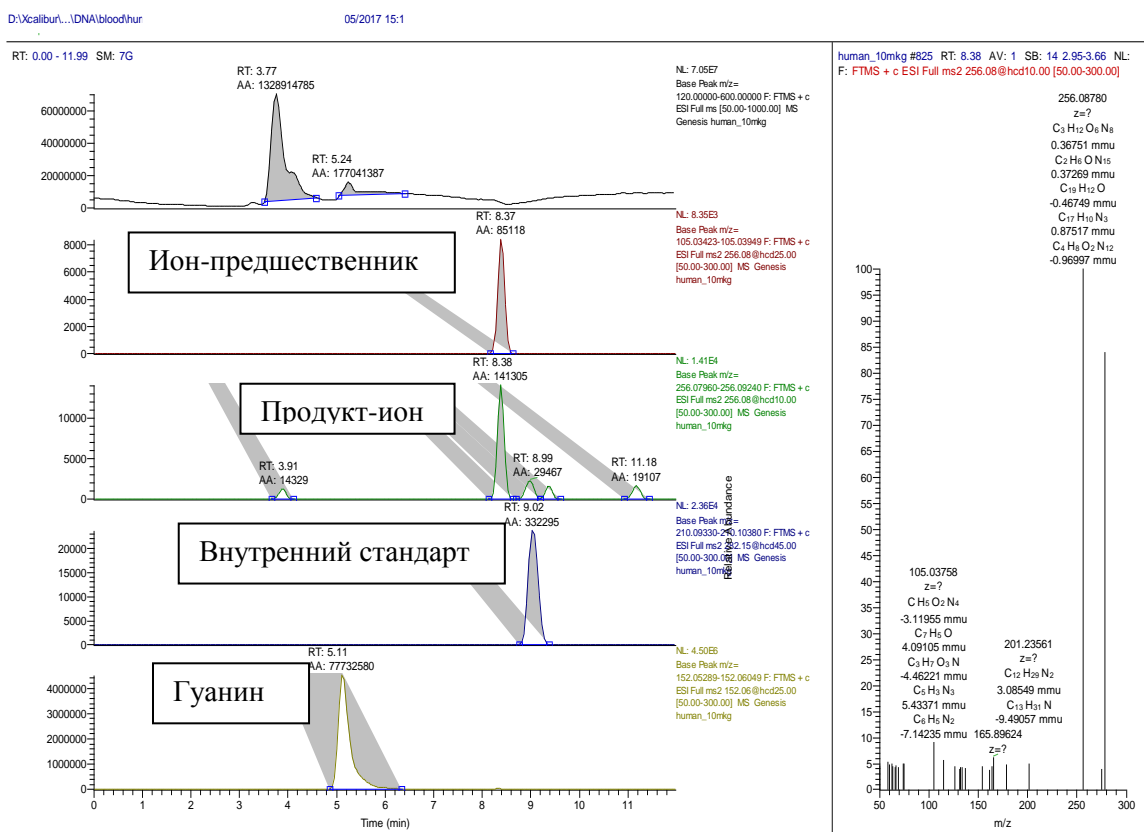


Рисунок 20 - Масс-хроматограмма пробы крови человека, экспонированной сернистым ипритом

При сравнении профилей масс-хроматограмм не было обнаружено достоверной разницы между кровью человека и крысы, матричные эффекты, интенсивно проявляющие себя при анализе проб мочи, отсутствуют.

3.3 Апробация методик определения N7-НЕТЕГ в моче и крови при анализе биообразцов, полученных в экспериментах *in vivo*

В эксперименте *in vivo* анестезированным крысам подкожно вводили сернистый иприт в дозе 2 мг/кг. Мочу крыс отбирали с использованием

метаболических камер через 2, 3, 7, 14 и 21 сутки после воздействия сернистого иприта. Кровь крыс отбирали через 1сут., 2сут., 3 сут., 7 сут., 14 сут. и 21 сут.

В пробах мочи крыс, полученной в эксперименте *in vivo*, N7-НЕТЕГ успешно детектировался до 7-ми суток после введения сернистого иприта, таблица 4.

Таблица 4 – Результаты определения N7-НЕТЕГ в моче крыс, экспонированных сернистым ипритом дозой 2 мг/кг.

Время, сут.	Концентрация N7-НЕТЕГ, нг/мл
2	172±52
3	35±11
7	40±12
14	5±2
21	<5

Профиль экскреции, полученный в ходе наших экспериментов, приблизительно совпадает с профилем, приведенным в работе [121], где кролики подвергались накожному воздействию сернистого иприта при совпадении доз сернистого иприта (2 мг/кг).

В работе [67] при накожной аппликации значительно более высоких доз сернистого иприта (от 5.5 до 22 мг/кг получены схожие графики, однако в качестве матрицы авторы использовали кожу.

Ни в одной из проб крови, полученных в эксперименте *in vivo*, не удалось детектировать N7-НЕТЕГ, несмотря на присутствие пика гуанина, указывающего на то, что происходит разложение ДНК.

С учетом результатов токсикологического эксперимента в качестве перспективной биоматрицы для определения N7-НЕТЕГ была выбрана моча. Успешное определение аддукта именно в моче обусловлено тем, что его экскреция с мочой происходит уже в депуринизированном виде, что создает благоприятные условия для анализа. Кроме того, неинвазивный отбор мочи

предпочтителен в сравнении с отбором крови для мониторинга повреждающего действия цитостатиков на ДНК. По этим причинам моча была выбрана в качестве исследуемой биоматрицы при разработке методического обеспечения для оценки эффективности АЦЦ в качестве скавенджера при поражениях сернистым ипритом. Основу методического обеспечения составляла методика совместного определения в моче аддуктов сернистого иприта с ДНК (N7-НЕТЕГ) и АЦЦ (СБАЦЭ).

3.4 Разработка и апробация методики совместного определения аддуктов сернистого иприта с ДНК и АЦЦ в моче

Изучение степени и характера химических взаимодействий между алкилирующим агентом, антидотом (скавенджером) и внутренними системами организма является ключом к пониманию сложной схемы ответа организма на оказанное внешнее воздействие. Несмотря на то, что механизм действия изучают на протяжении многих лет, недавние исследования показывают, что он намного сложнее, чем предполагалось ранее [133]. В случае реального воздействия ТХ на организм, алгоритм действий включает в себя оказание необходимой медицинской помощи, включая меры детоксикации и возможное введение известных антидотов. Новые подходы в терапии поражений сосредотачиваются на исследовании действия скавенджеров реактивных форм кислорода (РФК), таких, как α -линоленовая кислота и АЦЦ [134], противовоспалительных препаратов (силибинин [135]), ингибиторов полимеразы и матричной металлопротеиназы, регуляторов репарации повреждений ДНК [136]. В связи с разработкой методов терапии, требуется корректировка данных о профиле выведения биомаркеров воздействия, изменения которого повлечет за собой возникновение неточностей при установлении факта и времени воздействия сернистого иприта [137,138]

1,1'-сульфонилбис[2-S-(N-ацетилцистеинил)этан] (СБАЦЭ) является продуктом взаимодействия сернистого иприта с белками и β -лиазой. Это

экзогенное соединение, присутствие которого однозначно говорит об имевшем место факте воздействия сернистого иприта на организм человека.

Классически СБАЦЭ определяют методом ВЭЖХ-МС/МС с ионизацией термораспылением; в частности, в работе [139] достигнут предел обнаружения 25 нг/мл для диметилпроизводного. Существенно более низкий предел обнаружения (1 нг/мл) получен при использовании ВЭЖХ-МС/МС с ионизацией электрораспылением для не подвергнутого дериватизации конъюгата [140]. В последнем случае аналит концентрировали из подкисленной мочи на полимерных картриджах для твердофазной экстракции и детектировали в режиме регистрации отрицательных ионов с мониторингом множественных реакций. В работе [141] предложена методика определения СБАЦЭ в плазме и моче крыс, включающая ТФЭ и анализ методом ВЭЖХ-ЭС-МС/МС в режиме отрицательной ионизации. Авторам удалось достигнуть предела обнаружения 0,05 нг/мл, при этом значимые количества СБАЦЭ удалось обнаружить в моче даже спустя 22 дня после экспозиции.

В литературе отмечается [142, 143], что АЦЦ является скавенджером, введение которого позволяет значительно снизить повреждения, возникающие при воздействии сернистого иприта. Хотя введение АЦЦ позволяет снизить проявление симптомов интоксикации у пострадавших от воздействия сернистого иприта, до конца не выяснено, обусловлен ли этот эффект лишь физиологическими процессами, или также и химическими взаимодействиями. В опытах *in vitro* введение АЦЦ не способствовало снижению концентрации иприта в сыворотке крови после инкубирования в течение 2 ч при 37°C [142]. Таким образом, авторы данных работ делают вывод о том, что имеющий место защитный эффект связан скорее с физиологическими процессами, например, со связыванием активных форм кислорода, нежели с прямым химическим взаимодействием сернистого иприта со скавенджерами. Той же точки зрения придерживаются авторы [134], изучившие действие антиоксидантов в эндотелиальных клетках, экспонированных хлорамбуцилом, являющимся

производным азотистого иприта. Данных о влиянии введения АЦЦ на содержание СБАЦЭ в биоматрицах при литературном поиске не обнаружено.

В рамках исследования представляется интересным не только оценить количественно содержание N7-НЕТЕГ в моче крыс, но также сравнить количество аддукта СБАЦЭ в группах крыс, получавших терапию и без нее. В этой связи нами был поставлен эксперимент *in vivo* с использованием двух групп подопытных животных, в котором одной группе крыс вводили сернистого иприта (2 мг/кг), а второй группе крыс – сернистого иприта в той же дозе и АЦЦ (200 мг/кг). Выбор именно АЦЦ в качестве скавенджера объясняется его доступностью, низкой токсичностью, наличием литературных данных о том, что применение АЦЦ способствует смягчению симптомов воздействия сернистого иприта¹⁴², а также ряда медицинских препаратов на основе азотистого иприта, применяющихся в химиотерапии онкобольных и обладающих схожим действием [144, 145, 146].

Интерес представляет изучение кинетики выведения и распределения обоих аддуктов, как в ситуации без лечения АЦЦ, так и в случае его применения. На настоящий момент при литературном поиске экспериментальных данных, полученных в ходе эксперимента *in vivo* и демонстрирующих влияние скавенджера на кинетику выведения аддукта сернистого иприта с АЦЦ и СБАЦЭ не обнаружено. Авторы [142] изучали образование и структуру аддуктов с альбумином, образующихся при инкубировании сыворотки крови с сернистого иприта в сочетании с различными дозами АЦЦ в формате *in vitro*, не уделяя внимания аддуктам с ДНК. В то же время, для оценки защитного потенциала АЦЦ, а также изменения кинетических параметров, необходимо исследовать процессы, протекающие *in vivo*.

Вместе с тем, эта информация может оказаться весьма полезной не только для понимания биохимии протекающих процессов, прогнозирования лечения, но и для оценки возможных сроков установления факта воздействия сернистого иприта.

Таким образом, исследование выведения биомолекулярных аддуктов сернистого иприта при терапии сквенджером ранее не проводилось и представляет значительный интерес для биомониторинга экскреции аддуктов сернистого иприта.

3.4.1 Модификация разработанной методики определения N7-НЕТЕГ в моче

Для совместного определения N7-НЕТЕГ и СБАЦЭ в моче в разработанную ранее методику определения N7-НЕТЕГ в моче необходимо внести ряд изменений.

Отдельные трудности возникли при разработке процедуры подготовки проб. Этот эффект был вполне ожидаем, т.к. для анализа были выбраны вещества с сильно различающимися свойствами. Так, в диссертационной работе И.А. Родина [147] показано, что «высокая полярность СБАЦЭ и существование в заряженной форме не позволяют добиться высоких степеней извлечения определяемого вещества, таким образом твердофазная экстракция на удерживание не подходит для проведения пробоподготовки». В то же время, N7-НЕТЕГ является существенно менее полярным соединением, его извлечение и концентрирование из мочи производится в режиме удерживания, а не пропускания, в отличие от СБАЦЭ. Таким образом, было необходимо модифицировать разработанную нами ранее методику пробоподготовки мочи чтобы обеспечить удовлетворительное извлечение и концентрирование обоих интересующих веществ. Взяв за основу схему твердофазной экстракции (ТФЭ) из источника [72], мы опробовали несколько вариантов ее модификации, включая подбор патронов для ТФЭ и условий элюирования. Для отработки методики была приготовлена серия пулированных проб мочи крыс с внесением N7-НЕТЕГ и СИ-АЦЦ. Для контроля полноты извлечения в пробу мочи добавляли внутренний стандарт [148].

Были опробованы следующие виды коммерчески доступных картриджей ТФЭ: OASISHLB, SupelcoHLB, SupelcleanENVI-8, SupelcoC18, Sep-PackC18. На

картриджи наносили по 1 мл пулированной мочи крыс, содержащей искусственные добавки обоих аналитов в концентрации 100 нг/мл и внутренний стандарт в концентрации 10 нг/мл, с последующей обработкой различными элюентами в разных режимах. Эффективность извлечения аналитов оценивали по площадям пиков продукт-ионов N7-НЕТЕГ (m/z 105.03690) и СИ-АЦЦ (m/z 403.06454). В качестве элюентов были опробованы различные системы растворителей (метанол/вода, ацетонитрил/вода) в разных объемных соотношениях. Результаты проведенных исследований отражает таблица 5.

Таблица 5 - Подбор условий ТФЭ при разработке методики определения N7-НЕТЕГ и СБАЦЭ

Наименование	Площади пиков, тыс. у.е.			
	Загрузка	10% ацетонитрил	50% ацетонитрил	90% ацетонитрил
Supelco HLB				
N7-НЕТЕГ (105.03690)	62	6700	54	-
СБАЦЭ (403.06454)	3800	1100	16	-
ENVI-8				
N7-НЕТЕГ (105.03690)	-	3800	550	-
СБАЦЭ (403.06454)	-	-	6300	-
OASISHLB				
N7-НЕТЕГ (105.03690)	-	7400	700	-
СБАЦЭ (403.06454)	230	7300	50	-
Diol				
N7-НЕТЕГ	500	3700	120	66

(105.03690)				
СБАЦЭ (403.06454)	1900	3500	200	34
Supelco C18				
N7-НЕТЕГ (105.03690)	2600	37	130	-
СБАЦЭ (403.06454)	1700	4500	230	32

Замена ацетонитрила на метанол в качестве составляющей элюента не дала выраженных преимуществ, так же, как и варьирование рН элюента за счет внесения больших или меньших количеств муравьиной кислоты.

Обобщив и проанализировав полученные данные, для проведения экстракции было решено использовать патроны ENVI-8 фирмы Supelco. Стадией промывки патронов пришлось пренебречь, чтобы не допустить потерь аналита. Оптимальная разработанная схема подготовки проб к анализу включала кондиционирование патрона ENVI-8 фирмы Supelco двукратной промывкой 1 мл ацетонитрила с последующей трехкратной промывкой 1 мл воды, загрузку 1 мл содержащей 10 нг внутреннего стандарта мочи, элюирование аналитов двумя порциями по 1 мл 50 % ацетонитрила в 5 % муравьиной кислоте (v/v), перерастворение объединенного элюата в 100 мкл смеси равных объемов ацетонитрила и воды, центрифугирование и разбавление 100 мкл воды.

Поскольку регистрация аналитов производится по продукт-ионам, методика обладает высокой селективностью; эффект переноса отсутствует. Предел количественного определения (ПКО) для обоих аналитов - 10нг/мл, ошибка определения каждого составляет 15%.

При использовании внутреннего стандарта, большое количество проведенных опытов позволяет добиться удовлетворительных значений коэффициента вариации (15%) и воспроизводимости разработанной методики.

Для получения градуировочных характеристик была приготовлена и проанализирована серия проб мочи крыс с внесением N7-НЕТЕГ и СБАЦЭ с

концентрациями 1, 10, 50, 100 и 200 нг/мл и добавкой внутреннего стандарта с концентрацией 10 нг/мл. На основании полученных данных были вычислены относительные площади пика N7-НЕТЕГ и СБАЦЭ и построен график зависимости относительной площади пика от концентрации (рисунки 21, 22).

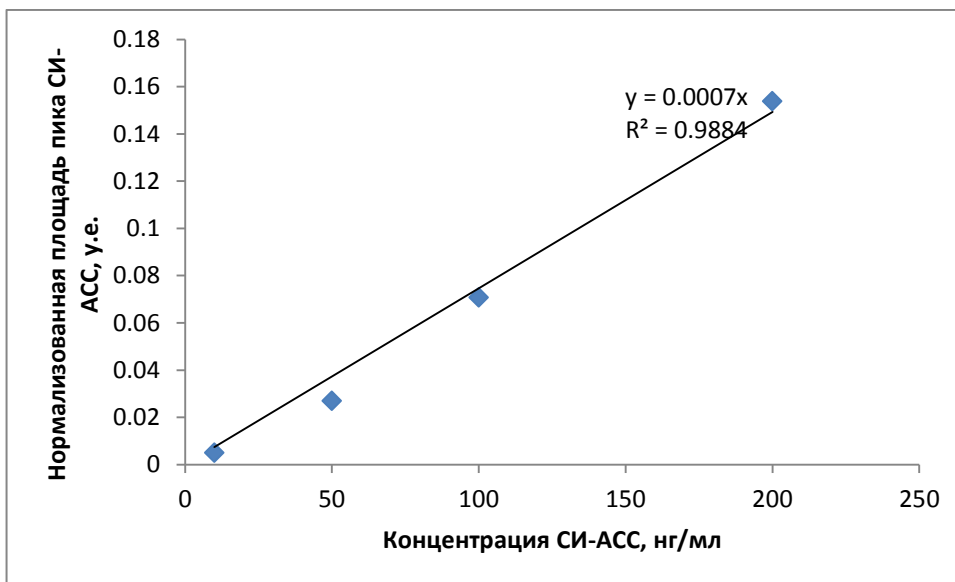


Рисунок 21 - Градуировочный график зависимости нормализованной площади пика N7-НЕТЕГ от концентрации

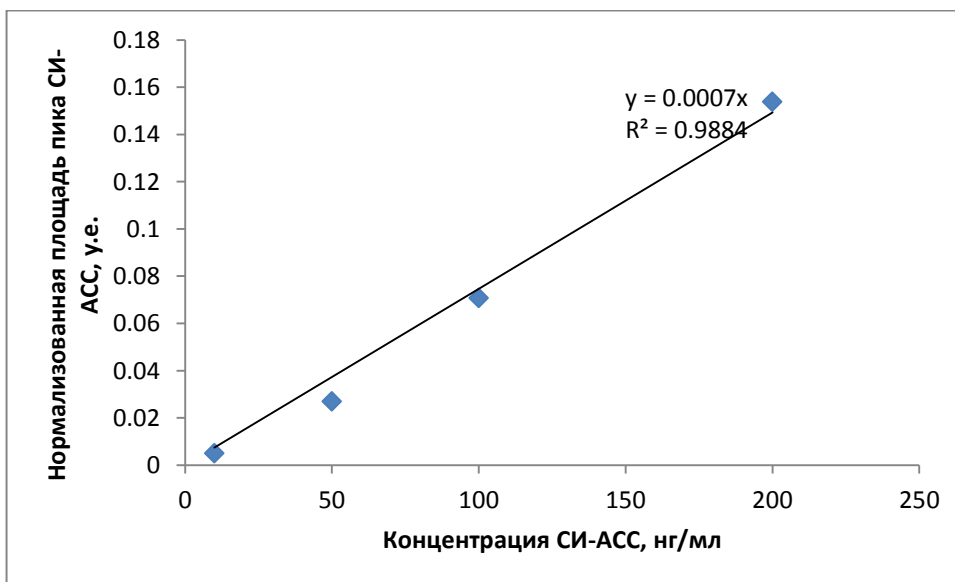


Рисунок 22 – Градуировочный график зависимости нормализованной площади пика СБАЦЭ от концентрации

3.4.2 Апробация разработанной методики в опыте *in vivo*

Условия работы с экспериментальными животными соответствовали «Правилам лабораторной практики в Российской Федерации (GLP)» (утв. Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации 19.06.2003 N 267). Для апробации разработанной методики был проведен токсикологический эксперимент с двумя группами крыс, одна из которых получала внутривентриально сернистый иприт в дозе $\frac{1}{4}$ LD₅₀ (2 мг/кг), другая – ту же дозу сернистого иприта в сочетании с терапией АЦЦ. Раствор АЦЦ вводили двукратно за 3 ч и за 0,5 ч перед введением сернистого иприта в дозе 200 мг/кг. Предварительно у всех задействованных в эксперименте крыс были взяты образцы мочи (холостая проба). В опыте были использованы 10 крыс (5 крыс экспонированы сернистого иприта и 5 крыс – сернистого иприта и АЦЦ).

Следует отметить, что в предыдущем эксперименте был выбран подкожный способ введения сернистого иприта, в то время, как при разработке данной методики мы отдали предпочтение внутривентриальному способу введения, поскольку в этом варианте вещество максимально быстро доставляется в общий кровоток.

Мочу крыс отбирали с использованием метаболических камер через 3 часа, 1, 2, 3, 7 сутки после экспозиции. Полученные пробы анализировали согласно разработанной методике. Мочу от каждой крысы анализировали отдельно, полученный результат усредняли.

На рисунке 23 в качестве иллюстрации представлена масс-хроматограмма образца мочи крыс, полученная в опыте *in vivo* на второй день после экспозиции сернистого иприта с внесением внутреннего стандарта в количестве 10 нг.

RT: 0.00 - 15.00 SM: 1

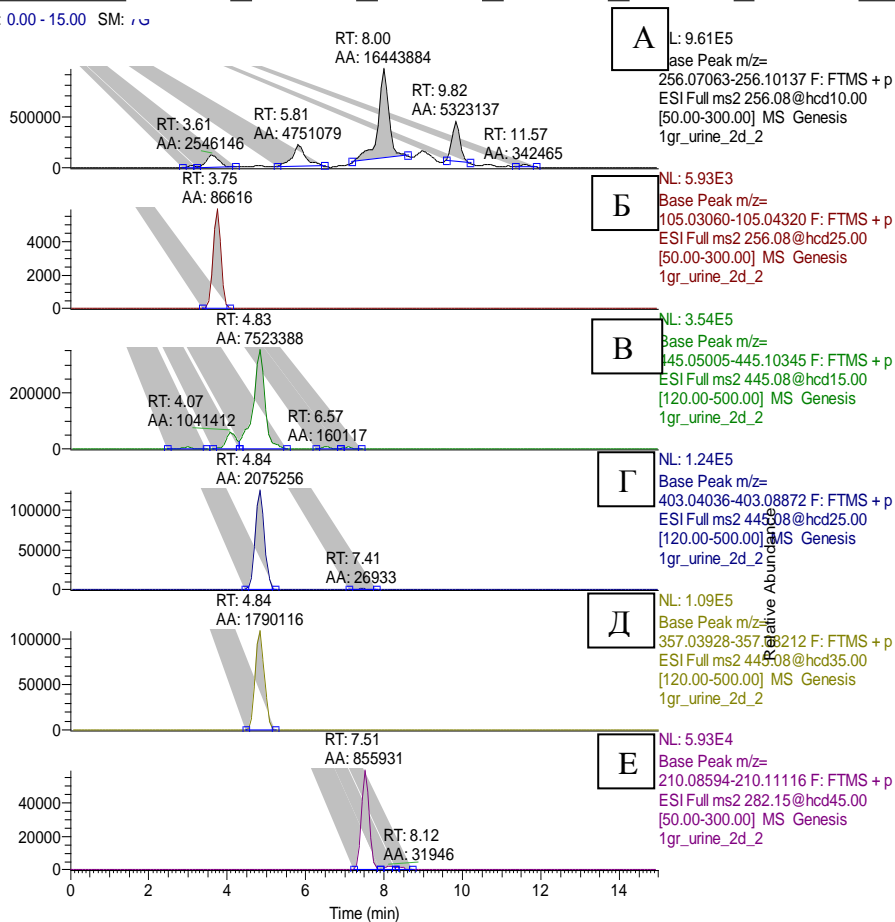
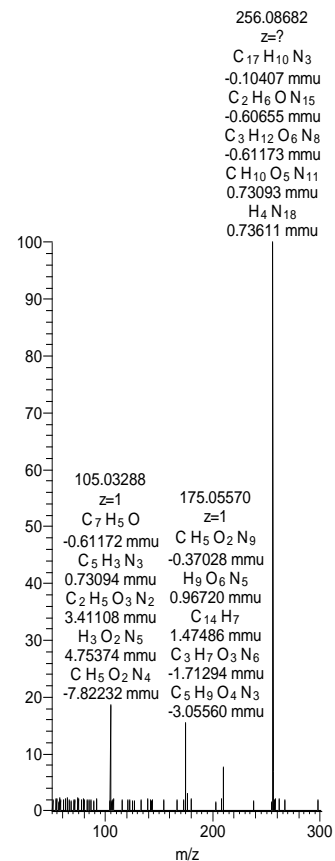
1gr_urine_2d_2 #396 RT: 3.75 AV: 1 SB: 9
F: FTMS + p ESI Full ms2 256.08@hcd25.00 [50 ...

Рисунок 23 - Масс-хроматограмма мочи крыс на второй день после экспозиции
СИ

(А): Масс-хроматограмма мочи крысы, реконструированная по m/z 256,08, характерному для иона-предшественника N7-НЕТЕГ.

(Б): Масс-хроматограмма, реконструированная по выделенным ионам характерного для N7-НЕТЕГMRM-перехода (256,08→105,0369)

(В) Масс-хроматограмма мочи крысы, реконструированная по m/z 445,08, характерному для иона-предшественника СБАЦЭ.

(Г) Масс-хроматограмма, реконструированная по выделенным ионам характерного для СБАЦЭ MRM-перехода (445,07675→403.06454)

(Д) Масс-хроматограмма, реконструированная по выделенным ионам характерного для СБАЦЭ MRM-перехода (445,07675→357,0607)

(Е): Масс-хроматограмма, реконструированная по выделенным ионам характерного для внутреннего стандарта MRM-перехода (282,16→210,09855)

На основе собранных данных были построены диаграммы, графически иллюстрирующие кинетику выведения аддуктов с мочой.

Диаграмма на рисунке 24 иллюстрирует кинетику выведения N7-НЕТЕГ с мочой.

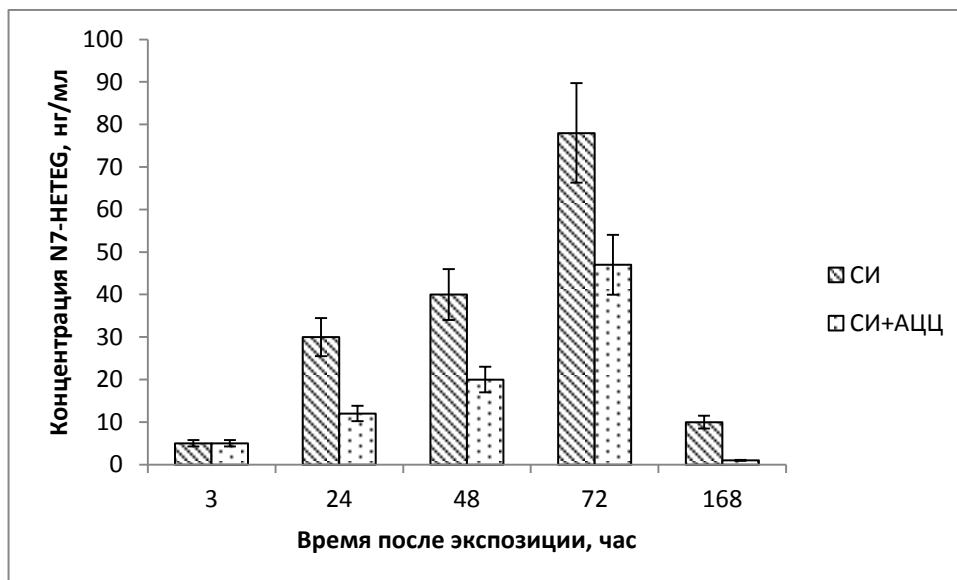


Рисунок 24 - График выведения N7-НЕТЕГ с мочой без введения скавенджера и с лечением АЦЦ

Как следует из диаграммы, в пробах мочи крыс, получавших терапию АЦЦ, содержание аддукта N7-НЕТЕГ значительно ниже, что свидетельствует о защитном действии скавенджера, препятствующем повреждению ДНК.

Диаграмма на рисунке 25 иллюстрирует кинетику выведения аддукта СИ-АЦЦ с мочой.

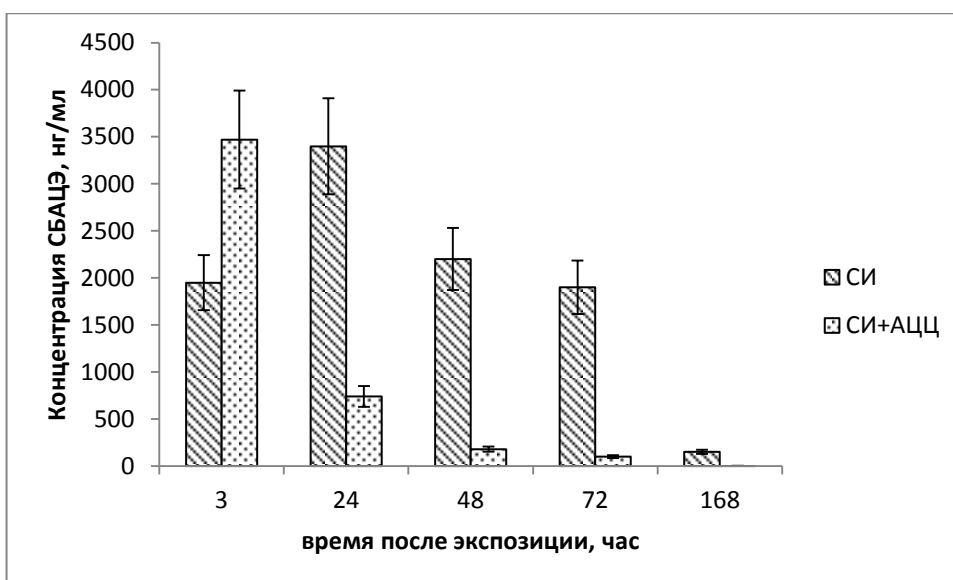


Рисунок 25 - Профиль экскреции СБАЦЭ с мочой без введения скавенджера и с лечением АЦЦ

Из рисунка видно, что при использовании скавенджера выведение аддукта происходит более активно в быстрой фазе элиминации, период его выведения у крыс, получавших лечение, значительно сокращен, по сравнению с особями, которым не вводили АЦЦ. Таким образом, разработанная методика позволила на молекулярном уровне продемонстрировать влияние скавенджера на скорость выведения токсиканта из организма и позволила сделать обоснованное предположение о защитном действии АЦЦ от поражающего действия сернистого иприта на ДНК.

3.5 Адаптация разработанной методики для определения аддуктов ДНК с другими цитостатиками на примере циклофосфида.

Потенциальное расширение границ действия методики на другие вещества алкилирующего действия представляет значительный интерес как с научной, так и с практической точки зрения. Возможность отслеживать профили выведения ДНК с другими цитостатиками может стать важным шагом в направлении развития персонафицированной медицины. Далеко не всегда существует и экономически обоснована возможность синтеза стандартного образца (либо меченого радиоактивной меткой образца) для каждого конкретного препарата. В

этом случае рассматривается метод безэталонной идентификации возможных аддуктов ДНК с интересующим ТХ алкилирующего действия. Возможность такой оценки степени повреждения ДНК продемонстрирована в ходе эксперимента, проведенного *in vivo*, в котором качестве модельного вещества был выбран циклофосфамид.

В отсутствие стандартных образцов аддуктов ДНК-ЦФА, исследование проводили исключительно в затравочном эксперименте *invivo*. С целью исследования влияния скавенджера (АЦЦ) на процесс элиминации из организма продуктов взаимодействия ЦФА и ДНК (G-NOR, G-NOR-OH, G-NOR-G) был поставлен эксперимент *in vivo* с двумя группами крыс, одна из которых получала внутривенно ЦФА в дозе 200 мг/кг, другая – ту же дозу ЦФА в сочетании с терапией АЦЦ. Раствор АЦЦ вводили двукратно за 3 ч и за 0,5 ч перед введением ЦФА в дозе 200 мг/кг. Предварительно у всех задействованных в эксперименте крыс были взяты образцы мочи (холостая проба). В опыте были использованы 10 крыс (5 крыс экспонированы ЦФА и 5 крыс – ЦФА и АЦЦ). Мочу крыс отбирали с использованием метаболических камер через 3 часа, 1, 2, 3, 7 сутки после экспозиции. Полученные пробы анализировали согласно разработанной для N7-НЕТЕГ методике. В качестве внутреннего стандарта использовали то же вещество, что и в опытах с N7-НЕТЕГ. Из литературных данных известны основные продукты взаимодействия ЦФА с ДНК, которые и явились объектом исследования. Масс-спектральные характеристики исследуемых соединений представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Характеристики определяемых аддуктов ДНК с ЦФА

Аналит	Продукт-ион*	Характ. MRM-переходы	Время удерживания, мин
G-NOR	152.05669;	257.097121→152.05669 257.097121→178.07234	3.7±0,1

G-NOR-OH	152.05669	239.12510→152.05669; 239.12510→221.011454 239.12510→178.07234	3.7±0,1
G-NOR-G	221.11454	372.16395→221.11454; 372.16395→178.07234	4.0±0,1
Cys-NOR-G	-	342.13428→191.08487; 342.13428→152.05669	-

*m/z для количественных определений

Подготовка проб мочи и условия анализа аналогичны применяемым для определения аддуктов сернистого иприта с ДНК.

На основе собранных данных были построены графики, иллюстрирующие кинетику выведения трех основных аддуктов ЦФА с ДНК. Установлено, что, как и ожидалось, количество G-NOR максимально в точке 3 часа и далее экспоненциально падает, выходя к точке 7 суток к значениям, близким к пределу обнаружения, в то время как содержание G-NOR-OH и G-NOR-G имеет максимум в точке 1 сутки. Введение крысам АЦЦ вызывает резкое (приблизительно в 2-3 раза) повышение содержания всех трех аддуктов в моче, при этом сроки выведения меняются незначительно а профиль экскреции имеет ту же форму. В ходе исследования ни в одной пробе мочи не был обнаружен описанный в литературе аддукт Cys-NOR-G.

На рисунке 26 представлены профили экскреции всех трех аддуктов ЦФА с ДНК, полученный в эксперименте без введения скавенджера. Аддукт G-NOR сразу после введения ЦФА начинает выделяться с мочой в максимальном количестве, максимум экскреции G-NOR-OH регистрируется через сутки, а G-NOR-G – через двое суток.

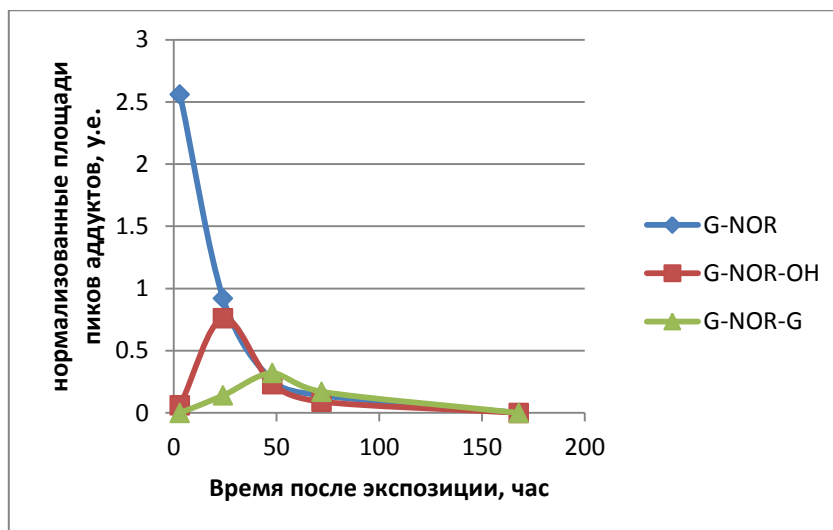
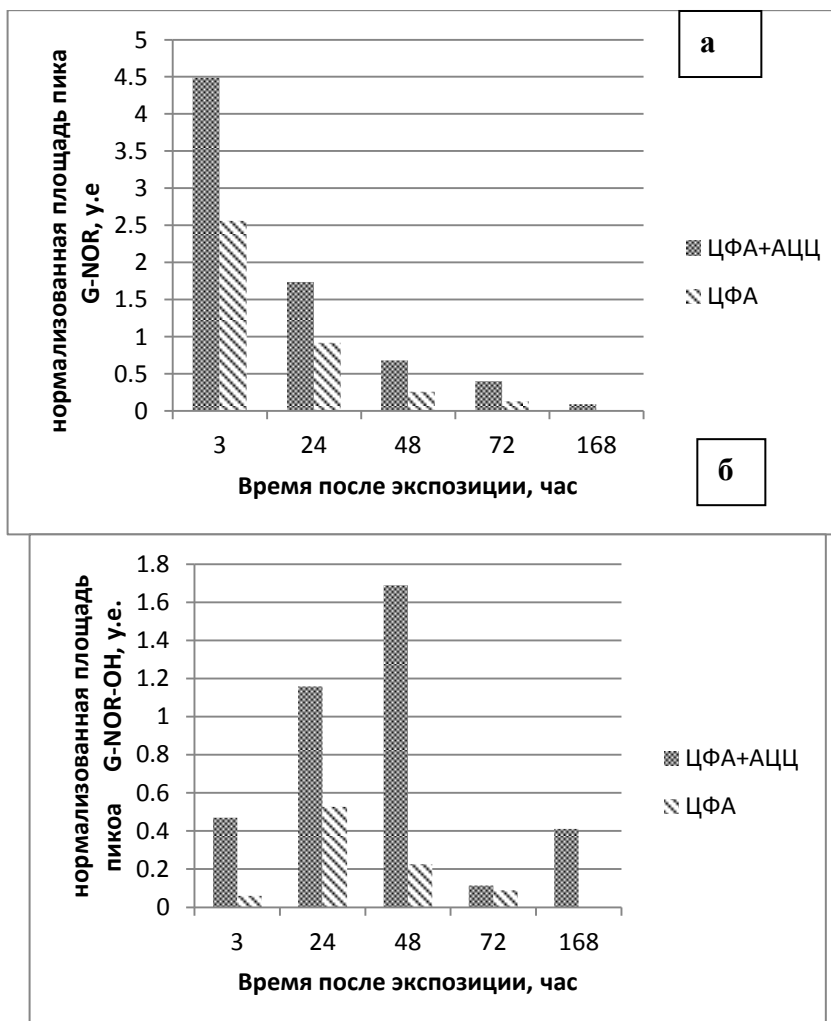


Рисунок 26 – Профили экскреции аддуктов ЦФА

На рисунке 27 представлены диаграммы, иллюстрирующие изменение кинетики выведения аддуктов ЦФА с ДНК в присутствии скавенджера.



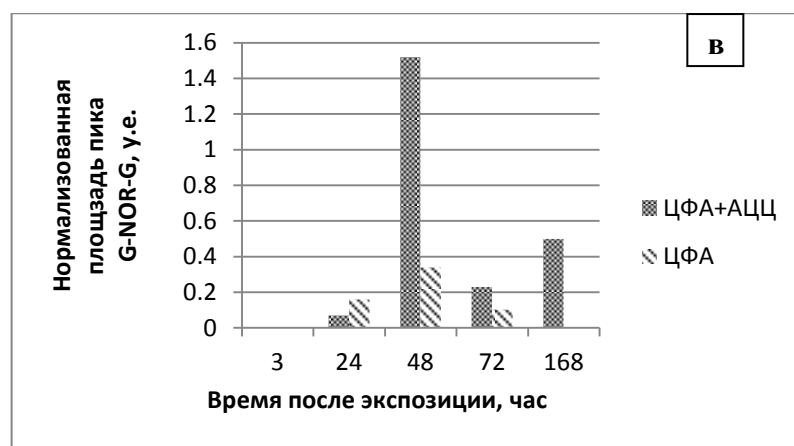


Рисунок 27- Гистограммы, демонстрирующие выведение аддуктов ЦФА с ДНК: (а) G-NOR, (б) G-NOR-OH, (в) G-NOR-G

Полученные данные свидетельствуют о том, что при выбранной схеме применения (режим введения, дозы) АЦЦ не оказывает протективного действия в отношении ЦФА, а напротив – усиливает его повреждающее воздействие на ДНК. Негативный эффект может быть обусловлен тем известным обстоятельством, что АЦЦ способствует повышению биодоступности ЦФА, увеличивая его абсорбцию из системного кровотока в ткани. Важно отметить, что эффект, установленный на молекулярном уровне, подтверждается результатами токсикологического эксперимента. Животные, получавшие ЦФА в сочетании с АЦЦ, погибли, а получавшие только ЦФА – преимущественно выжили. Полученный биологический эффект относится к данному дизайну исследования и не может быть распространен на общие выводы о наличии или отсутствии протективного действия АЦЦ в отношении ЦФА. С позиций биоаналитики важно отметить, что даже в отсутствие аналитических стандартов определяемых биомаркеров их соотношение позволяет характеризовать молекулярные процессы в биологических системах[149].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная работа сосредоточена на исследовании таких перспективных биомаркеров воздействия генотоксичных ТХ на организм, как аддукты с ДНК. В качестве модельного соединения был выбран сернистый иприт, вещество с доказанной генотоксичностью. В рамках исследования были разработаны

методики количественного определения основного продукта взаимодействия иприта с ДНК – ковалентного аддукта N7-НЕТЕГ – в моче и крови и синтезирован аналитический стандарт N7-НЕТЕГ. После очистки от примесей методом препаративной хроматографии, были оценены хроматографические и масс-спектрометрические параметры синтезированного вещества. Установлено, что оптимальной биоматрицей для определения аддуктов цитостатиков с ДНК является моча, поскольку с мочой аддукты выделяются в депуринизированном виде. Разработанная методика определения N7-НЕТЕГ в моче включает в себя ТФЭ на патронах Oasis HLB, упаривание экстракта досуха и последующий анализ перерастворенного остатка методом ВЭЖХ-МС/МС высокого разрешения. Методика характеризуется достаточно низким пределом обнаружения (5 нг/мл). Введение нормировки по внутреннему стандарту позволило скорректировать ошибку методики (коэффициент ковариации) до величины 15%, что, несмотря на достаточно низкий коэффициент извлечения, характерный для биоаналитических методик, обеспечивает приемлемые метрологические характеристики. При работе с мочой крыс отмечено значительное влияние матричных эффектов, поскольку коэлюирующееся с патрона эндогенное соединение, характеризующееся m/z 256,08, вызывает подавление аналитического сигнала. В связи с этим, идентификацию аналита проводили по продукт-иону (m/z 105,0369). Полученные градуировочные характеристики отвечают требованиям, предъявляемым к количественному анализу.

Разработанная методика определения N7-НЕТЕГ в цельной крови включает выделение ДНК из лейкоцитов крови с помощью коммерческих наборов (Экстран 1), гидролиз ДНК муравьиной кислотой при нагревании и анализ экстракта методом ВЭЖХ-МС/МС. В опытах *in vitro* при обработке цельной крови сернистым ипритом в различных концентрациях (0,01 0,05, 0,1, 1,0 и 10 мкг/мл) удалось установить, что предложенная методика позволяет обнаружить аддукт иприта с ДНК в пробе лишь при экспонировании крови достаточно высокими концентрациями иприта (от 1 мкг/мл). При этом на масс-хроматограммах во всех случаях присутствует массивный пик гуанина, свидетельствующий о

произошедшем распаде ДНК. Таким образом, можно предположить, что доля связанного с ДНК иприта настолько незначительна, что в рамках данной методики использовать в качестве биоматрицы кровь представляется неэффективным.

Разработанная методика была апробирована при исследовании кинетики выведения аддукта иприта с ДНК с мочой лабораторных животных (крыс), получавших подкожно раствор иприта с концентрацией 2 мг/кг, что составляет $\frac{1}{4}$ LD50. Мочу собирали через 1сут., 2сут., 3 сут., 7 сут., 14 сут. и 21 сут. после введения иприта и анализировали согласно разработанной методике. В результате построена кривая элиминации, согласно которой максимум выведения приходится на 3 сутки и составляет 170 нг/мл, а затем количество аддукта постепенно снижается, к 14 суткам достигая значения 5 нг/мл.

Применение скавенджеров влияет на концентрации и формы существования аналитов, определяемых в биопробах, что необходимо учитывать при разработке биоаналитических методик. Важным аспектом является изучение степени и характера химических взаимодействий между алкилирующим агентом, протектором (скавенджером) и внутренними системами организма. В качестве одного из наиболее эффективных и безопасных скавенджеров в настоящее время рассматривается ацетилцистеин (АЦЦ). В то же время, одним из основных мочевых метаболитов иприта является его аддукт с АЦЦ - СБАЦЭ. Естественно предположить, что терапия АЦЦ будет влиять на образование и кинетику выведения ковалентных аддуктов иприта. В связи с вышеизложенным, разработанная ранее методика определения N7-НЕТЕГ в моче была модифицирована таким образом, чтобы обеспечить синхронный мониторинг выведения аддуктов иприта с ДНК и АЦЦ, существенно различающихся по физико-химическим свойствам. Согласно литературным данным, аддукт иприта с АЦЦ не поддается концентрированию и очистке методом ТФЭ в режиме удерживания. В настоящей работе удалось при использовании картриджей ENVI-8 (3 мл, 500 мг), кондиционированных последовательным пропусканием 2x1 мл ацетонитрила и 3x1 мл воды удалось обеспечить концентрирование обоих

аналитов в режиме удерживания в случае исключения стадии промывки и элюирования аналитов двумя порциями по 1 мл 60 % ацетонитрила в 5 % муравьиной кислоте. Итоговая методика характеризуется ошибкой 15 %. Также оценены степени извлечения аналитов, построены градуировочные графики.

Для подтверждения рабочих качеств методики и оценки влияния введения скавенджера на кинетику выведения аддуктов иприта, был поставлен эксперимент *in vivo* с двумя группами животных; одной группе внутривентриально вводили раствор сернистого иприта в дозировке 2 мг/кг, а другой группе – ту же дозу иприта, но в сочетании с терапией АЦЦ. Сбор мочи осуществляли с использованием метаболических камер через 3 часа, 1, 2, 3, 7 сутки после экспозиции. Полученные пробы анализировали согласно разработанной методике. Мочу каждой крысы анализировали отдельно. Полученный результат усредняли. На основе собранных данных были построены диаграммы, графически иллюстрирующие кинетику выведения аддуктов с мочой. Анализируя полученные данные, можно сделать вывод, что в пробах мочи крыс, получавших терапию АЦЦ, содержание аддукта N7-НЕТЕГ значительно ниже, что свидетельствует о защитном действии скавенджера, препятствующем повреждению ДНК. При использовании скавенджера выведение иприта из организма в форме СБАЦЭ происходит более активно в быстрой фазе элиминации (в первые сутки после экспозиции), период его выведения у крыс, получавших лечение, значительно сокращен, по сравнению с особями, которым не вводили АЦЦ. Таким образом, разработанная методика позволила на молекулярном уровне продемонстрировать влияние скавенджера на скорость выведения токсиканта из организма и сделать обоснованное предположение о защитном действии АЦЦ от повреждений ДНК.

Адаптация разработанных подходов для определения аддуктов цитостатиков медицинского применения была проведена на примере вещества циклофосфамид –противоракового препарата, до сих пор широко применяемого в современной медицине. В ряде публикаций сообщалось о снижении кардио- и нефротоксичности ЦФА при терапии АЦЦ для крыс. При литературном поиске

обнаружить аналитических данных о влиянии применения АЦЦ на количественный выход ДНК-аддуктов циклофосамида не удалось. Эта актуальная информация была получена в эксперименте *in vivo*, схема которого была аналогична эксперименту с сернистым ипритом и АЦЦ за тем лишь исключением, что дозировка ЦФА составляла 200 мкг/кг. Выбор столь высокой дозы был обусловлен значительно меньшей токсичностью ЦФА по сравнению с ипритом. Высокая доза ЦФА обеспечивала возможность идентификации широкого спектра аддуктов ЦФА с ДНК в отсутствие образцов сравнения. С использованием предложенной аналитической схемы, включающей выделение/концентрирование аддуктов из мочи ТФЭ в режиме удерживания и БЭЖХ-МС/МС анализ, удалось определить все три описанных в литературе аддукта ЦФА с ДНК. Были установлены кривые их выведения, характер которых не противоречит цитогенетическим данным. Полученные аналитические данные совпадают с токсикологическими и свидетельствуют о том, что при выбранной схеме применения (режим введения, дозы) АЦЦ не оказал протективного действия в отношении ЦФА, а напротив – усилил его повреждающее воздействие на ДНК, что было продемонстрировано на молекулярном уровне: количество экскретируемых аддуктов с ДНК при введении АЦЦ в разы превышало значения, полученные в группе, где терапия АЦЦ не применялась. Этот эффект может быть обусловлен тем известным обстоятельством, что АЦЦ способствует повышению биодоступности ЦФА, увеличивая его абсорбцию из системного кровотока в ткани и из цитозоля в клетки. Если так, что применение АЦЦ может быть использовано для снижения эффективной дозы химиотерапевтических препаратов. Предложенная аналитическая схема позволяет оценивать эффективность защитных мер от повреждения ДНК путем сопоставления профилей экскреции аддуктов цитостатиков с ДНК без использования аналитических стандартов этих соединений, что крайне важно для практики, поскольку синтезировать образцы сравнения для аддуктов всех цитостатиков с ДНК в обозримом будущем не представляется возможным.

ВЫВОДЫ

1. Разработана методика совместного ВЭЖХ-МС-МС определения аддуктов сернистого иприта с ДНК и белками на примере N7-НЕТЕГ и СБАЦЭ в моче лабораторных животных, позволяющая проводить определение аналитов на уровне от 5 нг/мл при относительной ошибке определения не более 15 %, идентифицировать биомаркеры воздействия сернистого иприта и оценить повреждения организма.
2. Обоснован выбор в качестве стандартного образца N7 - (2-гидроксиэтилтиоэтил)-2'-гуанина - N7-НЕТЕГ при определении аддуктов сернистого иприта с ДНК и белками, описана методика его синтеза, очистки от примесей и выделения целевого вещества, установлены его хроматографические и масс-спектрометрические характеристики (время удерживания аналита, его молекулярный ион-предшественник и продукт-ион). Установлена стабильность выявленного биомаркера при изучении кинетики экскреции N7-НЕТЕГ и СБАЦЭ *in vivo*.
3. Разработаны методики определения N7-НЕТЕГ в моче и крови методом ВЭЖХ-МС/МС. Установлено, что кровь может использоваться в качестве матрицы для определения аддуктов сернистого иприта с ДНК только при воздействии высоких доз. Моча, в которой аддукты цитостатиков с ДНК присутствуют в депуринизированном виде, является оптимальной матрицей для анализа и проведения биомониторинга.
4. Показана возможность определения аддуктов ДНК с лекарственными препаратами алкилирующего действия на примере ЦФА. Определены основные продукты взаимодействия ЦФА с ДНК, получены их масс-спектральные характеристики. Предложенная аналитическая схема анализа позволила в доклиническом эксперименте изучить кинетику выведения аддуктов ЦФА с ДНК в условиях терапии АЦЦ и в отсутствие терапии.
5. Показана возможность применения разработанных методик для изучения профилей экскреции аддуктов сернистого иприта с ДНК и АЦЦ и определения аддуктов ДНК с лекарственными препаратами, обладающими алкилирующим

действием. Методики обеспечивают возможность персонифицированного подхода к терапии и детоксикации. Установлена возможность адаптации разработанного подхода для аналитического мониторинга повреждающего воздействия других цитостатиков (на примере циклофосфида) на ДНК.

Автор выражает благодарность к.б.н. Каракашеву Георгию Васильевичу за ценные консультации и помощь и всем сотрудникам лаборатории аналитической токсикологии ФГУП «НИИ ГПЭЧ» за сотрудничество и поддержку.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1 Balbo S., Turesky R.J., Villalta P.W. DNA Adductomics. // Chem. Res. Toxicol. - 2014. – V. 27. – P. 356–366

2 Patti G. J., Yanes O., Siuzdak G. Innovation:Metabolomics: The apogee of the omics trilogy. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2012. – V. 13. – P. 263–269.

3 Орлова О.И., Савельева Е.И., Радилов А.С. и др. Применение биомониторинга для оценки характера и тяжести воздействия химического фактора // Медицина труда и промышленная экология, 2010, № 12, С. 28-33

4 Электронный ресурс <http://base.safework.ru/iloenc?doc&nd=857400331&nh=0&ssect=0> от 14.02.2018

5 ГК СОС № 155: Биомаркеры и оценка риска: концепции и принципы / «Медицина» Женева, 1996. - 96 с.

6 Guidance for the Interpretation of Biomonitoring Data, ECETOC Document No 44, 2005.

7 Human Biomonitoring for Environmental Chemicals, National Research Council of the National Academies, USA. The National Academies Press, USA, 2006.

8 Farmer P.B., Singh R. Use of DNA adducts to identify human health risk from exposure to hazardous environmental pollutants: The increasing role of mass spectrometry in assessing biologically effective doses of genotoxic carcinogens. // Mutation Research. - 2008. – V. 659. – P. 68–76

9 Электронный ресурс <https://base.safework.ru/iloenc?doc&nd=857400331&nh=0&ssect=1> от 14.02.2018

10 Esmans E.L., Broes D., Hoes I., Lemièrè F., Vanhoutte K. Liquid chromatography–mass spectrometry in nucleoside, nucleotide and modified nucleotide characterization. // J. Chromatogr. A. – 1998. – V. 794. – P. 109–127.

11 Balbo S., Turesky R.J., Villalta P. W. DNA Adductomics. // Chem. Res. Toxicol. – 2014. – V. 27. – P. 356–366.

12 Sram R.J., Farmer, Singh R., Garte S., Kalina I., Popov T.A., Binkova B et al. Effect of vitamin levels on biomarkers of exposure and oxidative damage – the EXPAN study. // *Mutat.Res.* – 2009. – V. 672. – P. 129–134.

13 Yao C., Feng Y.-L. A nontargeted screening method for covalent DNA adducts and DNA modification selectivity using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. // *Talanta.* – 2016. – V. 159. – P. 93–102.

14 Савельева Е.И., Орлова О.И., Каракашев Г.В., Радилов А.С. Определение аддуктов ксенобиотиков с ДНК как биомаркеров генотоксического эффекта при воздействии на организм алкилирующих агентов// Материалы XXXIII межведомственной военно-научной конференции «Совершенствование системы радиационной, химической и биологической защиты войск и населения страны в мирное и военное время. Москва 31.10.17 – 01.11.17, С.60-61

15 Кос Н.; Swenberg J. Applications of mass spectrometry for quantitation of DNA adducts. A. // *J. Chromatogr. B* – 2002. – V. 778. – P. 323-343.

16 LaD.K., Swenberg J.A. DNA adducts: biological markers of exposure and potential applications to risk assessment. // *Mutat.Res.* – 1996. – V. 365. – P. 129–146.

17 Swenberg J.A., Lu K., Moeller B.C., Gao L., Upton P.B. et al. Endogenous versus exogenous DNA adducts: their role in carcinogenesis, epidemiology, and risk assessment. // *Toxicol.Sci.* – 2011. – P. 120. – P. S130–S145.

18 W.M.Baird, L.A.Hooven, B.Mahadevan. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. // *Environ.Mol.Mutagen.* – 2005. – V. 45.- P. 106–114.

19 Cavalieri E., Frenkel K., Liehr J.G., Rogan E., Roy D. Estrogens as endogenous genotoxic agents--DNA adducts and mutations. // *Monographs.* 2000. – V. 27. – P. 75–93.

20 Hecht S.S. Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines. // *Chem.Res.Toxicol.* – 1998. – V. 11. – P. 559–603.

21 Hecht S.S. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. // *Nat.Rev.Cancer.* – 2003. – V. 3. – P. 733–744.

22 Blair I.A. DNA adducts with lipid peroxidation products. // *J.Biol.Chem.* – 2008. V. 283 – P. 15545–15549.

23 Turesky R.J., Vouros P. Formation and analysis of heterocyclic aromatic amine-DNA adducts in vitro and in vivo. // *J.Chromatogr.B* - 2004. – V. 802. - P.155–166.

24 Arlt V.M. 3-Nitrobenzanthrone, a potential human cancer hazard in diesel exhaust and urban air pollution: a review of the evidence. // *Mutagenesis.* – 2005. – V. 20. – P. 399–410.

25 Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. // *Clin. Pharmacol.Ther.*- 2001. – V. 69. – P. 89-95.

26 Swenberg J.A., Fryar-Tita E., Jeong Y.-C., Boysen G. et al. Biomarkers in Toxicology and Risk Assessment: Informing Critical Dose–Response Relationships. // *Chem. Res. Toxicol.* – 2008. – V. 21. - No. 1 – P. 253-265.

27 Schoeny R. S., Chu M. M., Cimino M. C., Dearfield K. L. et al. Framework for Determining a Mutagenic Mode of Action for Carcinogenicity: Using EPA's 2005 Cancer Guidelines and Supplemental Guidance for Assessing Susceptibility from Early-Life Exposure to Carcinogens, U.S. Environmental Protection Agency, 2007, Washington, DC.

28 U.S. Environmental Protection Agency (2005) Guidelines for Carcinogen Risk Assessment, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.

29 Smela M. E., Hamm M. L., Henderson P. T., Harris C. M., Harris T. M., Essigmann, J. M. The aflatoxin B(1) formamidopyrimidine adduct plays a major role in causing the types of mutations observed in human hepatocellular carcinoma. // *Proc. Natl.Acad. Sci. U.S.A.* – 2002. – V. 99. – P. 6655–6660.

30 Roebuck B. D., Liu Y. L., Rogers A. E., Groopman J. D., Kensler T. W. Protection against aflatoxin B1-induced hepatocarcinogenesis in F344 rats by 5-(2-pyrazinyl)-4-methyl-1,2-dithiole-3-thione (oltipraz): Predictive role for short-term molecular dosimetry. // *Cancer Res.* – 1991. – V. 51. – P. 5501–5506.

31 Perera F. P.; Weinstein I. B. Molecular epidemiology: recent advances and future directions. // *Carcinogenesis*. – 2000. – V. 21. – P. 517-524.

32 Rundle A. Carcinogen-DNA adducts as a biomarker for cancer risk. // *Mutat. Res.* – 2006. – V. 600. – P. 23-36.

33 Kleihues P., Margison G. P. Carcinogenicity of N-methyl-N-nitrosourea: Possible role of excision repair of O6-methylguanine from DNA. // *J. Natl. Cancer Inst.* – 1974. – V. 53. – P. 1839–1841.

34 Kleihues P., Bucheler J. Long-term persistence of O6-methylguanine in rat brain DNA. // *Nature*. – 1977. – V. 269. – P. 625–626.

35 Farmer P. B., Sweetman G. M. A. Mass Spectrometric Detection of Carcinogen Adducts // *J. Of Mass Spectrometry*. – 1995. – V. 30. – P. 1369–1379

36 Орлова О.И., Савельева Е.И., Каракашев Г.В., Алюшина Т.И., Хлебникова Н.С., Радиллов А.С. Современные хроматомасс-спектрометрические технологии определения биомаркеров высокотоксичных органических соединений в биопробах. IV Международная конференция «Актуальные научные и научно-технические проблемы обеспечения химической безопасности» 16-17 октября 2018 г

37 Lieselot Y. Hemeryck¹, Sharon A. Moore², and Lynn Vanhaecke. Mass spectrometric mapping of the DNA adductome as a means to study genotoxin exposure, metabolism and effect // *Anal Chem.* – 2016. – V. 88. – No 15. – P. 7436-46.

38 Himmelstein M. W., Boogaard P. J.; Cadet J.; Farmer P. B. Creating context for the use of DNA adduct data in cancer risk assessment: II. Overview of methods of identification and quantitation of DNA damage. // *Crit. Rev. Toxicol.* – 2009. – V. 39. – P. 679-694.

39 Singh R., Farmer P. B. Liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry: the future of DNA adduct detection // *Carcinogenesis* – 2006. – V. 27. – P. 178-196.

40 Tretyakova N. Villalta P. W., Kotapati, S. Mass spectrometry of structurally modified DNA. // *Chem. Rev.* – 2013. – V. 113. – P. 2395-2436.

41 Dettmer K., Aronov P. A., Hammock B. D. Mass spectrometry-based metabolomics // *Mass Spectrom. Rev.* – 2007. – V. 26. – P. 51-78.

42 Орлова О.И., Савельева Е.И., Хлебникова Н.С. Методы обнаружения метаболитов сернистого иприта в объектах биологического происхождения. Аналитический обзор // *Журнал аналитической химии.* - 2013. - Т. 68. - № 1. - С.4-14

43 Электронный ресурс
http://vmede.org/sait/?page=11&id=Voennaja_i_jekstremalnaja_medicina_u4ebnik_kutsenko&menu=Voennaja_i_jekstremalnaja_medicina_u4ebnik_kutsenko от 24.05.2018

44 Kehe K., Balszuweit F., Steinritz D., Thiermann H. Review. Molecular toxicology of sulfur mustard-induced cutaneous inflammation and blistering. // *Toxicology.* – 2009. – V. 263. – P. 12–19.

45 Phillips D.H. Detection of DNA modifications by the ³²P-postlabelling assay. // *Mutat. Res.* – 1997. – V. 378. – P. 1–12.

46 Niu T.Q., Matijasevic Z., Austin-Ritchie P., Sterling A., Ludlum D.B. A ³²P-postlabeling method for the detection of adducts in the DNA of human fibroblasts exposed to sulfur mustard // *Chem-Biol. Interact.* - 1996. - V.100. - P. 77-84.

47 M.C. Poirier Human exposure monitoring, dosimetry, and cancer risk assessment: the use of antisera specific for carcinogen-DNA adducts and carcinogen modified DNA. // *Drug Metab. Rev.* – 1994. – V. 26. – P. 87–109.

48 Santella R.M. Immunological methods for detection of carcinogen-DNA damage in humans. // *Cancer Epidem. Biom. Prev.* – 1999. – V. 8. – P. 733–739

49 van der Schans G.P., Mars-Groenendijk R., de Jong L.P.A., Benschop H.P., Noort D. Standard operating procedure for immunoslot blot assay for analysis of DNA/sulfur mustard adducts in human blood and skin. // *J. Anal. Toxicol.* - 2004. - V. 28. – P. 316 - 323.

50 Benschop H.P., van der Schans G. P., Noort D., Fiddler A., Mars-Groenendijk R.H., et al. Verification of Exposure to Sulfur Mustard in Two Casualties of the Iran-Iraq Conflict. // *J. of Analytical Toxicology.* – 1997. – V. 21. – P. 249-251.

-
- 51GodschalkR.W.L., VermeerI.T.M., KriekE., FlootB., SchildermanP.A.E.L. Comparison of ³²P-postlabelling and HPLC–FD analysis of DNA adducts in rats acutely exposed to benzo[a]pyrene. // *Chem. Biol. Inter.* – 1997. – V. 104. – P. 41–54.
- 52RojasM., AlexandrovK., van SchootenF.J., HillebrandM., KriekE. Validation of a new fluorometric assay for benzo[a]pyrene diolepoxide-DNA adducts in human white blood cells: comparisons with ³²P-postlabeling and ELISA. // *Carcinogenesis.* – 1994. – V. 15. – P. 557–560.
- 53SotomayorR.E., WashingtonM., NguyenL., Nyang’anyiR., HintonD.M. et al. Effects of intermittent exposure to aflatoxin B1 on DNA and RNA adduct formation in rat liver: dose response and temporal patterns. // *Toxicol. Sci.* – 2003. – V. 73. – P. 329–338.
- 54ManchesterD.K., WestonA., ChoiJ.-S., TriversG.E., FennesseyP.V., QuintanaE. et al. Detection of benzo[a]pyrene diol-epoxide-DNA adducts in human placenta. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1988. – V. 85. – P. 9234–9247.
- 55CarrilhoE., Formenton-CataiA.P., LancasF.M., PereiraD.M. dGMP-BPDE DNA adduct investigation in environmentally exposed rural workers by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. // *J. Brazilian Chem. Soc.* – 2005. – V. 16. – P. 220–226.
- 56SchmitzO.J., WorthC.C., StachD., WiesslerM. Capillary electrophoresis analysis of DNA adducts as biomarkers for carcinogenesis. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2002. – V. 41. – P. 445–448.
- 57JangH.G., ParkM., WishnokJ.S., TannenbaumS.R., Wogan G.N. Hydroxyl-specific fluorescence labeling of ABP-deoxyguanosine, PhIP-deoxyguanosine, and AFB1-formamidopyrimidine with BODIPY-FL. // *Anal. Biochem.* – 2006. – V. 359. – P. 151–160.
- 58LudlumD.B., Austin-RitchieP., HagopianM., NiuT.-Q., Yu D. Detection of sulfur mustard-induced DNA modifications. // *Chem-Bio Interact.* – 1994. – V. 91 – P. 39-49

59Fidder A., Moes G.W., Scheffer A.G., van der Schans G.P. et al. Synthesis, Characterization, and Quantitation of the Major Adducts Formed between Sulfur Mustard and DNA of Calf Thymus and Human Blood.// *Chem. Res. Toxicol.* – 1994. – V. 7. – P. 199-204

60Singh R., Farmer P. B. Liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry: the future of DNA adduct detection.//*Carcinogenesis.* - 2006. - V. 27. - P. 178-196.

61 Wei Y., Yue L., Liu Q., Chen J., Xie J. A sensitive high performance liquid chromatography-positive electrospray tandem mass spectrometry method for N7-[2-[(2-hydroxyethyl)thio]-ethyl]guanine determination.//*J. Chromatogr. B.* –2011. - V. 879. - P. 1707-1712.

62Marie-Desvergne C., Maître A., Bouchard M., Ravanat J. L., Viau C. Evaluation of DNA adducts, DNA and RNA oxidative lesions, and 3-hydroxybenzo(a)pyrene as biomarkers of DNA damage in lung following intravenous injection of the parent compound in rats.//*Chem. Res. Toxicol.* - 2010.-V. 23. - P. 1207-1214.

63Malayappan B., Johnson L., Nie B., Panchal D., Matter B. et al. Quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis of bis-N7-guanine DNA-DNA cross-links in white blood cells of cancer patients receiving cyclophosphamide therapy.//*Anal. Chem.* - 2010.- V. 82. - P. 3650-3658.

64 Goggin M., Loeber R., Park S., Walker V., Wickliffe J., Tretyakova N. HPLC-ESI+-MS/MS analysis of N7-guanine-N7-guanine DNA cross-links in tissues of mice exposed to 1,3-butadiene.//*Chem. Res. Toxicol.* - 2007. - V. 20. - P.839-847.

65 Batal M., Boudry I., Cléry-Barraud C., Mouret S., Douki T. Relative yields of monomeric and dimeric adducts induced by sulphur mustard in isolated and cellular DNA as determined by HPLC/tandem mass spectrometry.//*Toxicol. Environ. Chem.* - 2013.- V. 95. - P. 260-276.

66 Batal M., Boudry I., Mouret S., Wartelle J., Emorine S., Bertoni M. Temporal and spatial features of the formation of DNA adducts in sulfur mustard-exposed skin // *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2013. – V. 273. – P. 644–650.

67 Yue L., Wei Y., Chen J., Shi H. et al. Abundance of four sulfur mustard-DNA adducts ex vivo and in vivo revealed by simultaneous quantification in stable isotope dilution-ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. // *Chem. Res. Toxicol.* - 2014. - V. 27. - P. 490-500.

68 Kehe K., Balszuweit F., Steinritz D., Thiermann H. Molecular toxicology of sulfur mustard-induced cutaneous inflammation and blistering // *Toxicology*. - 2009. - V. 263. - P. 12-19.

69 Wang P., Zhang Y., Chen J., Guo L. et al. Analysis of Different Fates of DNA Adducts in Adipocytes Post-sulfur Mustard Exposure in Vitro and in Vivo Using a Simultaneous UPLCMS/MS Quantification Method // *Chem. Res. Toxicol.* - 2015. - V. 28. - P. 1224-1231.

70 Kehe K., Raithel K., Kreppel H., Jochum M., Worek F., Thiermann H. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) influences the mode of sulfur mustard (SM)-induced cell death in HaCaT cells. // *Arch. Toxicol.* - 2008. - V. 82. - P. 461-470.

71 Lawley P. D., Brookes P. Further studies on the alkylation of nucleic acids and their constituent nucleotides. // *Biochemical Journal*. - 1963. - V. 89. - P. 127-138.

72 Zhang Y., Nie Z., Chen J., Guo L., Wu B. et al. Simultaneous determination of four sulfur mustard-DNA adducts in rabbit urine after dermal exposure by isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. // *J. of Chromatogr. B.* – 2014. – V. 961. – P. 29-35.

73 Fidler A., Noort D., de Jong L.P.A., Benschop H.P., Hulst A.G. N7-(2-hydroxyethylthioethyl)-guanine: a novel urinary metabolite following exposure to sulphur mustard. // *Arch. Toxicol.* - 1996. - V. 70. - P. 854-855.

74 Xu H., Nie Z., Zhanga Y., Li C. et al. Four sulfur mustard exposure cases: Overall analysis of four types of biomarkers in clinical samples provides positive

implication for early diagnosis and treatment monitoring.// Toxicology Reports. - 2014. - V. 1. - P. 533-543.

75 Nie Z., Zhang Y., Chen J., Lin Y., Wu B. et al. Monitoring urinary metabolites resulting from sulfur mustard exposure in rabbits, using highly sensitive isotope-dilution gas chromatography–mass spectrometry // Anal. Bioanal. Chem. - 2014. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-014-7916-3>.

76 Сетевой ресурс http://www.biochemistry.ru/biohimija_severina/B5873Part33-212.html

77 Орлова О.И., Савельева Е.И., Каракашев Г.В. Методы определения аддуктов сернистого иприта с ДНК. // Журнал аналитической химии. - 2017. - Т 72. - № 3. - С. 209-217.

78 Тимошенко К.А. Исследование процесса гидролиза ДНК. // Успехи в химии и химической технологии. 2010. - Т. XXIV. - № 11. - С. 66-71.

79 Hemminki K. DNA-binding products of nornitrogen mustard, a metabolite of cyclophosphamide. Chem.// Biol. Interact. – 1987. – V. 61. – P. 75–788.

80 Johnson L.A., Malayappan B., Tretyakova N., Campbell C., MacMillan M.L. et al. Formation of Cyclophosphamide Specific DNA Adducts in Hematological Diseases. // Pediatr Blood Cancer. – 2012. – V. 58 – No 5. – P. 708–714.

81 Cushnir J.R., Naylor S., Lamb J.H., Farmer P.B., Brown N.A., Mirkes P.E. Identification of phosphoramidate mustard/DNA adducts using tandem mass spectrometry. // Rapid Commun. Mass Spectrom. – 1990. – V. 4. – P. 410–414.

82 Malayappan B., Johnson L.A., Nie B., Panchal D., Matter B., Jacobson P., Tretyakova, N. Quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis of bis-N7-guanine DNA–DNA cross-links in white blood cells of cancer patients receiving cyclophosphamide therapy. // Anal. Chem. – 2010. – V. 82. – P. 3650–3658.

83 Электронный ресурс <https://meduniver.com/Medical/farmacologia/159.html>
от 10.05.2019

84 Hemminki K. Binding of metabolites of cyclophosphamide to DNA in a rat liver microsomal system and in vivo in mice. // *Cancer Res.* – 1985. – V. 45. – P. 4237–4243

85 Souliotis V. L.; Dimopoulos M. A.; Sfikakis P.P. Gene-specific formation and repair of DNA monoadducts and interstrand cross-links after therapeutic exposure to nitrogen mustards. // *Clin. Cancer Res.* – 2003. – V. 9. – P. 4465–4474.

86 Little S.A., Mirkes P.E. DNA cross-linking and single-strand breaks induced by teratogenic concentrations of 4-hydroperoxycyclophosphamide and phosphoramidate mustard in postimplantation rat embryos. // *Cancer Res.* – 1987. – V. 47. – P. 5421–5426.

87 Thulin H.; Zorcec V.; Segerback D.; Sundwall A.; Tornqvist M. Oxazolidonyl ethyl adducts to hemoglobin and DNA following nitrogen mustard exposure. // *Chem. Biol. Interact.* – 1996. – V. 99. – P. 263–275.

88 DeNeve W.; Valeriote F.; Edelstein M.; Everett C.; Bischoff M. In vivo DNA cross-linking by cyclophosphamide: comparison of human chronic lymphatic leukemia cells with mouse L1210 leukemia and normal bone marrow cells. // *Cancer Res.* – 1989. – V. 49. – P. 3452–3456.

89 Ganesan S., Keating A.F. Phosphoramidate mustard exposure induces DNA adduct formation and the DNA damage repair response in rat ovarian granulosa cells. // *Toxicol Appl Pharmacol.* – 2015. – V. 282. – No 3. – P. 252–258.

90 Benson A. J.; Martin C. N.; Garner R. C. N-(2-hydroxyethyl)-N-[2-(7-guaninyl)ethyl]amine, the putative major DNA adduct of cyclophosphamide in vitro and in vivo in the rat. // *Biochem. Pharmacol.* – 1988. – V. 37. – P. 2979–2985.

91 Dirven H., Megens L., Oudshoorn M.J., Dingemans B. Glutathione conjugation of the cytostatic drug ifosfamide and the role of human glutathione S-transferases. // *Chem. Res. Toxicol.* – 1995. – V. 8. – P. 979–986.

92 Chung F.C., Krzeminski J., Wang M., Procopczyk B. Formation of the acrolein-derived 1,N²-propanodeoxyguanosine adducts in DNA upon reaction with 3-

(N-carbethoxy-N-nitrosamino)propionaldehyde. // Chem. Res. Toxicol. – 1994. – V. 7. –P.62-67.

93 Maccubbin A.E., Caballes L., Riordan J.M. Huang D.N. et al. A cyclophosphamide/DNA phosphoester adduct formed in vitro and in vivo. Cancer research. – 1991. – V. 51. –P. 886-892.

94 Marinelli E.R., Johnson F., Iden C.R., Yu P.L. Synthesis of 1,N²-(1,3-propano)-2'-deoxyguanosine and incorporation into oligodeoxynucleotides: a model for exocyclic acrolein-DNA adducts. // Chem. Res. Toxicol. – 1990. – V. 3. –P. 49-58.

95 Mirkes P.E., Brown N.A., Kajbaf J.H., Lamb P.B. Identification of cyclophosphamide-DNA adducts in rat embryos exposed in vitro to 4-hydroperoxycyclophosphamide. // Chem. Res. Toxicol. – 1992. – V. 5. –P.382-385.

96 Fenselau C., Smith P.B.W. High-performance tandem mass spectrometry in metabolism studies. // Xenobiotica. – 1992. – V.22. – P. 1207-1219

97 Yuan Z.-M., Smith P.B., Brundrett R.B., Colvin C. Glutathione conjugation with phosphoramidate mustard and cyclophosphamide. A mechanistic study using tandem mass spectrometry. Drug Metab. Dispos. – 1991. – V.19. – P.625-629

98 Hoffman C., Bastian H., Wiedenmann M., Deininger C. Detection of acrolein congener-DNA adducts isolated from cellular systems. // Arch. Toxicol. Suppl. 1989. – V.13. – P.219-223.

99 Van den Driessche B.; Lemiere F.; Witters E.; Van Dongen W.; Esmans E. L. Implications of enzymatic, acidic and thermal hydrolysis of DNA on the occurrence of cross-linked melphalan DNA adducts. // Rapid Commun. Mass Spectrom. – 2005. – V. 19. – P. 449–454.

100 Baskerville-Abraham I. M.; Boysen G.; Troutman J. M.; Mutlu E. et al. Development of an ultraperformance liquid chromatography/mass spectrometry method to quantify cisplatin 1,2 intrastrand guanine-guanine adducts. // Chem. Res. Toxicol. – 2009. – V. 22. – P. 905–912.

101 Goggin M.; Anderson C.; Park S.; Swenberg J.; Walker V.; Tretyakova N. Quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem

mass spectrometry analysis of the adenine-guanine cross-links of 1,2,3,4-diepoxybutane in tissues of butadiene-exposed B6C3F1 mice. // *Chem. Res. Toxicol.* 2008, 21, 1163–1170.

102 Goggin M.; Swenberg J. A.; Walker V. E.; Tretyakova N. Molecular dosimetry of 1,2,3,4-diepoxybutane-induced DNA-DNA cross-links in B6C3F1 mice and F344 rats exposed to 1,3-butadiene by inhalation. // *Cancer Res.* – 2009. – V. 69. – P. 2479–2486.

103 Groehler A.S., Villalta P.W., Campbell C., Tretyakova N.Y. Covalent DNA-Protein Cross-linking by Phosphoramidate Mustard and Nitrogen Mustard in Human Cells // *Chem. Res. Toxicol.* – 2016. – V 29. – No 2 – P. 190-202.

104 Goncalves J.F., Fiorenza A.M., Spanevello R.M., Mazzanti C.M. et al. N-Acetylcysteine prevents memory deficits, the decrease in acetylcholinesterase activity and oxidative stress in rats exposed to cadmium. // *Chem. Biol. Int.* – 2010. – V. 186. – P. 53–60.

105 De Flora S., Izzotti A., D'Agostini F., Balansky R. Mechanisms of N-acetylcysteine in the prevention of DNA damage and cancer, with special reference to smoking-related end-points. // *Carcinogenesis.* – 2001. – V. 22. – No 7. – P. 999-1013

106 Meister A., Metabolism and function of glutathione. In Dolphin D., Poulson R., Avramovis O. (eds.) *Glutathione: Chemical, Biochemical and Medical aspects.* John Wiley, New York, 1989, P. 367-374

107 De Flora S., Balansky R., Bennicelly C., Camoirano A., D'Agostini F., Izzotti A. Mechanisms of anticarcinogenesis: The example of N-acetylcysteine. In Ioannides S., Lewis D.F.V. (eds.) *Drugs, Diet and Disease, V.1. Mechanistic approaches to cancer.* Ellis Horwood, Hemel Hempstead, U.K., 1995. P. 151-203

108 John H., Balszuweit F., Kehe K., Worek F., Thiermann H. Toxicokinetic aspects of nerve agents and vesicants. *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents, 2nd Edn.* (Ed: R. Gupta). Academic Press/Elsevier, Amsterdam 2015, 817.

109 Dacre J., Goldman M. Toxicology and pharmacology of the chemical warfare agent sulfur mustard. // *Pharmacol. Rev.* – 1996. – V. 48. – P. 289-295.

110 Georgia J.P., Dianne C., Michael B., Sally L., Eric W., Brian H., Colin J.H., Roland C.W. Role of hepatic cytochrome P450s in the pharmacokinetics and toxicity of cyclophosphamide: Studies with the hepatic cytochrome P450 reductase Null mouse. // *Cancer Res.* – 2005. – V. 65. – P. 4211–4217.

111 Cho K.H., Hyun J.H., Chang Y.S., Na Y.G. et al. Expression of nitric oxide synthase and aquaporin-3 in cyclophosphamide treated rat bladder. // *Int. Neurourol. J.* – 2010. – V. 14. – P. 149–156.

112 Oter S., Korkmaz A., Oztas E., Yildirim I., Topal T., Bilgic H. Inducible nitric oxide synthase inhibition in cyclophosphamide induced hemorrhagic cystitis in rats. // *Urol. Res.* – 2004. – V. 32. – P. 185–189.

113 Singh M., Kumar N., Shuaib M., Garg V.K., Sharma A. A review on renal protective agents for cyclophosphamide induced nephrotoxicity. // *World J. Pharm. Pharm. Sci.* – 2014. – V. 3 – No 3. – P. 737–747.

114 Nishikawa T., Miyahara E., Kurauchi K., Watanabe E., et al. Mechanisms of Fatal Cardiotoxicity following High-Dose Cyclophosphamide Therapy and a Method for Its Prevention. // *PLoS One.* – 2015. – V. 10. – No 6. – P. e0131394.

115 Baumann F., Preiss R. Cyclophosphamide and related anticancer drugs. // *J. Chromatogr. B* – 2001. – V. 764. – P. 173–192.

116 Kurauchi K., Nishikawa T., Miyahara E., Okamoto Y., Kawano Y. Role of metabolites of cyclophosphamide in cardiotoxicity. // *BMC Res Notes* – 2017. – V. 10. – P. 406-416.

117 Mukhopadhyay P., Rajesh M., Bátkai S., Kashiwaya Y., Haskó G. et al. Role of superoxide, nitric oxide and peroxynitrite in doxorubicin-induced cell death in vivo and in vitro. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2009. – V. 296. - No 5. – P. H1466–H1483.

118 Brookes P., Lawley P. D. Reaction of Mustard Gas With Nucleic Acids in vitro and in vivo. // *Biochemical Journal.* - 1960. – V. 77. – P. 478-484.

119 Brookes P., Lawley P. D. Effects of Alkylating Agents on T2 and T4 Bacteriophages. // *Biochemical Journal.* – 1963. – V. 89. - P. 138-144.

120 Lawley P. D., Brookes P. Further Studies on Alkylation of Nucleic Acids and Their Constituent Nucleotides. // *Biochemical Journal*. – 1963. – V. 89. – P. 127-138.

121 Zhang Y., Nie Z., Chen J., Guo L., Wu B. et al. Simultaneous determination of four sulfur mustard-DNA adducts in rabbit urine after dermal exposure by isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. // *J. of Chromatogr. B*. – 2014. – V. 961. – P. 29-35.

122 Fidler A., Noort D., de Jong L.P.A., Benschop H.P., Hulst A.G. N7-(2-hydroxyethylthioethyl)-guanine: a novel urinary metabolite following exposure to sulphur mustard. // *Arch Toxicol*. – 1996. – V. 70. – P. 854-855.

123 Boysen G., Pachkowski B. F., Nakamura J., Swenberg J. A. The formation and biological significance of N7-guanine adducts // *Mutat. Res*. 2009. - V. 678. - P. 76-94.

124 Fidler A., Moes G.W.H., Schaffer A.G., van der Schans G.P. et al. Synthesis, Characterization, and Quantitation of the Major Adducts Formed between Sulfur Mustard and DNA of Calf Thymus and Human Blood. // *Chem. Res. Toxicol*. – 1994. – V. 7. – P. 199-204.

125 Rao M., Bhadury P.S., Sharma M., Dangi R.S., Bhaskar A. et al. A facile methodology for the synthesis and detection of N7-guanine adduct of sulfur mustard as a biomarker. // *Can. J. Chem*. – 2002. – V. 80. – P. 504–509.

126 Yue L., Wei Y., Chen J., Shi H., Liu Q. et al. Abundance of Four Sulfur Mustard-DNA Adducts ex Vivo and in Vivo Revealed by Simultaneous Quantification in Stable Isotope Dilution–Ultrahigh Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. // *Chem. Res. Toxicol*. – 2014. – V. 27. – P. 490–500.

127 Rao M.K., Sharma M., Raza S.K., Jaiswal D. K. Synthesis, Characterization and Mass Spectrometric Analysis of Cysteine and Valine Adducts of Sulphur Mustard. // *Phosphorus, Sulfur and Silicon*. 2003. – V. 178. – P. 559–566.

128 Орлова О.И., Каракашев Г.В., Шмурак В.И., Абзианидзе В.В., Савельева Е.И. Определение N7-[2-[(2-гидроксиэтил)-тио]-этил]-гуанина в моче

крыс как маркера воздействия сернистого иприта // Вестник СПбГУ. Физикаихимия. – 2017. - Т. 4 (62). - Вып. 3. - С. 313-325.

129 Орлова О.И., Каракашев Г.В., Савельева Е.И., Радилов А.С. Определение аддукта сернистого иприта с ДНК в моче и крови крыс методом тандемной жидкостной хроматомасс-спектрометрии // Материалы VII Всероссийской конференции с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» 09–13 октября 2017 года, г. Москва, С. 130.

130 Orlova O.I., Savelieva E.I., Karakashev G.V., Shmurak V.I., Orlova T. I., Khlebnikova N. S., Radilov A.S. New in vivo Data on the Excretion Kinetics of a DNA Adduct of Sulfur Mustard // Abstract Book “International workshop on analysis of chemical warfare agents to mark the 20th anniversary of the CWC”. 11 -13 December. 2017. P. 71.

131 Орлова О.И., Каракашев Г.В., Савельева Е.И., Радилов А.С. Определение аддукта сернистого иприта с ДНК в моче и крови крыс методом тандемной жидкостной хроматомасс-спектрометрии. Сборник трудов VII Всероссийской конференции с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» 09-13 октября 2017 г., Москва, С.130.

132 Yuxia W., Lijuna Y., Qin L., Jia C., Jianwei X. A sensitive high performance liquid chromatography–positive electrospray tandem mass spectrometry method for N7-[2-[(2-hydroxyethyl)thio]-ethyl]guanine determination. // J of Chromatogr B. – 2011. – V. 879. – P. 1707–1712.

133 Thiermann H., Worek F., Kehe K. Limitations and challenges in treatment of acute chemical warfare agent poisoning. // Chem-Bio Interact. – 2013. – V. 206. – P. 435–443.

134 Steinritz D., Schmidt A., Simons T. Ibrahim M., Morguet C., Balszuweit F., Thiermann H., Kehe K. Chlorambucil (nitrogen mustard) induced impairment of early vascular endothelial cell migration - effects of α -linolenic acid and N-acetylcysteine. // Chem-Bio Interact. – 2014. – V. 219. – P. 143-150.

135 Balszuweit F., John H., Schmidt A., Kehe K., Thiermann H., Steinritz D. Silibinin as a potential therapeutic for sulfur mustard injuries. // *Chem Biol Interact.* – 2013. – V. 206. – No 3. – P. 496-504.

136 Kehe K., Balszuweit F., Emmler J., Kreppel H., M. Jochum, Thiermann H. Sulfur mustard research-strategies for the development of improved medical therapy. // *Eplasty.* – 2008. – V. 8. – P. e32-39.

137 Орлова О.И., Савельева Е.И., Каракашев Г.В., Вивуланец Е.В. Исследование защитного действия N-ацетилцистеина при поражениях сернистым ипритом с учётом результатов биомониторинга // *Медицина экстремальных ситуаций*, 2019; Т. 21(1), С. 145-154.

138 Савельева Е.И., Корягина Н.Л., Орлова О.И. Определение аддуктов отравляющих веществ с биомолекулами как биомаркеров экспозиции/эффекта // *Медицина экстремальных ситуаций*, 2018. Т. 20, № 3, С. 451-463

139 Black R.M., Jakubowski R.W. Biological fate of sulphur mustard, 1,1'-thiobis(2-chloroethane): identification of beta-lyase metabolites and hydrolysis products in human urine. // *Xenobiotica.* – 1995. – V. 25. - P.167-173.

140 Read R. W., Black R. M. Analysis of the sulfur mustard metabolite 1,1'-sulfonylbis[2-S-(N-acetylcysteinyl)ethane] in urine by negative ion electrospray liquid chromatography- tandem mass spectrometry. // *J. Anal. Toxicol.* – 2004. – V.28. – P. P.352-356.

141 Rodin I., Braun A., Savelieva E. et al. Rapid method for the detection of metabolite of sulfur mustard 1,1-sulfonylbis[2-S-(N-acetylcysteinyl)ethane] in plasma and urine by liquid chromatography–negative electrospray-tandem mass spectrometry // *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies.* – 2011. – V.34. – No. 16. – P. 1676–1685.

142 Siegert M., Kranawetvogl A., Thiermann H., John H. N-Acetylcysteine as a chemical scavenger for sulfur mustard: New insights by mass spectrometry. // *Drug Test Anal.* - 2018. – V. 10. – No 2. – P. 243-253.

143Shohrati M., Karimzadeh I., Saburi A., Khalili H. The role of N-acetylcysteine in the management of acute and chronic pulmonary complications of sulfur mustard: a literature review.// Inhal Toxicol. – 2014. – V. 26. – No 9. – P. 507-523.

144Mansour H.H., Shereen M. El Kiki, Hasan H.F. Protective effect of N-acetylcysteine on cyclophosphamide-induced cardiotoxicity in rats.// Health Environmental Toxicology and Pharmacology. – 2015. – V. 40. – P. 417-425.

145Experimental and Clinical Progress in Cancer Chemotherapy.ed. Muggia F.M. New York University Medical Center, New York, USA. 1985.

146Kurauchi K., Nishikawa T., Miyahara E., Okamoto Y., Kawano Y. Role of metabolites of cyclophosphamide in cardiotoxicity.// BMCResNotes. - 2017. - V. 10.. – No 1. - P. 406-412.

147 Родин И. А. Дис. доктора хим. наук. Москва: московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 2016. 277 с.

148 Орлова О.И., Савельева Е.И., Каракашев Г.В., Алюшина Т.И., Хлебникова Н.С., Радиллов А.С. Совместное определение аддукта СИ с ДНК и ацетилцистеином методом ВЭЖХ-МС/МС высокого разрешения // III Всероссийская Конференция по аналитической спектроскопии с международным участием, Краснодар. 29 сентября -5 октября 2019 С.55

149 Орлова О.И., Савельева Е.И., Каракашев Г.В. Определение аддуктов циклофосфамида с ДНК в моче крыс методом ВЭЖХ-МС/МС высокого разрешения // Юбилейная V Междисциплинарная конференция «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии»15-18 сентября 2019 Судак, Крым, Россия. С.197