

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГИГИЕНЫ,
ПРОПАТОЛОГИИ И ЭКОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА
ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА
(ФГУП "НИИ ГПЭЧ" ФМБА РОССИИ)

На правах рукописи

УКОЛОВ Антон Игоревич

ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКАЯ МЕТОДОЛОГИЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
БИОМАРКЕРОВ ВРЕДНЫХ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ ПРИ РАССЛЕДОВАНИИ
ОБСТОЯТЕЛЬСТВ ОСТРЫХ И ХРОНИЧЕСКИХ ОТРАВЛЕНИЙ

02.00.02 – Аналитическая химия

Диссертация на соискание учёной степени

доктора химических наук

Научный консультант:
доктор медицинских наук, профессор
Радилов Андрей Станиславович

Краснодар,

2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

Определения и сокращения	5
Введение	8
1. Литературный обзор	16
1.1.1. Биомаркеры экспозиции	20
1.1.2. Биомаркеры эффекта	22
1.2. Хроматомасс-спектрометрические методы обнаружения и идентификации биомаркеров экспозиции	24
1.3. Хроматомасс-спектрометрические методы обнаружения и идентификации биомаркеров эффекта	28
1.3.1. Использование метаболического профилирования в токсикологии	33
1.3.2. Инструментальные методы метаболического профилирования	42
1.3.3. Математическая обработка результатов метаболического профилирования	49
2. Экспериментальная часть	57
2.1. Расширенный токсиколого-аналитический скрининг	57
2.1.1. Подготовка образцов крови для расширенного токсиколого-аналитического скрининга	59
2.1.2. Подготовка образцов мочи для расширенного токсиколого-аналитического скрининга	60
2.1.3. Дериватизация и ГХ-МС анализ экстрактов из крови и мочи	61
2.1.4. Анализ паровой фазы над образцами крови и мочи	63
2.1.5. Обработка результатов скрининга	64
2.1.6. Подтверждающий ГХ-МС/МС анализ	65
2.1.7. Подтверждающий ВЭЖХ-МС/МС анализ	66
2.2. Определение метаболитов алифатических углеводов C_6-C_{10} в плазме крови методом ГХ-МС и ВЭЖХ-МС	66
2.3. Определение метаболитов алифатических углеводов C_1-C_5 в плазме крови методом ГХ-МС	68
2.4. Подготовка и анализ образцов плазмы крови и мочи для нецелевого метаболического профилирования	69
2.4.1. Нецелевое метаболическое профилирование методом ГХ-МС	69
2.4.2. Нецелевое метаболическое профилирование методом ВЭЖХ-МС	70
2.4.3. Математическая обработка результатов профилирования	70
2.5. Методы экспериментального моделирования интоксикаций органическими соединениями	71
2.5.1. Фосфорорганические отравляющие соединения	71
2.5.2. Фосфорорганические пестициды	71

2.5.3. Летучие промышленные загрязнители	72
2.5.4. Смесь нормальных алифатических углеводородов C ₆ -C ₁₀	73
2.5.5. Гидроксиламин.....	74
2.5.6. Смесь нормальных алифатических углеводородов C ₁ -C ₅	74
2.5.7. 1,4-дихлоргексафторбутен-2 (хладон RL316).....	75
2.6. Определение гидроксиламина и его метаболитов в плазме крови и моче методом газовой хроматомасс-спектрометрии.....	75
2.7. Определение ДХГФ и его метаболитов в плазме крови и моче.....	77
2.8. Установление структур позиционных изомеров алкилфенолов	78
2.9. Определение дихлофоса, диметоата, хлорпирифоса, фозалона, диазинона и метилпаратиона в крови и моче методом ГХ-МС/МС	78
2.10. Определение смеси летучих органических соединений в крови и моче методом ГХ-МС	80
3. Результаты и их обсуждение	81
3.1. Расширенный токсиколого-аналитический скрининг биологических образцов.....	83
3.1.1. Выявление и систематизация неэтанольных маркеров алкогольной интоксикации	87
3.1.2. Идентификация органических соединений в пробах крови и мочи пациентов	91
3.1.3. Идентификация органических соединений в пробах крови и мочи пациента "А"	92
3.1.4. Идентификация органических соединений в пробах крови и мочи пациента "Б"	93
3.1.5. Апробация метода идентификации органических соединений в межлабораторном тесте.....	98
3.2. Обнаружение и идентификация биомаркеров экспозиции органическими соединениями	101
3.2.1. Обнаружение и идентификация биомаркеров экспозиции ФОП методом газовой хроматографии с тандемным масс-селективным детектированием	101
3.2.2. Обнаружение и идентификация биомаркеров экспозиции смесью алифатических углеводородов C ₆ -C ₁₀	106
3.2.3. Обнаружение и идентификация биомаркеров экспозиции смесью алифатических углеводородов C ₁ -C ₅	110
3.2.4. Обнаружение и идентификация биомаркеров экспозиции гидроксиламином	113
3.2.5. Обнаружение и идентификация биомаркеров экспозиции ДХГФ	117
3.3. Разработка высокочувствительных методик количественного определения биомаркеров экспозиции органическими соединениями и вычисление токсикокинетических параметров ...	124
3.3.1. Разработка хроматомасс-спектрометрической методики определения фосфорорганических соединений в моче и крови.....	126
3.3.2. Разработка методики определения летучих органических соединений в моче и крови ...	131
3.3.3. Определение токсикокинетических параметров ЛПЗ и ФОП.....	136

3.3.4. Экстраполяция токсикокинетических параметров летучих промышленных загрязнителей и фосфорорганических пестицидов	144
3.3.5. Разработка методики определения гидроксилamina в моче и крови	151
3.3.6. Разработка методики определения ДХГФ в моче и крови	156
3.4. Разработка метода установления структур позиционных изомеров алкилфенолов	158
3.5. Совершенствование методики нецелевого метаболического профилирования биологических образцов с использованием газовой хроматомасс-спектрометрии низкого разрешения	162
3.5.1. Создание оптимизированных баз данных	167
3.5.2. Идентификация и отнесение пиков.....	168
3.5.3. Количественный анализ	172
3.5.4. Обоснование размеров экспериментальных групп при нецелевом метаболическом профилировании	185
3.6. Обнаружение и идентификация биомаркеров эффекта органических соединений.....	187
3.6.1. Изменения профилей жирных кислот плазмы крови при интоксикации фосфоорганическими отравляющими соединениями	187
3.6.2. Изменения метаболических профилей головного мозга и печени крыс при хронической интоксикации алифатическими углеводородами C ₆ -C ₁₀	188
3.6.3. Обнаружение и идентификация биомаркеров эффекта смеси алифатических углеводородов C ₆ -C ₁₀	197
3.6.4. Обнаружение и идентификация биомаркеров эффекта смеси алифатических углеводородов C ₁ -C ₅	206
3.6.5. Обнаружение и идентификация биомаркеров эффекта гидроксилamina	208
3.6.6. Обнаружение и идентификация биомаркеров эффекта ДХГФ	211
Заключение	212
Выводы и результаты	216
Список использованных источников	218

ОПРЕДЕЛЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

Биоаналитический мониторинг — оценка экспозиции человека ксенобиотиками, присутствующими в окружающей среде, на основе измерения концентраций химических веществ и их метаболитов в крови, моче, слюне или тканях.

Биомаркер экспозиции — экзогенное вещество или его метаболит, либо продукт взаимодействия между ксенобиотиком и какой-либо молекулой-мишенью или клеткой-мишенью, определяемый в том или ином отделе организма.

Биомаркер эффекта — измеримое биохимическое, физиологическое, поведенческое или другое изменение в организме, которое можно считать связанным с заведомо известным или возможным нарушением здоровья или заболеванием.

Биомаркер чувствительности — индикатор присущей организму или приобретенной им способности реагировать на воздействие определенного вещества-ксенобиотика.

Метаболомика, метаболическое профилирование — исследование набора небольших молекул с массой менее 1 кДа в биологических жидкостях, тканях, органах или организме.

Расширенный токсиколого-аналитический скрининг — аналитическая стратегия, предназначенная для детектирования и идентификации ксенобиотиков в биологических жидкостях, что необходимо для подтверждения диагноза при острых отравлениях экзогенными соединениями.

Экспозиция — контакт между агентом, содержащимся в окружающей среде, и доступной поверхностью организма (кожей, глазами, дыхательными путями, пищеварительным трактом).

AChE — фермент ацетилхолинэстераза.

AMDIS — (англ. Automated mass-spectral deconvolution and identification system) система автоматической масс-спектрометрической идентификации и деконволюции

ANOVA — однофакторный дисперсионный анализ.

GB — зарин.

GD — зоман.

DL₅₀ — среднесмертельная доза.

Lim_{ac} — порог однократного действия.

Lim_{ch} — порог хронического действия.

LOAEL — минимальный уровень концентраций (доз), вызывающий вредные эффекты.

MRM — см. MMP.

NOAEL — уровень концентраций (доз), не вызывающий видимых вредных эффектов.

NOEL — уровень концентраций (доз), не вызывающий видимых эффектов.

PCA — анализ главных компонент.

PLS-DA — дискриминантный анализ с помощью проекций на латентные структуры.

RVX — отравляющее вещество типа VX.

SIM — мониторинг избранных ионов.

SPME — твердофазная микроэкстракция.

БД — база данных.

БСТФА — *бис*-(триметилсилил)трифторацетамид.

ВЭЖХ-МС — высокоэффективная жидкостная хроматомасс-спектрометрия.

ВЭЖХ-МС/МС — высокоэффективная жидкостная хроматография с tandemным масс-селективным детектированием.

ГА — гидроксилламин, NH_2OH .

ГК — главная компонента.

ГС — градуировочная смесь.

ГХ-МС — газовая хроматомасс-спектрометрия.

ГХ-МС/МС — газовая хроматография с tandemным масс-селективным детектированием.

ДАФ — диалкилфосфаты.

ДИС — диссоциация, индуцированная соударениями.

ДХГФ — 1,4-дихлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутен-2, хладон RL316.

ЖК — жирные кислоты.

ИК — инфракрасная спектроскопия.

ИУ — газохроматографический индекс удерживания.

ИЭ — ионизация электронами.

КЭ — капиллярный электрофорез.

ЛПЗ — летучие промышленные загрязнители.

ЛФХ — лизофосфатидилхолины.

ЛФЭ — лизофосфатидилэтаноламины.

ММР — мониторинг множественных реакций.

МНД — максимальная недействующая доза.

МНК — максимальная недействующая концентрация.

МР — методические рекомендации.

МБТФА — *N*-метил-*бис*-трифторацетамид.

МСТФА — *N*-метил-*N*-триметилсилилтрифторацетамид.

МТБСТФА — *N*-(*трет*-бутилдиметилсилил)-*N*-метилтрифторацетамид.

ПАУ — полиароматические углеводороды.

ПДК — предельно допустимая концентрация.

ПИД — пламенно-ионизационный детектор.

ПМР — спектроскопия ядерного магнитного резонанса на ядрах ^1H .

ПНЖК — полиненасыщенные жирные кислоты.

ПО — программное обеспечение.
СЖК — свободные жирные кислоты.
СМ — сфингомиелины.
ТБДМС — *трет*-бутилдиметилсилил.
ТГ — триглицериды.
ТФА — трифторацетил.
ТФАИ — 1-(трифторацетил)имидазол.
ТФМЭ — см. SPME.
УВ — алифатические углеводороды.
ФА — фторацетаты.
ФИ — фосфатидилинозитолы.
ФОП — фосфорорганические пестициды.
ФОС — фосфорорганические соединения.
ФЭ — фосфатидилэтаноламины.
ХИ — химическая ионизация.
ХТА — химико-токсикологический анализ.
ХТИ — химико-токсикологические исследования.
ХТЛ — химико-токсикологическая лаборатория.
Цер — керамиды.
ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота.
ЭЖК — этерифицированные жирные кислоты.
ЯМР — спектроскопия ядерного магнитного резонанса.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Расследования обстоятельств острых и хронических отравлений, проводимые в химико-токсикологических лабораториях, ограничиваются обнаружением и идентификацией ксенобиотиков в биологических образцах ("биомаркеров экспозиции"). При этом обнаружение высоких концентраций ксенобиотиков в биосредах, как правило, не представляет методических трудностей, в то время, как их низкие концентрации сложно определять при использовании классических подходов к физико-химическому анализу. Важно также отметить, что промышленные токсиканты, способные вызывать острые и хронические отравления, в большинстве своем остаются вне поля зрения классического химико-токсикологического анализа. Все это определяет необходимость разработки новых высокочувствительных методик оценки экспозиции человека к потенциально опасным химическим веществам, присутствующим в окружающей среде, основанных на измерениях концентраций не только самих ксенобиотиков, но и их метаболитов в крови, моче, слюне или тканях [1]. Ключевым этапом разработки и внедрения в практику химико-токсикологических лабораторий таких методик является выявление и внедрение в практику химико-токсикологических лабораторий процедур определения новых биомаркеров, причем наиболее эффективная стратегия должна предполагать поиск как "биомаркеров экспозиции", так и эндогенных соединений, составляющих метаболические профили ("биомаркеров эффекта") [2].

Биомаркеры экспозиции, выявленные в ходе токсиколого-аналитического скрининга и определяемые в режиме высокочувствительного целевого анализа, позволяют подтверждать и оценивать экспозицию индивидов или популяций к определенным веществам, устанавливая связи между факторами внешней экспозиции и данными внутренней дозиметрии [3]. С помощью биомаркеров эффекта возможно фиксировать изменения в организме или неблагоприятные для здоровья эффекты, возникающие вследствие контакта с ксенобиотиками. Главной из объективных предпосылок к дополнению токсиколого-аналитического скрининга методами выявления биомаркеров эффекта является потребность в объективной информации о тяжести и последствиях воздействия химических факторов на организм.

В настоящее время известны подходы к хроматомасс-спектрометрическому обнаружению биомаркеров экспозиции к различным психоактивным веществам. В частности, А.М. Григорьевым подробно исследовано применение газохроматографических индексов удерживания (ИУ) для химико-токсикологического анализа, предложены способы коррекции ИУ при смене типа неподвижной фазы в капиллярных колонках [4]. Для дериватизации полярных аналитов предложено использовать различные дериватирующие агенты, а также анализ паровой фазы над образцами крови или мочи. С.А. Савчук подробно рассмотрел мешающие влияния, возникающие при

использовании автоматической деконволюции и идентификации для интерпретации результатов анализа биологических образцов методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием (ГХ-МС) [5]. Также им предложен подход к созданию системы лабораторий с однотипным ГХ-МС обеспечением, позволяющим транслировать масс-спектрометрические параметры из одной методики/лаборатории в другую. Методы определения следовых концентраций биомаркеров экспозиции к органическим соединениям рассмотрены в работах А.И. Ревельского [6]. Принципы использования методов экстракционного вымораживания в химико-токсикологическом анализе разработаны В.Н. Бехтеревым [7].

Усилия большинства исследователей направлены на разработку методов обнаружения биомаркеров экспозиции к психоактивным веществам, в то время как биомаркеры экспозиции к промышленным токсикантам и биомаркеры эффекта от их воздействия с позиций аналитической химии не были охарактеризованы.

Кроме того, на сегодняшний день в практике химико-токсикологических лабораторий отсутствуют процедуры биоаналитического мониторинга, основанные на новых подходах с использованием метаболического профилирования. Не разработаны подходы к определению различных типов биомаркеров методами хроматомасс-спектрометрии, а также не создана методическая платформа использования ГХ-МС низкого разрешения для метаболического профилирования образцов крови или мочи с целью установления механизмов действия токсичных соединений. Практически отсутствуют методики определения в биообразцах ряда перспективных для крупнотоннажного производства веществ, в частности, гидроксилamina (NH_2OH , далее - ГА), 1,4-дихлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутена-2 (хладон RL316, далее - ДХГФ), малоизученными являются также пути их биотрансформации.

Диссертационное исследование выполнялось в соответствии с планами государственных и отраслевых заказов при проведении научно-исследовательских работ в рамках ФЦП "Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации" и ФЦП "Уничтожение запасов химического оружия в Российской Федерации": "Биопроба-09", "Биопроба-10", "Биопроба-11", "Биопроба-12", "Углеводороды", "ГН-ДХГФ" и "Биотест".

Цели настоящей работы состояли в:

Разработке подходов к повышению надежности идентификации органических соединений и метаболического профилирования биологических образцов на основе хроматомасс-спектрометрических методов анализа, позволяющих определять пути биотрансформации ксенобиотиков и биоаналитического мониторинга при расследованиях обстоятельств острых и хронических отравлений.

Выявлении и разработки подходов к обнаружению биомаркеров вредных химических веществ в биологических объектах на уровне их нетоксических концентраций, базирующиеся на совместной интерпретации результатов определения ксенобиотиков и метаболического профилирования биологических образцов.

Для достижения поставленных целей было необходимо решить следующие задачи:

1. Обосновать и разработать методологию определения биомаркеров ксенобиотиков, включающую метод расширенного токсиколого-аналитического скрининга, методики определения экзогенных веществ и их метаболитов в биологических объектах, а также метаболического профилирования биологических образцов.

2. Развить методологию применения ГХ-МС низкого разрешения при анализе образцов крови, мочи и гомогенатов органов для изучения их метаболического профилирования.

3. Разработать методики определения биомаркеров летучих промышленных загрязнителей, фосфорорганических пестицидов, алифатических углеводородов, гидроксилamina и 1,4-дихлоргексафторбутена-2 в крови и моче, позволяющие установить пути биотрансформации и особенности механизма их действия.

4. Усовершенствовать метод расширенного скрининга биологических объектов для повышения надежности безэталонной идентификации при выявлении экзогенных веществ или их метаболитов.

5. Предложить подходы к уточнению структур позиционных изомеров алкилфенолов с использованием различных вариантов ГХ-МС.

6. Применить методологию хроматомасс-спектрометрического скрининга биообъектов для расширения объема сведений о токсикокинетических параметрах ксенобиотиков, обуславливающих требования к методикам определения биомаркеров ксенобиотиков в биообразцах.

7. Апробировать разработанные аналитические схемы при установлении путей биотрансформации и механизма действия алифатических углеводородов, гидроксилamina (ГА), 1,4-дихлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутен-2(ДХГФ) и *O*-изобутил-*S*-(2-диэтиламиноэтил)-метилтиофоната (RVX).

8. Оценить эффективность применения обнаруженных биомаркеров для оценки воздействия и дозы экспозиции вредных химических веществ, отражающих их содержание в окружающей среде.

В диссертационном исследовании в качестве биомаркеров эффекта рассмотрены изменения концентраций эндогенных низкомолекулярных соединений, свидетельствующие о метаболических сдвигах и наступающие под влиянием внешних факторов. Выявление этих признаков из всего многообразия биомаркеров эффекта обусловлено высоким индикативным потенциалом низкомолекулярных метаболитов и возможностью объединения стратегий определения биомаркеров экспозиции и эффекта на общей аналитической платформе хроматомасс-спектрометрии [8]. Внедрение в практику химико-токсикологических лабораторий новых методов выявления и определения биомаркеров позволит существенно дополнить результаты традиционных токсикологических исследований известных химических соединений и охарактеризовать соединения с

ранее неизученным токсическим действием и метаболизмом. Для расследования обстоятельств острых и хронических отравлений, методология анализа должна отвечать следующим условиям:

1. Обеспечить достаточно низкие пределы обнаружения для определения «нетоксических» концентраций химических веществ и для обнаружения их воздействия в концентрациях, отражающих их содержание в окружающей среде [9].

2. Обеспечить выявление и идентификацию неизвестных химических факторов с использованием процедур, охватывающих максимальное количество токсичных соединений и их биомаркеров [10].

В работе значительное внимание уделено апробации химико-аналитической методологии в токсикологических экспериментах, что позволило максимально приблизить методологию к требованиям практики в части формирования набора целевых аналитов и предъявления обоснованных требований к пределам их обнаружения в биообразцах. В качестве актуальных токсичных органических соединений для апробации предлагаемой методологии нами выбраны фосфорорганические соединения (ФОС) различных классов опасности, в том числе известные отравляющие вещества. Среди органических загрязнителей атмосферного воздуха нами рассмотрены продукты переработки нефти, в частности алифатические углеводороды (УВ). Концентрации и соотношения УВ в воздухе определены их реальными значениями в атмосферном воздухе вблизи нефтеперерабатывающих заводов, что согласуется с современными тенденциями в аналитической токсикологии, предполагающими исследование влияния концентраций токсикантов, релевантных их содержанию в окружающей среде. Перечень экотоксикантов включает в себя также неионогенные поверхностно-активные вещества класса алкилфенолов, которые характеризуются токсическим действием на эндокринные системы человека и животных. Нами рассмотрены различные высоколетучие экологические и промышленные летучие токсиканты, среди которых ранее не охарактеризованный 1,4-дихлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутен-2 (хладон RL316, ДХГФ), предназначенный для использования в качестве растворителя, теплоносителя, реагента при производстве перфторбутадиена. Другим малоизученным токсикантом является гидроксилламин.

Научная новизна

Предложен и обоснован метод расширенного токсиколого-аналитического скрининга с автоматической обработкой масс-хроматограмм, включающий твердофазную микроэкстракцию (ТФМЭ), а также экстракционное вымораживание с последующей дериватизацией целевых аналитов агентами - МСТФА, CH_3I , ТФА, МТБСТФА и As_2O для определения летучих соединений в паровой фазе.

Разработаны методики хроматомасс-спектрометрического определения в биологических образцах ДХГФ, фосфорорганических пестицидов (дихлофоса, диазинона, метилпаратиона, диметоата, фозалона и хлорпирифоса), летучих промышленных загрязнителей (*E*-1,4-дихлор-2-бутена, дисуль-

фида углерода, метакрилонитрила, пентахлорэтана, аллилхлорида, акрилонитрила, бутилхлорида, хлорацетонитрила, этилметакрилата, диэтилового эфира, метилакрилата, метилметакрилата, нитробензола, 2-нитропропана и гексахлорэтана), а также гидроксилamina.

Разработана методика определения гидроксилamina в плазме крови и моче с его двухстадийной дериватизацией бензальдегидом и БСТФА и использованием ГХ-МС с одним квадруполем в режиме мониторинга избранных ионов (на уровне 30 нг/мл) или ГХ-МС с системой трех квадруполей (на уровне 0.1 нг/мл) в режиме мониторинга множественных реакций.

Для повышения информативности результатов биоаналитического мониторинга впервые проведена оценка токсикокинетических характеристик *E*-1,4-дихлор-2-бутена, дисульфида углерода, метакрилонитрила, метилпаратиона, пентахлорэтана, аллилхлорида, акрилонитрила, бутилхлорида, хлорацетонитрила, этилметакрилата, метилакрилата, метилметакрилата, нитробензола, 2-нитропропана и гексахлорэтана.

В результате исследования характера фрагментации различных позиционных изомеров алкилфенолов при диссоциации, индуцированной соударениями, был найден новый способ определения положения алкильного заместителя в фенолах: протонированные молекулы *para*-замещенных алкилфенолов C₄-C₉ в отличие от других изомеров образуют характеристические ионы [M+H-H₂O]⁺.

С использованием разработанной методики определения свободных и этерифицированных жирных кислот выявлены механизмы действия RVX и низких концентраций алифатических углеводов на профили свободных и этерифицированных жирных кислот плазмы крови лабораторных животных, а также метаболические профили низкомолекулярных соединений головного мозга и печени крыс. Полученные данные химического анализа позволили выявить статистически значимое увеличение суммарных концентраций этерифицированных и свободных форм жирных кислот в плазме крови крыс через неделю после введения RVX, являющееся одной из причин развития гипергликемии, инсулинорезистентности и метаболического синдрома.

В результате ГХ-МС анализа паровой фазы и ВЭЖХ-МС высокого разрешения экстрактов плазмы крови и мочи выявлены и идентифицированы метаболиты ранее не изученного хладона RL 316 (1,4-дихлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутена-2). В образцах крови и мочи крыс обнаружены и идентифицированы два летучих метаболита, являющиеся продуктами восстановительного замещения атомов хлора: 1-хлор-1,1,2,3,3,4,4,4-октафторбутан и 1-хлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутен-2. Установлено основное направление метаболизма ДХГФ - образование аддуктов с глутатионом и их дальнейшая деградация до цистеиновых и ацетилцистеиновых аддуктов. Среди продуктов распада аддуктов также идентифицированы 4-метилсульфил-1-хлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутен-2, 4-метил-сульфинил-1-хлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутен-2 и 1,1,3,4,4-пентафтор-1,4-дихлор-бутантион-2 (наиболее информативный биомаркер).

При хромато-масс-спектрометрическом изучении продуктов взаимодействия гидроксилamina с альдегидами и кетонами установлен ранее не изученный путь его метаболизма с образованием оксимов. Выявлены и идентифицированы оксимы глицеральдегида, пировиноградной кислоты, *N*-формилглицина, глиоксалевого кислоты и нескольких моносахаридов. Показано, что гидроксилamin, несмотря на его высокую реакционную способность, сохраняется в кровотоке крыс, получавших дозу минимальную действующую дозу 22.6 мкг/кг.

Показана целесообразность создания оптимизированных библиотек хроматомасс-спектрометрических характеристик эндогенных соединений для повышения надежности метаболического профилирования биологических образцов. Критериями включения соединений в базы данных (по типам биологических образцов: плазма крови, моча, гомогенаты головного мозга и печени), составляющих метаболические профили, являлись отношение сигнал/шум хроматографических пиков, стабильность аналитов при хранении, воспроизводимость относительных площадей пиков в сериях анализов пулированного образца, а также внутри одной экспериментальной группы животных. В качестве внутренних стандартов мы предложили использовать смесь, состоящую из 3-фторбензойной, 4-диметиламиномасляной и пальмитиновой- d_{31} кислот. Обоснование размера групп экспериментальных животных для нецелевого метаболического профилирования биологических образцов выполнено впервые.

Распространение методов нецелевого метаболического профилирования на образцы внутренних органов и тканей лабораторных животных позволило обнаружить ранее неизвестные биомаркеры алифатических углеводов (УВ): лизофосфолипиды ЛФЭ(20:0)¹, ЛФХ(18:0), ЛФХ(18:1), ЛФХ(18:2) и ЛФХ(20:5) в плазме крови. Отношение концентраций ЛФХ(18:1) и ГФХ² в гомогенате тканей головного мозга увеличивается более чем в 500 раз по сравнению с контрольной группой, при этом в плазме крови выявлено статистически значимое увеличение данного отношения в 3.5 раза.

Теоретическая и практическая значимость работы

Методика расширенного токсиколого-аналитического скрининга внедрена в практику отдела токсикологии НИИ ГПЭЧ и апробирована в отделении токсикологии НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе. Разработанная "Стандартная процедура идентификации токсичных и сильнодействующих соединений в биологических пробах методами газовой и жидкостной хромато-масс-спектрометрии" включена в методические рекомендации "Процедура проведения количественного хромато-масс-спектрометрического анализа токсичных и сильнодействующих веществ в биологических объектах", утвержденные ФМБА (МР ФМБА России 4.1.23-2014).

¹ЛФЭ – лизофосфатидилэтанолamины, ЛФХ – лизофосфатидилхолины. В скобках указаны количество атомов углерода в ацильных остатках и количество двойных связей C=C;
²Глицерофосфохолин.

Результаты обнаружения и идентификации биомаркеров легли в основу обоснования предельно допустимых концентраций смесей алифатических углеводородов C₁-C₅ и C₆-C₁₀ (ГН 2.1.6.1338-03 с изм. от 30.08.16), ДХГФ (ГН 2.2.5.3532-18 с изм. от 13.02.18) и гидроксилamina. Показано, что биомаркеры ДХГФ, гидроксилamina и смесей УВ с числом атомов углерода от 1 до 10 достаточно чувствительны для мониторинга биологически недействующих уровней воздействия этих химических веществ и пригодны для использования в практике экспериментальной токсикологии и для целей гигиенического регламентирования.

Разработанные в процессе выполнения диссертационного исследования методики скрининга и анализа позволили выявить:

- факт ингаляционного поступления УВ C₆-C₁₀ в организм на уровне концентраций от 5.2 мг/м³, УВ C₁-C₅ на уровне концентраций от 50.2 мг/м³, ДХГФ на уровне концентраций от 18.8 мг/м³;
- факт перорального поступления 22.6 мкг/кг гидроксилamina, летучих промышленных токсикантов в период от суток до 6 дней после отравления дозами 0.22 мг/кг, эквивалентными от 3×10^{-5} DL₅₀ до 9×10^{-3} DL₅₀, фосфорорганических пестицидов (ФОП) - в течение 6 дней после отравления дозами 1-50 мг/кг, эквивалентными от 1/50 DL₅₀ до 1/10 DL₅₀, а также RVX - в течение 7 дней после отравления дозами 9.6 мкг/кг, эквивалентными от 2×0.4 DL₅₀ даже в условиях антидотной терапии.

Предложенная методология может быть распространена на другие медико-биологические НИИ, центры профпатологии, центры Роспотребнадзора, токсикологические лаборатории и использована для биоаналитического мониторинга населения и персонала производств нефтегазовой отрасли, производства пестицидов, перепрофилируемых бывших объектов уничтожения химического оружия, ракетно-космической отрасли и прочих химически опасных производств.

«Методика измерений массовых концентраций летучих экотоксикантов в биологических пробах методом газовой хромато-масс-спектрометрии» и «Методика измерений массовых концентраций фосфорорганических пестицидов методом газовой хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием» аттестованы и рекомендованы к применению в лабораториях химико-токсикологического профиля.

Положения, выносимые на защиту

1. Методология хромато-масс-спектрометрического анализа биологических объектов, включающая метод расширенного токсиколого-аналитического скрининга, методики определения экзогенных веществ и методики метаболического профилирования биологических образцов, позволяющая устанавливать пути биотрансформации и механизмы действия ранее не изученных (ксенобиотиков в организме).

2. Возможность безталонной идентификации экзогенных веществ, их метаболитов в биологических образцах при расширенном токсиколого-аналитическом скрининге с применением твердофазной микроэкстракции из паровой фазы и экстракционного вымораживания.

3. Возможность эффективного применения ГХ-МС низкого разрешения для метаболического профилирования плазмы крови, мочи, органов и тканей путем выделения в отдельные базы данных масс-спектров ионизации электронами и газохроматографических индексов удерживания аналитов, составляющих метаболические профили.

4. Количественное определение профилей жирных кислот и их производных в биологических образцах для выявления ранее неизвестных аспектов токсического действия фосфорорганических соединений и алифатических углеводов на организм животных.

5. Выявление характеристических различий в масс-спектрах *орто*- и *пара*-изомеров изомеров алкилфенолов в условиях химической ионизации с регистрацией положительно заряженных ионов с последующей диссоциацией, индуцированной соударениями.

6. Определение зависимости концентраций биомаркеров ксенобиотиков от времени в биологических образцах при моделировании интоксикаций позволяет повышать эффективность биоаналитического мониторинга за счет оценки поглощенной дозы химических веществ.

7. Обнаруженные биомаркеры экспозиции и эффекта промышленных загрязнителей позволяют устанавливать факт воздействия смесей алифатических углеводов с числом атомов углерода от 1 до 10, гидроксилamina и ДХГФ от порога хронического действия и выше.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Степень достоверности исследования достигается использованием современного аналитического оборудования, валидированных и аттестованных методик, достаточным числом исследованных объектов, формированием групп сравнения и контроля, и применением современных методов статистической обработки.

По результатам работы разработаны и опубликованы методические рекомендации ФМБА: МР ФМБА России 4.1.23-2014 и МР ФМБА России 12.038-2016. "Методика количественного хромато-масс-спектрометрического анализа пестицидов в биологических образцах крови и мочи человека" зарегистрирована в качестве секрета производства (ноу-хау). Две методики количественного анализа: «Методика измерений массовых концентраций летучих экотоксикантов в биологических пробах методом газовой хромато-масс-спектрометрии» и «Методика измерений массовых концентраций фосфорорганических пестицидов методом газовой хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием» аттестованы (свидетельства №222.0319/01.00258/2013 и №222.0320/01.00258/2013).

Результаты исследований представлены на международных и всероссийских конференциях: Всеросс. конф. "Химическая безопасность Российской Федерации в современных условиях" Санкт-Петербург, 27-28 мая 2010 г.); Всеросс. конф. "Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез" (Краснодар, 26 сентября – 1 октября 2010 года); "Съезд аналитиков России" (Москва 26-30 апреля 2010 года); "Разделение и концентрирование в аналитической химии и

радиохимии" (Краснодар, 02-08 октября 2011 г.); "III межд. мол. научно-практ. конф. "Коршуновские чтения" (Тольятти, 26-28 сентября 2012 г.); "Всероссийская конференция по аналитической спектроскопии" (Краснодар, 23-29 сентября 2012 г.); "15th International Chemical Weapons Demilitarization Conference-CWD 2012" (Glasgow, Scotland, UK 21-25 мая 2012 г.); "International Symposium on Capillary Chromatography" (Riva del Garda, Italy, 27 мая – 1 июня, 2012 г.); "I Всеросс. научн. конф. "Медико-биологические аспекты химической безопасности" (Санкт-Петербург, 18-20 сентября 2013 года); I Международной научно-практической конференции "Современная химико-токсикологическая экспертиза" 27-28 ноября 2013 г., г. Москва; "VIII Всероссийская конференция с международным участием молодых ученых по химии "Менделеев 2014" (Санкт-Петербург, 1-4 апреля 2014 г.); LXXV Ежегодной итоговой научно-практической конференции "Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины – 2014" (Санкт-Петербург, 21-24 апреля, 2014 г.); "Российском научном форуме "Актуальные вопросы фундаментальной медицины" (Екатеринбург, 23-25 октября 2014 г.); Всеросс. конф. с межд. уч-ем., "Теория и практика хроматографии" (Самара, 25-30 мая 2015 г.); "II Всеросс. научн. конф. "Медико-биологические аспекты химической безопасности" (Санкт-Петербург, 1-2 октября 2015 г.); X Всероссийской конференции "Химия и медицина" с Молодежной научной школой 1-6 июня 2015 г., г. Абзаково; "II Всероссийской конференции по аналитической спектроскопии с международным участием" (Краснодар, 27 сентября -03 октября 2015 г.); Всеросс. научн. конф. "Медико-биологические проблемы обеспечения химической безопасности Российской Федерации" (Санкт-Петербург, 17 февраля 2017 г.); VI Всеросс. симпоз. "Кинетика и динамика обменных процессов" (Сочи, 29 октября – 6 ноября 2017 г.); "III Всеросс. научн. конф. "Медико-биологические аспекты химической безопасности" (Санкт-Петербург, 5-7 сентября 2018 г.).

Публикации. По материалам диссертационного исследования соискателем опубликованы 50 работ, в том числе 21 статья в журналах, рекомендованных ВАК для публикации результатов работы, две главы в монографиях, двое методических рекомендаций, 25 работ, опубликованны в материалах Всероссийских и международных конференций и симпозиумов.

Объем и структура работы

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов (6 разделов), заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 255 страницах машинописного текста, содержит 63 рисунка и 82 таблицы, список использованных источников — 544 наименования.

1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

Определение химических соединений или их метаболитов в тканях и жидкостях организма предпринимается для получения качественных и количественных данных о взаимодействии химических веществ с биологическими системами. Количественным выражением такого

взаимодействия являются так называемые "биологические маркеры" или "биомаркеры". Термин "биомаркер" обычно используют для обозначения любого показателя, отражающего взаимодействие организма с внешним фактором химической, физической или биологической природы [11]. Результатом такого взаимодействия является изменение полного комплекса биохимических, физиологических, иммунологических и других биомаркеров, которыми можно охарактеризовать состояние пациента, что и является целью диагностики [12,13].

Биомаркеры издавна используют в экспериментальных и клинических исследованиях для изучения характера острого и хронического токсического действия соединений, обнаружения признаков нарушения здоровья и биологического мониторинга потенциально опасных экспозиций. Вопрос об их применении для оценки риска стал рассматриваться сравнительно недавно. Число публикаций на эту тему в мировой литературе неуклонно растет, появились журналы "Biomarkers", "Biomarkers & Prevention" и др., которые рассматривают использование биомаркеров для оценки риска [14]. «Рекомендации Международной организации труда по техническим и этическим вопросам медицинских осмотров работников» [15] отмечают важность использования биологических тестов для медицинского обслуживания.

Биологический мониторинг имеет длинную историю: впервые концентрации свинца в крови рабочих были измерены в 1927 году [16], а в настоящее время биомониторингу посвящено множество публикаций (см., например, [17] – мониторинг воздействия ПАУ, галогенуглеводородов, фосфорорганики и токсичных металлов; [2] — мониторинг асбеста, кремния, бериллия, твердых частиц, токсичных металлов, растворителей, СО).

Первые исследования по выявлению корреляций между уровнем воздействия промышленных веществ и их содержанием в биологических жидкостях организма человека были проведены в 1954-1956 гг. Согласно определению, данному в Методических рекомендациях [18], содержание вредного вещества или его метаболитов в тканях или в выделениях организма это - "тест экспозиции". На основе теста экспозиции для его гигиенической интерпретации устанавливаются так называемые биологические ПДК. В России коллективом авторов рекомендованы биологические ПДК для ряда веществ: бензола, стирола, толуола, хлорбензола и свинца [18].

С 80-90-х г.г. прошлого века стремительно растет число научных публикаций о биомаркерах экспозиции для новых и уже используемых в промышленности веществ. Регулярно публикуются списки биомаркеров экспозиции, например, Центром по контролю заболеваний (CDC, США [19]). Обнаружение и идентификация новых биомаркеров экспозиции в первую очередь необходима для повышения точности оценки величины экспозиции для определения реального риска при контакте с тем или иным промышленным веществом для каждого работающего, а также для возможности выделения лиц с повышенным индивидуальным риском или ранними признаками интоксикации при биологическом мониторинге [14].

Существенный вклад в разработку биомаркеров внесли также работы Е. Пиотровски и его сотрудников. В нашей стране под руководством И.Д. Гадаскиной в 60-х годах прошлого столетия проводились работы по изучению «судьбы» ядов в организме и определению органических и неорганических соединений в биосредах. Эти исследования явились фактически первой попыткой обоснования биологических индексов экспозиции в России и нашли свое отражение в монографиях [20] и [21].

Несмотря на давнюю историю исследований по биомониторингу, в России только в 1999 году впервые было принято решение об обязательном определении свинца в крови у рабочих, имеющих профессиональный контакт со свинцом (СП 2.2.5.78-99). К сожалению, в нашей стране при множестве регламентированных веществ для воздуха рабочей зоны (около 3000 утвержденных гигиенических регламентов) биомаркеры экспозиции известны далеко не для всех соединений. Это объясняется недостатком информации для обоснования биомаркеров экспозиции, а именно сведений о поступлении, распределении, накоплении превращении и выведении химического вещества.

Под биомаркерами в разных отраслях науки подразумеваются различные явления, например, в токсикологии биомаркер — это измеримый отличительный биологический или биологически обусловленный индикатор (такой как метаболит) процесса, события или состояния [3]. Термин "биомаркер", согласно Национальной академии наук США [22], употребляется в широком смысле: биомаркером считают почти любой количественный показатель, отражающий взаимодействие между биологической системой и потенциально опасным фактором различной природы. Определяемый показатель ответной реакции может быть функциональным и физиологическим, биохимическим на клеточном уровне или межмолекулярным взаимодействием [23]. Разъяснения Всемирной Организации Здравоохранения не противоречат этому определению: "характеристика, которая объективно измерима и может быть оценена в качестве индикатора нормальных биологических процессов, патогенеза или фармакологического ответа на терапевтическое воздействие" [24] или "некое соединение, структура или процесс, который можно измерить в организме или продуктах жизнедеятельности и влияющий или предсказывающий заболевание, или его исход" [25]. В некоторых токсикологических исследованиях придерживаются определения: биомаркер — это физиологический сигнал, отражающий экспозицию [26] или биологический ответ на химическое вещество, или группу веществ [27].

Определение таких количественных показателей, как биомаркеры имеет важное значение для процесса оценки риска, так как позволяет получать данные о связи экспозиции к данному веществу с поступившим в организм его количеством (его внутренней дозой) и с конечным ре-

результатом его воздействия (исходом) [3]. Экспозиция, согласно общему определению, это контакт между агентом, содержащимся в окружающей среде и доступной поверхностью организма (кожей, глазами, дыхательными путями, пищеварительным трактом и пр.) [2].

С целью обозначения различных типов биомаркеров, ВОЗ предлагает [3] выделить три различных класса биомаркеров:

- биомаркер экспозиции: экзогенное вещество или его метаболит, либо продукт взаимодействия между ксенобиотиком и какой-либо молекулой-мишенью или клеткой-мишенью, определяемый в том или ином отделе организма;

- биомаркер эффекта: измеримое биохимическое, физиологическое, поведенческое или другое изменение в организме, которое можно считать связанным с заведомо известным или возможным нарушением здоровья, или заболеванием;

- биомаркер чувствительности: индикатор присущей организму или приобретенной им способности реагировать на воздействие определенного вещества-ксенобиотика.

Из трех обозначенных категорий биомаркеров (см. рисунок 1), в данной работе подробно рассмотрены только биомаркеры экспозиции и эффекта. Также, несмотря на то, что понятие биомаркер охватывает взаимодействие биологической системы с неблагоприятными факторами различной природы, в качестве таких факторов будут рассмотрены только химические агенты.

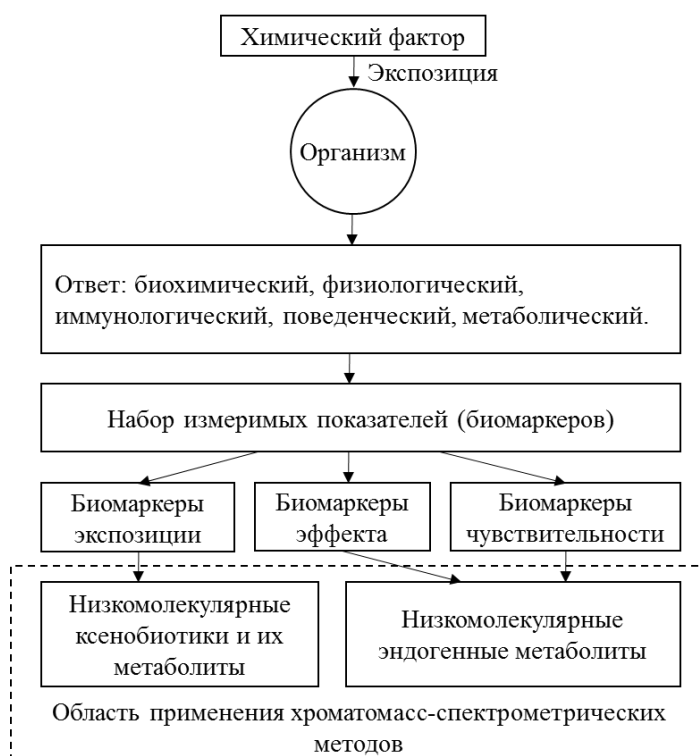


Рисунок 1 — Схема ответа организма на воздействие химического фактора и указание области применения хроматомасс-спектрометрических методов для определения биомаркеров

Применение биомаркеров (в тесной связи с анализом токсических процессов или механизмов) для количественной оценки риска обеспечивает более рациональный и объективный под-

ход, особенно по сравнению с подходом, полагающимся на методы, предусматривающие применение коэффициентов безопасности к дозам для сведения к минимуму или исключения эффектов, признанных вредными для здоровья. Решающее значение имеет правильный подбор биомаркеров, поскольку это позволяет повысить точность оценки риска для индивидов и подгрупп населения и таким образом принимать более эффективные меры по снижению риска и защите здоровья [3].

1.1.1. Биомаркеры экспозиции

Биомаркеры применяют для оценки экспозиции к веществу (количества поступившего в организм вещества — его внутренней дозы) и чувствительности к нему индивидов, независимо от того, являются ли источником экспозиции продукты питания, объекты внешней среды или производственные факторы. Процесс оценки экспозиции с использованием биомаркеров экспозиции лучше всего описывается термином "биомониторинг" или "биоаналитический мониторинг" [2]. Биоаналитический мониторинг — это оценка экспозиции человека ксенобиотиками, присутствующими в окружающей среде, на основе измерения концентраций химических веществ и их метаболитов в крови, моче, слюне или тканях [28]. Результаты таких измерений позволяют измерить внутреннюю дозу [1] и характеризуют "химическую нагрузку на организм человека". Внутренняя доза означает количество химического вещества, абсорбированного в любой части организма. Особенно это актуально для веществ способных к кумуляции, например, концентрация полихлорбифенилов в крови отражает их концентрации в жировой ткани — основном месте депонирования [29]. Кроме того, преимущество биоаналитического мониторинга заключается в совокупной оценке абсорбированной дозы токсиканта, поступившего в организм различными путями [30,31]. В данном случае организм играет роль некоего интегратора экспозиции и различных физиологических факторов, которые модулируют поглощение токсичных соединений [32].

Биоаналитический мониторинг служит основой для эффективной оценки экспозиции людей [33], но зачастую на практике такие оценки основаны на экологическом мониторинге, мониторинге окружающей среды, то есть измерениях концентраций химических веществ в окружающей среде или воздухе рабочей зоны [34,35]. Однако определение химических веществ в воздухе рабочей зоны не дает исчерпывающего представления о количестве токсического вещества, фактически поглощенного организмом, особенно в тех случаях, когда поступление токсиканта возможно, помимо ингаляционного, другими путями: через кожу, желудочно-кишечный тракт и при комплексном поступлении [36].

Совершенно очевидна необходимость разработки и внедрения методов биомониторинга как инструмента доказательной медицины для подтверждения факта экспозиции химическими

веществами и диагностики профессиональных интоксикаций. Вот почему во многих странах в практику оценки опасности воздействия химических веществ все шире внедряются методы биомониторинга.

Одним из важнейших условий успешности оценки рисков воздействия химических веществ является максимально эффективное использование химического и биологического мониторинга, при этом диагноз острого отравления считается окончательным и достоверным только при определении концентрации токсического вещества в биосредах пострадавших [37].

Благодаря применению биомаркеров экспозиции, становится возможным оценить фактическую экспозицию индивидов или популяции и получать сведения о непосредственном воздействии данного химического агента на людей и его дозе, поступившей в организм [3]. Теоретически за распределением токсиканта можно проследить на различных биологических уровнях (тканевом, клеточном и т.д.) вплоть до места действия вещества (его мишени). Концепция биомаркеров экспозиции проиллюстрирована на рисунке 2.



Рисунок 2 — Биомаркеры внутренней дозы веществ, основной механизм действия которых связан с молекулярными взаимодействиями [3]

Оценка общей дозы, полученной разными путями, может быть выполнена методом биологического мониторинга с использованием подходящего биомаркера экспозиции [38]. Оценить

внутреннюю дозу веществ можно с помощью количественного определения биомаркеров экспозиции в биологических пробах (моче, кале, крови и/или ее компонентах, в выдыхаемом воздухе), при этом количественная оценка дозы вещества возможна при условии известной зависимости концентрации биомаркера от времени, то есть его токсикокинетических параметров, а отбор проб проведен в известные моменты времени [3]. Другим условием возможности проведения оценки внутренней дозы является наличие информации о механизме действия химического фактора [39]. Как следует из рисунка 2, часть поступившего в организм вещества достигает ткани-мишени, часть — внутренних макромолекул, а меньшая часть, которая и есть биологически активная доза — критического участка макромолекулы [3]. Биомаркеры, которые имеют отношение к оценке этой целевой дозы особенно полезны при оценке риска [38]. При этом определение у одного индивида одновременно нескольких биомаркеров с разными токсикокинетическими параметрами, например, аддуктов гемоглобина в крови, метаболитов в моче, и исходного соединения в крови, позволяет получить значительно больше информации о характере и времени экспозиции.

Несмотря на то, что некий идеальный биомаркер экспозиции должен быть специфичным к конкретному типу воздействия [40], в группе биомаркеров экспозиции выделяют две подгруппы: селективные и неселективные [35]. Селективные основаны на прямом измерении неметаболизированных форм химических веществ или их метаболитов в биологических средах, в то время как неселективные используются для оценки экспозиции группами соединений, например, экспрессия металлотионеинов отражает экспозицию различными токсичными металлами, а определение диазоположительных веществ в моче означает экспозицию ароматическими аминами [35].

Применение методов биомониторинга может оказаться полезным для гигиенистов еще и потому, что знание абсорбированной за рабочий день дозы яда является объективной характеристикой условий труда на производстве и отражает степень надежности и эффективности индивидуальных средств защиты [37].

1.1.2. Биомаркеры эффекта

Дополнение биомаркеров экспозиции такими физиолого-биохимическими показателями, как биомаркеры эффекта, позволяет повысить надежность диагностики, получить дополнительные сведения о тяжести последствий и патогенезе отравления [13]. Важно подчеркнуть, что по своей сути биомаркер эффекта является показателем эндогенного происхождения и служит для оценки изменения состояния живого организма, в отличие от таких кинетических показателей, характеризующих судьбу того или иного химического вещества, как биомаркеры экспозиции. Биомаркер эффекта продуцируется либо локально больным органом, либо разными органами и тканями организма в ответ на воздействие химического агента. Современные исследования по

разработке методов биомониторинга обычно включают все три категории биомаркеров: экспозиции, эффекта и чувствительности [38].

Идеальный биомаркер обладает высокой чувствительностью, специфичностью и прогностической значимостью, надежно воспроизводится у людей разного пола и разных этнических групп, стоимость его определения невысока, а процедура определения безопасна для здоровья пациентов. Например, золотым стандартом диагностики хронических заболеваний печени в медицинской практике является биопсия печени. Однако, методы морфологии не являются распространенным средством клинической диагностики. По причине инвазивности эти методы непригодны для продолжительного мониторинга. Поиск безопасных, надежных и при этом недорогих методов привел к разработке довольно большого количества биомаркеров для неинвазивной оценки фиброза печени, представляющих собой как простые, непосредственно измеряемые показатели, так и их производные (индексы, соотношения), повышающие чувствительность и/или специфичность оценки (диагноза) [41].

Наиболее изученные биомаркеры эффекта включают изменения в составе крови, изменения активностей конкретных ферментов, появление ДНК-аддуктов, локализованные мРНК и экспрессии белков, появление специфических антител к ксенобиотикам [35]. Далее приведены некоторые важные примеры известных биомаркеров эффекта: содержание низкомолекулярных белков в моче является маркером воздействия на респираторную систему [42], ингибирование дегидратазы аминолевулиновой кислоты специфично для свинца [27], нарушение биосинтеза гема под воздействием некоторых хлорорганических соединений [43], ингибирование ацетилхолинэстеразы (AChE) при воздействии фосфорорганических соединений или карбаматов [44], ингибирование моноаминоксидазы В под воздействием стирола и перхлорэтилена [45], уменьшение активности лизофосфолипазы (нейротоксической эстеразы, NTE, КФ 3.1.1.5) в лимфоцитах под воздействием фосфорорганических соединений, в том числе три-*орто*-крезилфосфата [46]. Повреждения почек выявляют с использованием биомаркеров в моче [35]: альбумина и ретинолсвязывающего белка. Повреждения ДНК под воздействием ПАУ, ароматических и гетероциклических аминов, микотоксинов и препаратов для химиотерапии выявляют с помощью определения аддуктов с ДНК [47]. Биомаркером окислительного поражения является концентрация глутатиона [48]. В некоторых случаях биомаркеры эффекта по механизму действия не связаны с вызываемыми химическими веществами повреждениями, но отражают сопутствующие независимые патологические изменения [3].

Развитие науки, появление новых знаний о молекулярных основах жизнедеятельности и, следовательно, появление новых биомаркеров далеко не всегда приводит к упрощению диагностики и мониторинга заболеваний, как это можно было бы ожидать, а зачастую усложняет работу

врачей вследствие потери цельного представления о живом организме. В этой ситуации возрастает необходимость поиска интегральных биомаркеров, отражающих взаимодействие разных систем организма и обладающих диагностической значимостью [13]. Парадокс и одновременно проблема заключается в том, что процесс поиска биомаркеров часто имеет стихийный и бессистемный характер. Если, например, проведение клинических испытаний регламентируется более-менее четко обозначенными тремя стадиями, то поиск биомаркеров основан главным образом на интуиции и личном опыте исследователей [49,50].

В следующих двух разделах рассмотрены современные хроматомасс-спектрометрические методы обнаружения и идентификации биомаркеров экспозиции и эффекта. Стоит еще раз отметить, что в данной работе в ряду биомаркеров эффекта рассматриваются изменения концентраций эндогенных низкомолекулярных соединений. Выделение химического фактора в качестве целевого предопределяет возможность использования хроматомасс-спектрометрии для обнаружения и идентификации биомаркеров экспозиции. Использование хроматомасс-спектрометрии в качестве единой аналитической платформы позволяет объединить стратегии обнаружения и идентификации биомаркеров экспозиции и эффекта.

1.2. Хроматомасс-спектрометрические методы обнаружения и идентификации биомаркеров экспозиции

Разработка надежной и апробированной на практике процедуры расширенного скрининга, которая в сочетании с методиками количественного определения токсичных соединений в биопробах позволяет существенно повысить возможности химико-токсикологического анализа при выявлении экспозиции к негативным факторам окружающей среды, биомаркеров экологически обусловленных заболеваний, а также при выявлении биомаркеров экспозиции к химическим веществам на опасных производствах.

В настоящее время именно хроматомасс-спектрометрия рассматривается как рутинный инструментальный метод химико-токсикологического анализа, важнейшей задачей которого является выявление причин острых отравлений [51]. В этой связи процедуры скрининга, покрывающие большинство значимых сильнодействующих препаратов и токсинов, востребованы практикой в значительно большей мере, чем процедуры, оптимизированные для определения одного класса токсинов [10].

В разных областях науки под термином "скрининг" (досл. с англ. "просеивание") подразумевают различные методы, например, известен медицинский скрининг — метод массового обследования населения с целью выявления определенного заболевания; токсикологический скрининг — это определение токсических свойств новых соединений [52]; фармакологический скрининг — это, соответственно, метод выявления фармакологических

свойств новых соединений [53]. Применительно к процессу поиска неизвестных токсикантов в литературе используются различные термины. Например, "систематический токсикологический скрининг" (англ. systematic toxicological screening) определяют, как общий (англ. general) или нецелевой поиск токсичных соединений [54], который иногда в англоязычной литературе называется "general unknown screening, GUS" [55]. GUS, в свою очередь, определяют как идентификацию изначально неизвестных соединений в биологическом материале [56]. Иногда употребляется термин "comprehensive drug screening, CDS" — комплексный скрининг препаратов [57]. Стоит отметить, что скринингом также иногда называют процедуру определения в пробе нескольких целевых соединений — для таких задач в некоторых статьях используется термин "multi-target screening" — многоцелевой скрининг [58].

Расширенный токсиколого-аналитический скрининг в общем виде — это аналитическая стратегия, предназначенная для детектирования и идентификации ксенобиотиков в биологических жидкостях, что необходимо для подтверждения диагноза при отравлениях экзогенными соединениями. Газовая хромато-масс-спектрометрия является общепризнанным золотым стандартом скрининга [59,60,61,62]. Преимуществами метода ГХ-МС являются библиотеки справочных данных большого объема и возможность перенесения этих библиотек на ГХ-МС системы разных производителей. Однако использование ГХ-МС ограничено неполярными, летучими и термически стабильными соединениями. Для анализа полярных соединений, например, метаболитов, необходима дериватизация. ВЭЖХ, в принципе, преодолевает эти ограничения. Однако, эффективность разделения и детектирования в рамках метода ВЭЖХ на сегодняшний день уступает ГХ-МС [63,64,65,66].

Интересный пример классификации аналитических стратегий предложен в работе [67]: эти стратегии подразделяются на три типа, в зависимости от объема априорной информации о пробе. В целевом (target) скрининге *a priori* известны определяемые соединения, оптимальный метод анализа, времена удерживания, ММР-переходы, доступны стандарты анализируемых соединений. При нецелевом (non-target) скрининге не всегда очевиден оптимальный метод анализа, но доступны стандарты соединений. Для решения задач токсикологического скрининга при анализе проб заведомо неизвестного состава актуальным является, так называемый, неизвестный (unknown) скрининг, при котором искомые соединения заранее неизвестны и, следовательно, отсутствует информация о методе анализа и недоступны стандарты.

Таким образом, выбор метода в химико-токсикологическом анализе определяется проблемами, которые должны быть решены. Как правило, аналитик не обладает информацией о том, какие соединения подлежат открытию в анализируемой пробе. Поэтому, первым шагом должна быть идентификация потенциальных токсикантов. Н. Maurer, ведущий специалист в

области токсикологического скрининга, указывает, что классический подход к анализу должен включать в первую очередь скрининг и идентификацию, а во вторую подтверждение [68].

Важной частью расширенного токсикологического скрининга является идентификация обнаруженных соединений. В зависимости от выбранного метода анализа и детектирования, процедура идентификации может быть выполнена различным образом.

Безэталонная идентификация токсичных соединений в рамках ГХ-МС низкого разрешения в ряде работ [69,70,71,72,73] подтверждается определением точных масс с использованием техники ГХ-МС высокого разрешения. В ВЭЖХ-МС/МС известны примеры разных подходов, например, в работах [74,75,76] используются библиотеки МС/МС спектров. Пример использования тройного квадруполя с линейной ионной ловушкой для создания "домашней" библиотеки из 800 токсичных соединений приведен в работе [75].

В работе [76], авторы предлагают подход к ВЭЖХ-МС скринингу, основанный на точных массах (разрешение $R = 100'000$). Подтверждение выполняется по точной массе, фрагментным ионам и времени удерживания аналита. По мнению авторов, такой метод скрининга не привязан к базам данных и не ограничен ими.

Использование библиотек, экспериментально зарегистрированных МС/МС-спектров с измеренными точными массами для идентификации токсичных соединений показано в работах [77,78,79].

Подготовка пробы к хроматографическому анализу — важнейший этап скринингового исследования биологических образцов [80]. Он включает выделение целевой аналитической фракции, если необходимо, концентрирование, отделение белка [61,81,82], разрушение конъюгатов и/или дериватизацию аналитов и их метаболитов [83].

Отсутствие априорных сведений о природе определяемых веществ ограничивает возможности проведения селективной пробоподготовки. Именно по этой причине классические методики, используемые для изолирования токсичных веществ и их метаболитов из биоматериала в химико-токсикологическом анализе, неприменимы в расширенном токсикологическом скрининге (*general unknown*). При проведении скрининга важно не потерять биомаркеры токсичных соединений на стадии пробоподготовки. Возможные потери могут быть обусловлены как неизвлечением этих веществ в исследуемую аналитическую фракцию, так и их разрушением под действием высоких температур или агрессивных сред. В ХТА преобладает практика разрушения конъюгатов путем быстрого кислотного гидролиза. Щелочной гидролиз проходит в более мягких условиях, однако только конъюгаты, содержащие сложноэфирные группы, могут быть гидролизованы в щелочной среде. При выборе метода гидролиза необходимо учитывать вероятность образования артефактов [61], кроме того, некоторые ксенобиотики разрушаются при кислотном

гидролизе [84]. Исходя из этого, для определения ксенобиотиков в биологических образцах заведомо неизвестного состава, обычно рекомендуют [85] использовать энзиматический гидролиз с помощью β -глюкуронидазы, выполняемый в мягких условиях.

Важнейшим этапом скрининга биологических проб является изолирование целевых соединений [86], так как методом газовой хроматографии невозможен прямой анализ водных образцов. Наиболее распространенным методом выделения ксенобиотиков из водной фазы в органическую является жидкость-жидкостная экстракция [87,88,89,90]. Альтернативным методом является твердофазная экстракция (SPE) [91,92,93], которая предпочтительна в случае необходимости селективного извлечения целевых соединений из относительно гомогенных образцов, таких как сыворотка крови или моча в фармакокинетических исследованиях или при обнаружении известных аналитов [67]. Универсальные жидкость-жидкостные процедуры предпочтительны для расширенного токсикологического скрининга, так как при этом соединения с разными физико-химическими свойствами должны быть выделены из гетерогенных матриц.

Используемый для жидкость-жидкостной экстракции растворитель должен извлекать максимальное количество ксенобиотиков из биообразца. Есть сообщения об использовании различных экстрагентов: диэтилового эфира, ацетонитрила, этилацетата, хлороформа и дихлорметана в качестве экстрагентов (см., например, [94,95,96]), и даже 1-хлорбутана. Преимуществом использования хлорбутана является его меньшая по сравнению с водой плотность, следовательно, органический слой при экстракции оказывается верхним.

Большинство известных процедур скрининга покрывает только основные и нейтральные соединения, которые преобладают в ряду наиболее значимых токсикантов. Тем не менее, многие классы соединений кислотной природы, таких как кардиоваскулярные препараты, диуретики, кумариновые антикоагулянты, барбитураты или нестероидные противовоспалительные препараты, метаболиты отравляющих веществ, образующиеся по гидролитическому пути, также должны быть обнаружены в рамках скрининговой процедуры. То же можно сказать и о летучих органических соединениях, которые теряются при концентрировании экстрактов или перекрываются на хроматограммах пиком растворителя.

Метод твердофазной микроэкстракции (SPME) существенно расширяет возможности ГХ-МС в части чувствительности и селективности анализа, а также ввиду уникальных возможностей по преодолению матричного эффекта позволяет разрабатывать универсальные процедуры анализа токсичных соединений в воде, напитках, пищевых продуктах, объектах окружающей среды и биологических пробах (плазма крови, моча, гомогенаты органов и тканей). Последнее очень важно для практической деятельности экологических, судебно-медицинских и криминалистических лабораторий.

При подготовке проб к ГХ-МС анализу в настоящее время отдается предпочтение микрометодам, позволяющим избежать применения органических растворителей, которые не только вносят дополнительные артефакты в пробу за счет имеющихся в их составе примесей, но и сами экологически небезопасны. В последние годы интенсивно развиваются "микрометоды" в подготовке проб: твердофазная микроэкстракция [97], жидкофазная микроэкстракция с использованием полого пористого микроволокна [98,99,100,101] и жидкофазная микроэкстракция с одной каплей растворителя (single-drop) [102], капиллярная микроэкстракция (in-tube SPME) с использованием открытых трубчатых капилляров [103], динамическая SPME [104,105], сорбция на содержимом иглы шприца [106], использование техники "stir-bar", основанной на помещении магнитной мешалки с нанесенной неподвижной фазой в анализируемый раствор [107, 108, 109], дисперсионная жидкость-жидкостная микроэкстракция — метод извлечения и концентрирования органических соединений из достаточно большого объема водной матрицы в микрообъем органического растворителя [110].

Метод SPME основан на сорбционном извлечении аналита из жидкой или газообразной пробы на микроволокне, представляющем собой жидкий или твердый сорбент, нанесенный на микропористый носитель, с последующей термодесорбцией аналита в инжекторе хроматографа.

Огромным преимуществом SPME является возможность введения в аналитический прибор практически всей пробы, а не ее аликвотной части, что позволяет на порядок и более повысить чувствительность в сравнении с традиционными методами разделения и концентрирования. SPME позволяет защитить хроматографическую и масс-спектрометрическую системы от загрязнения матричными компонентами. Для успешного использования метода SPME решающее значение имеет правильный выбор микроволокна, условий проведения сорбции (температура, время, режим перемешивания пробы, ионная сила анализируемого раствора) и десорбции (температура, время задержки сброса). Поэтому, при разработке процедуры SPME необходимо оптимизировать следующие параметры: тип микроволокна, температуру сорбции и термодесорбции целевых веществ, время сорбции и термодесорбции, ионную силу раствора.

Эффективность того или иного микроволокна для определения конкретных органических соединений в значительной степени зависит от качественного и количественного состава анализируемой пробы в целом. Большое значение имеет уровень фонового сигнала в ГХ-МС анализе, который очень высок в случае полярных микроволокон (Carbowax, Polyacrylate). Кроме того, анализируемые вещества конкурируют между собой и с матричными компонентами в процессе сорбции. Итоговый результат этих процессов заранее не предсказуем и может быть получен лишь в эксперименте с реальными пробами.

1.3. Хроматомасс-спектрометрические методы обнаружения и идентификации биомаркеров эффекта

Расследования обстоятельств острых и хронических отравлений, ограничивающиеся выявлением ксенобиотиков или биомаркеров экспозиции в организме, не могут дать информации о тяжести комбинированного воздействия химических соединений на организм. Правильно оценить риски, связанные с воздействием химического фактора, невозможно в отсутствие сведений о реальном состоянии адаптационных систем организма. Сочетание определения биомаркеров экспозиции и эффекта — реальный путь для понимания глубины изменений этих профилей, обусловленных протеканием компенсаторных процессов, поскольку одним из результатов воздействия на организм химического фактора является изменение активности определенных ферментов, в частности, ферментов детоксикации, приводящее к напряжению в метаболических процессах и, как следствие, к изменению метаболического профиля.

Одно из направлений поиска новых биомаркеров это метаболомика, или наука о метаболоме — конечном продукте генома, совокупности всех низкомолекулярных метаболитов клетки, ткани или организма. Применительно к токсикологическим исследованиям выделяют новое научное направление — токсикометаболомику, которое позволяет внести значительный вклад в практику лабораторно-клинической диагностики [111]. Внедрение метаболомных подходов в практику токсикологических исследований, а также расширение методических возможностей лаборатории по определению низкомолекулярных, метаболических биомаркеров эффекта позволяет более эффективно проводить обнаружение и идентификацию новых биомаркеров. Последние достижения в метаболомном профилировании могут предложить возможность идентификации как специфичных биомаркеров эффекта, так и более сложных паттернов изменений, являющихся индикаторами токсичности [112].

Несмотря на активное развитие новой области исследований, на данный момент отсутствует универсальное и общепринятое определение термина "метаболомика". Различные авторы определяют это слово по-разному, что не удивительно для области знаний, которая образовалась недавно. Авторы обзора [113] определяют метаболомику как "глобальное и объективное исследование набора небольших молекул с массой менее 1 кДа в биологических жидкостях, тканях, органах или организме", в работе [114] приведена большая верхняя граница молекулярной массы — 1.5 кДа. Это дополняет определение, данное в работах [115,116] и отделяет термин "метаболомика" от "метабономика" [117] и метаболического профилирования [118,119]. Авторы [120] акцентируют внимание на цели метаболомики в "систематическом изучении уникальных низкомолекулярных "отпечатков пальцев" специфичных для процессов, протекающих в живых клетках". Более обобщенно об изучении всех процессов, в которые вовлечены метаболиты, указано в [121].

Существуют разногласия при определении различий между "метаболомикой" и "метабономикой". Различия между двумя подходами не сводятся к выбору аналитических методов, хотя

метабономика преимущественно ассоциируется со спектроскопией ЯМР, а метаболомика — с масс-спектрометрическими техниками. Несмотря на отсутствие общепризнанной точки зрения, считается, что "метаболомика" уделяет большее внимание метаболическим профилям на клеточном и органном уровне и преимущественно связана с нормальным эндогенным метаболизмом. "Метабономика" же использует метаболические профили для получения информации об изменениях метаболизма, связанных с внешними факторами окружающей среды, патологическими процессами и не генетическими изменениями. Так, авторы [122] определяют "метабономику" довольно сложным образом, как "количественное измерение динамического многопараметрического метаболического ответа живых систем на патофизиологические воздействия или генные модификации". Авторы [123] предлагают не считать метаболомику и метабономику синонимами и разделить цели исследований: метаболомные исследования должны исключать метаболические изменения под воздействием не генетических факторов, потому что они являются внешними по отношению к изучаемой системе.

Следует отметить, что иногда к метаболомике относят исследования не только биомаркеров, т.е. метаболитов эндогенного происхождения, но и в некоторых случаях, в токсикологических и фармакологических исследованиях, разделяют метаболиты на эндогенные и экзогенные [124]. Метаболиты чужеродных субстанций (лекарства, яды и т.д.) называют ксенометаболитами или ксенобиотиками [125]. Интересным примером неустоявшейся терминологии являются предложения отнести исследования ксенометаболитов к "метабономике" [117,126].

В ходе выполнения данной работы сложилось следующее представление о надлежащей терминологии: предпочтение отдают термину "метаболомика", как наиболее употребимому в настоящее время. Так, в базе данных Sciencedirect.com за 2016 год зарегистрировано 3402 статьи, использующие термин "метаболомика" и 259 — "метабономика". При этом, "метаболомику" решено определять, как "...исследование набора небольших молекул с массой менее 1 кДа в биологических жидкостях, тканях, органах или организме" [113].

Метаболомика вполне комплементарна геномике, транскриптомике и протеомике [127,128]. Однако, эта технология имеет множество потенциальных преимуществ над другими "омиками" которые могут решить множество проблем, ныне имеющих в них [129].

Метаболом, объект исследования метаболомики, представляет собой совокупность всех метаболитов, являющихся конечным продуктом обмена веществ в клетке, ткани, органе или организме [121], характеризующих режим их функционирования. Если проводить некую гносеологическую классификацию (рисунок 3), то между геномом и метаболомом необходимо расположить транскриптом (совокупность всех мРНК) и протеом (совокупность всех белков).

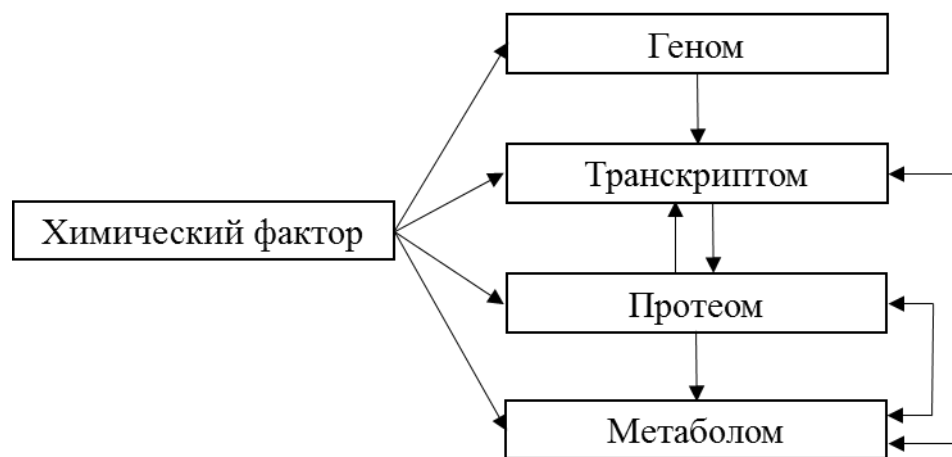


Рисунок 3 — Классификация воздействия химического фактора на геном, транскриптом, протеом и метаболом [121]

Сведения об экспрессии мРНК генов и данные протеомного анализа не раскрывают полностью всего того, что может происходить в клетке, а исследования метаболических профилей могут дать мгновенный снимок физиологических процессов в клетке. Поэтому, одна из задач системной биологии и функциональной геномики — интегрирование данных протеомики, транскриптомики и метаболической информации для получения более целостного представления о живых организмах. Метаболомика обеспечивает информацию высокой степени интеграции по сравнению с другими "омиками" и существенно ближе к ежедневным задачам токсикологии [130]. В случае токсического воздействия, геномика и транскриптомика определяет самые ранние изменения, которые могут или не могут отразиться на протеоме. Изменения в протеоме, в свою очередь, могут и не отразятся на изменениях в концентрациях метаболитов. Экспрессия генов и изменения в протеоме — это субъекты гомеостаза и механизмов обратной связи. Чистый конечный результат изменений в этой последовательности — это изменения в метаболоме. Определение конечного результата увеличивает возможность понимания механизмов токсичности и развития негативных эффектов [111].

Изучение метаболома оказалось достаточно перспективным: во-первых, основные пути метаболизма достаточно хорошо изучены (о существовании большинства метаболитов хорошо известно); во-вторых, общее количество метаболитов сравнительно невелико, особенно если сравнивать с общим количеством модифицированных белков (примерно 3×10^3 метаболитов и более чем 10^7 белков) [131]. Еще одним преимуществом является то, что изменения фиксируются в биожидкостях — крови и моче. Таким образом, анализ большого числа внутренних органов заменяется анализом одной матрицей, что имеет существенные практические преимущества (менее инвазивный метод, без эвтаназии животных, возможность длительного наблюдения).

Метаболизм представляет собой результат взаимодействия генетической программы с условиями окружающей среды, соответственно, метаболический профиль отражает влияние не

только генов, но и питания, климата и других внешних факторов. Количественное метаболическое профилирование берет начало с одного калифорнийского 10-летнего проекта, осуществленного в 1968-1978 гг. Тогда с использованием методов газовой хроматографии и масс-спектрометрии было исследовано более 15000 биологических образцов человека, впервые была получена информация о метаболических показателях, связанных с возрастом, полом, характером питания, болезнями [132]. Наследственные нарушения метаболизма аминокислот в течение многих лет определяли в результате качественного и количественного анализа аминокислот в крови и моче. Анализ проводился при помощи ионообменной хроматографии с последующей дериватизацией нингидрином и отличался низкой производительностью метода (около 8 образцов в день). Появление тандемной масс-спектрометрии, сопряженной с жидкостной хроматографией, позволяет анализировать аминокислоты, их производные и другие низкомолекулярные соединения без дериватизации и в различных биологических образцах, приготовленных при осаждении метанолом, что увеличило производительность до 40 образцов в день [133]. Следует отметить, что для обнаружения нового биомаркера необходимо, как правило, найти и проанализировать динамику огромного количества метаболитов в немалом количестве образцов (проб). Так, анализ с применением методов жидкостной и газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией 262 клинических образцов ткани, плазмы крови и мочи, взятых у больных доброкачественной гиперплазией и раком предстательной железы на стадиях локализованного рака и метастазирования, выявил 1126 метаболитов. При этом был выявлен лишь один новый показатель, уровень которого повышается при переходе на стадию метастазирования — саркозин, N-метильное производное глицина [134]. В другом исследовании, при сравнении двух продуктов питания: бананов и углеводного напитка, потребляемых профессиональными велосипедистами, оказалось, что исследуемые группы отличались лишь по одному из 103 показателей т.н. метаболомного профиля — по дофамину. В то же время, 3 из 15 иммуно-биохимических показателей (IL-10, IL-8, FRAP — железоснабжающая способность плазмы) имели более высокие значения у потреблявших бананы [135].

Поскольку основной целью метаболомики по сути является предоставление исчерпывающей информации о физиолого-биохимическом статусе биологической системы, в токсикологии возможности метаболомики как вспомогательной методологии максимальны по сравнению с возможностями других "омик", т. к. метаболомные исследования могут дать наиболее точный ответ на вопрос о мишенях токсических веществ и силе их воздействия. Методы метаболомики могут обеспечить токсикологические исследования самым главным — новыми биомаркерами, с помощью которых можно будет с большой точностью охарактеризовать состояние интоксикации

и осуществлять мониторинг лекарственной терапии [136]. Кроме того, токсикометабономика является перспективным инструментом использования такого нового направления как оценка рисков воздействия наноматериалов [137,138].

Метабономика дает возможность оценить реальную токсичность вещества уже с учетом всех "вертикальных" и "горизонтальных" взаимодействий. Кроме того, время и трудозатраты на один "метаболомный" эксперимент ниже по сравнению с другими "омик-технологиями" [111]. Метабономика может реально ускорить тестирование новых химических веществ на предмет их фармакологических или токсических характеристик, если тестирование будет постепенно переведено на рельсы высокопроизводительных методов *in vitro* с применением клеточных и тканевых культур. Полагают, что разница в геномах и во взаимосвязях между геномом, транскриптомом, протеомом и метаболомом разных видов экспериментальных животных и человека гораздо больше, чем та разница, которая обусловлена особенностями экспериментов *in vitro* с клетками или тканями человека. Поэтому формирование токсосома как некоей базы данных, наряду с использованием высокопроизводительных методов оценки токсичности веществ, поможет постепенно ликвидировать огромную "задолженность" токсикологической науки перед человечеством, выражающуюся в том, что практически неизученными являются более 80 тысяч веществ, с которыми человек взаимодействует с той или иной степенью регулярности [9]. Поэтому неудивительно, что первоочередным результатом создания токсосома должна стать возможность определения нетоксичных концентраций веществ, то есть концентраций, при которых не происходит запуск тех или иных механизмов токсического действия [143].

1.3.1. Использование метаболического профилирования в токсикологии

Еще в 2000 году высказывались предположения о том, что метабономика станет новым способом быстрого токсикологического скрининга [139]. Ранние метаболомные исследования были направлены на выявление гепато- и нефротоксичности при анализе сыворотки и мочи грызунов после 7-дневного экспонирования 147 различными химическими веществами [140]. Химическая промышленность уже взяла на вооружение метабономику для оценки токсичности: в 2012 году, BASF, запустили проект базы данных MetaMapWTox [150]. В базу данных вошли результаты тестирования более 500 химических соединений (28-дневные исследования на крысах), в базе содержатся паттерны (образы, сигнатуры) воздействия различных химикатов на различные мишени (печень, почки, щитовидную железу, кровь, тестикулы, нервную и эндокринные системы). Метаболомный подход позволяет предполагать механизмы токсичности на ранних стадиях, ускорять оценку рисков, снижать стоимость исследования и количество животных [141].

Поворотным моментом в токсикологической науке считается программный доклад Национального научно-исследовательского совета Академии наук США, опубликованный в 2007 г.

[142]. В нем предлагалось перейти на использование низших организмов, методов *in vitro*, *in silico*. Основной задачей токсикологической науки 21-го века было предложено считать определение механизмов действия веществ, идентификацию "путей токсичности" с использованием высокопроизводительных "омик"-технологий. Ключевыми понятиями токсикометаболомики являются "пути токсичности" и "сигнатуры токсичности", формирующие представления о динамике развития интоксикации и временном срезе этого процесса. Токсикометаболомика призвана интегрировать наши представления о токсикокинетике химических соединений и токсикодинамике физиолого-биохимического ответа на токсическое воздействие, конкретизировать представления о гомеостазе, стрессе и механизмах адаптации к воздействию чужеродного химического соединения. Результатом такой интеграции может стать полное картирование "путей токсичности" и создание "токсома" — целостного представления о механизмах действия веществ, о взаимосвязи между дозой и временем, и последствиях воздействия [9,143].

Фармакотерапевтическое применение метаболомики — фармакометаболомика позиционируется в первую очередь как часть "персонализированной медицины", то есть такого подхода к диагностике и терапии заболеваний, который бы в комплексе учитывал особенности генотипа человека, его протеомный и метаболомный статус [144]. В отличие от этого, генотип и протеомный статус гораздо меньше интересуют токсикометаболомику; в то же время, предметом исследования токсикометаболомики являются не только последствия воздействия ксенобиотиков. Например, целевое профилирование мочи мышей-опухоленосителей [145] позволило выявить изменения уровня целого ряда биомаркеров — продуктов эндогенного происхождения, свидетельствующих о развитии онкологического процесса: снижение концентрации триэтиламиноксида и гиппурата, повышение 3-индоксилсульфата, 2-оксоглутарата и цитрата в моче. Некоторые из этих показателей выявлены с помощью методов метаболомики в качестве биомаркеров хлорида ртути: установлено повышение в моче концентраций глюкозы, ацетата, аланина, лактата, сукцината и этанола, а также снижение концентраций 2-оксоглутарата, аллантаина, цитрата, формиата, таурина, гиппурата [146]. Цитрат — основной биомаркер эффекта фторацетата или фторацетамида и свидетельствует об активности в первую очередь митохондриальной аконитазы; менее специфичным признаком интоксикации является уровень свободных жирных кислот в первые часы после острого отравления [147,148]. В связи с этим, интересно отметить тесную взаимосвязь уровня цитрата наряду с уровнем альбумина, орозомукоида и липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП) в плазме крови с повышенной вероятностью летального исхода для больных, вне зависимости от характера их заболевания [149].

Токсикометаболомика как направление метаболомных исследований в токсикологии начала активно развиваться после 2005 года. Однако, основной пик исследований приходится на

2010-е. Несмотря на это, количество исследований, посвященных токсикометаболомике, все еще существенно меньше, чем медицинскому применению метаболомики.

При выполнении данной работы нами проведен поиск литературных данных, описывающих использование нецелевого метаболического профилирования для исследований механизмов токсичности химических соединений. Результаты этого поиска суммированы в таблице 1. В качестве краткого резюме каждого исследования в таблице приведены названия исследованных веществ, модельный организм, дозировка или режим дозирования, а также краткий результат. В таблице 1 резюме исследований сгруппированы в четыре подкатегории, где результатом являются маркеры воздействия химических веществ на печень, почки, прочие органы — в эту группу отнесены маркеры эмбриотоксичности, кардиотоксичности, негативного воздействия на тестикулы и щитовидную железу. Отдельную группу составляют исследования, в результате которых выявлены маркеры нарушения нормального течения отдельных процессов: метаболизм углеводов и жирных кислот, нарушение баланса нейротрансмиттеров, окислительный стресс, нарушение энергетического обмена и пр. Стоит отметить, что всего в двух исследованиях вообще не были выявлены маркеры негативного воздействия токсичных соединений: [200,201].

Таблица 1 — Подборка большинства доступных статей, описывающих использование нецелевого метаболического профилирования для исследований механизмов токсичности химических соединений

Вещество	Режим дозирования	Результат выявления биомаркеров	Организм, (ссылка)
1	2	3	4
Выявлены маркеры поражения печени			
2-Ацетиламинофлуорен	10-50 ppm, с пищей	Маркеры гепатотоксичности	R. ¹ [150]
4-Ацетиламинофлуорен	100-500 ppm, с пищей		
Фелбамат	300-1920 мг/кг, в/ж		R. [151]
Дантролен	100-1000 мг/кг, в/ж		
Сточные воды химических предприятий	90 дней с водой	Нарушение метаболизма липидов в печени, маркеры гепатотоксичности	M. ² [152]
α-Нафтилизотиофианат	75 мг/кг, в/ж	Маркеры гепатотоксичности	M. [153]
Мышьяк	3 мг/кг, в/ж	Нарушение энергетического метаболизма, разрушение мембран клеток, поражение печени	M. [154]
Кадмий	0.1 мг/кг, в/ж		
CCl ₄	1 мл/кг, 6 дней, в/бр	Маркеры гепатотоксичности	R. [155]
	50-2000 мг/кг, в/ж		R. [151]
	2 мл/кг, в/бр		R. [156]
Парацетамол	500-800 мг/кг, в/ж	Маркеры гепатотоксичности	R. [157]
	100-1250 мг/кг		R. [151]

Вещество	Режим дозирования	Результат выявления биомаркеров	Организм, (ссылка)
1	2	3	4
Этиловый спирт	12-65 г/день, с водой	Маркеры гепатотоксичности	H.s. ³ [158]
2,3,7,8-тетрахлордibenзо- <i>n</i> -диоксин	Конц-я в крови: 5 нг/г белка крови	Увеличение экспрессии цитохрома P450, гепатотоксичность, нарушение гомеостаза желчных кислот	H.s. [159,160]
	10-200 мкг/кг, в/бр	Маркеры воспалительных процессов и поражения печени	M. [161]
	20 мкг/кг/д, с пищей 3 дня	Накопление липидов, увеличение β-окисления жирных кислот, маркеры воспаления	R. [162]
Тиоацетамид	10-30 мг/кг, в/бр, 28 дней	Изменение концентраций желчных кислот, ацилкарнитинов и фосфолипидов в крови и печени	R. [163]
Микрочастицы оксида кремния 70-300 нм	10-200 мг/кг, в/в	Маркеры гепатотоксичности	M. [164]
Соли Gd	10-50 мг/кг, в/бр	Маркеры гепатотоксичности	R. [165]
Тиоацетамид	20 мг/кг, в/бр, 7 нед ч/з 2 дня	Выявлены потенциальные биомаркеры фиброза печени	R. [166]
Выявлены маркеры поражения почек			
2-Метил-4-хлорофеноксиксусная кислота	2500 ppm, с пищей 28 дней	Увеличение количества пероксисом, ингибирование транспорта анионов в почках	R. [167]
3-Нитро-4-хлоранилин	45 мг/кг, в/ж, 28 дней		
Аконитин	2.54 мг/кг, с пищей	Маркеры нефротоксичности	R. [168]
Мезаконитин	3.57 мг/кг, с пищей		
Гипаконитин	13.63 мг/кг, с пищей		
Ацикловир	100-600 мг/кг, в/в	Маркеры нефротоксичности	R. [169]
Семена ипомеи трехцветной	3 г/кг/д, в/ж 10 недель	Маркеры нефротоксичности	R. [170]
Ацефат	0.5-4.5 мг/кг/д, 24 недели с водой	Маркеры нефротоксичности и нарушения метаболизма глюкозы, нуклеиновых кислот и протеинов	R. [171]
Дипальмитат 3-хлорпропандиола-1,2	12.3-3600 мг/кг/д, в/ж	Маркеры нефротоксичности	R. [172]
Выявлены маркеры поражения прочих органов			
Ди-(2-этилгексил)фталат	3000 ppm, 28 дней с пищей	Увеличение количества пероксисом	R. [173]

Вещество	Режим дозирования	Результат выявления биомаркеров	Организм, (ссылка)
1	2	3	4
Дибутилфталат	150-7000 ppm, 28 дней с пищей		
Флузилазол	1 нМ — 100 мкМ (конц-я в среде)	Маркеры эмбриотоксичности	hES ⁴ [174]
Пиридабен			
Флуазинам			
Бутралин			
S-биоаллетрин			
Циклофосфамид	200 мг/кг, в/бр	Маркеры кардиотоксичности	R. [175]
CCl ₄	1 мл/кг, в/бр	Окислительный стресс в различных органах, нарушение их функций, включая почечную осморегуляцию, увеличение гликолиза и катаболизма протеинов и нуклеотидов	R. [176]
Триптолид	60 мкг/кг/д, 14 дней	Маркеры поражения яичников	M. [177]
Метимазол	100 мг/кг, в/ж	Маркеры поражения щитовидной железы	R. [178]
6-Пропил-2-тиоурацил	10 мг/кг, в/ж		
Этилентиомочевина	300 ppm, в/ж		
Боскалид	15000 ppm, в/ж		
Метазахлор	20000 ppm, в/ж		
Арохлор 1254	25 мг/кг, в/ж		
Пендиметалин	10000 ppm, в/ж		
	300 ppm, в/ж		
Фипронил	40-80 мкг/л в воде	Увеличение двигательной активности и, как следствие, увеличение потребления жирных кислот и нейротрансмиттеров	D.r. ⁵ [179]
Маркеры нарушения отдельных процессов			
Фенобарбитал	10-1000 ppm с пищей, 7 дней	Увеличение концентрации тирозина в крови	R. [112]
Пропилтиоурацил	0.1-10 мг/кг, в/ж, 7 дней		
Флутамид	1-100 мг/кг, в/ж, 7 дней		
BAS 670 H ⁶	60-8000 ppm с пищей, 7 дней		
BAS 660 H ⁶	60-8000 ppm с пищей, 7 дней		
Дихлофос	2.4-21.6 мг/кг/д, 8 недель	Нарушение метаболизма углеводов и жирных кислот	R. [180]

Вещество	Режим дозирования	Результат выявления биомаркеров	Организм, (ссылка)
1	2	3	4
	1.29-10.36 мг/л в воде, 10 дней	Нарушение баланса нейротрансмиттеров, окислительный стресс, нарушение энергетического обмена	C.a. ⁷ [181]
Бенз[а]антрацен	4 мкМ в воде	Нарушение синтеза протеинов, функций митохондрий, нервной и сердечно-сосудистой систем	D.r. [182]
Бенз[а]антрацен-7,12-дион	4 мкМ в воде		
Бенз[а]пирен	1-10 мкг/л в воде, 7 дней	Нарушение процессов осморегуляции и энергетического обмена	P.m. ⁸ [183]
Этиловый спирт	7-21 г/кг/день, с водой	Гипоксия, активация процессов гликолиза, ингибирование процессов коагуляции крови и почечной аминоацилазы I	M. [184]
	2.2%-5.4% с пищей	Нарушение метаболизма глюкозы, жирных кислот и метаболитов цикла трикарбоновых кислот	M. [185]
Пирен	10-640 мг/кг почвы, 42 дня	Нарушение метаболизма глюкозы, жирных кислот и метаболитов цикла трикарбоновых кислот	L.r. ⁹ [186]
Милтефозин	Терапевтическая доза	Повреждение ДНК и мембран	L.i. ¹⁰ [187]
Ртуть	Содержание в окружающей среде	Нарушение процессов осморегуляции, катаболизма протеинов, повреждение мембран, нарушение редокс-баланса	L.a. ¹¹ [188,189]
Свинец	10-100 мкг/л в воде	Повышение уровня органических осмолитов и уменьшение концентраций свободных аминокислот	R.d. ¹² [190]
Цинк	20-150 мкг/л в воде		
Триклозан	0.1 мкг — 1 мг/см ² н/кожн	Выявлены маркеры разложения	E.f. ¹³ [191]
	6 мкг/л — 14 мг/л в воде	Окислительный стресс, изменения концентраций разветвленных аминокислот	D.m. ¹⁴ [196]
Вомитоксин	1 ppm конц-я в среде	Нарушение метаболизма аминокислот и глюкозы	ANA ¹⁵ [192]
Зеараленон	8 ppm конц-я в среде		
Буплеротоксин	2.5 мг/кг в/бр 7 дней	Нарушение метаболизма ГАМК	M. [193]

Вещество	Режим дозирования	Результат выявления биомаркеров	Организм, (ссылка)
1	2	3	4
Афлатоксин В1	0.25-1.5 мг/кг в/ж 7 дней	Нарушение глюконеогенеза и метаболизма липидов	R. [194]
Бисфенол А	0.5 мкг/кг/д — 50 мг/кг/д в/ж 8 недель	Увеличение метилирования ДНК, деградация белков нарушение метаболизма холина	R. [195]
Карбамазепин	1.75-14 мг/л в воде	Нарушение энергетического обмена	D.m. [196]
Ибупрофен	48 h LC50 в воде	Маркеры общей токсичности	
λ-цигалотрин	12 нг/л 7 дней в воде	Нарушение баланса нейротрансмиттеров, осморегуляторов, окислительный стресс, нарушение энергетического обмена	C.a. [197]
Метамфетамин	10 мг/кг/ч в/бр 4 часа	Ингибирование гликолиза, окислительного фосфорилирования и β-окисления жирных кислот	R. [198]
Бутахлор	0.64-3.2 мкМ в воде 10 дней	Окислительный стресс, нарушение энергетического обмена, и баланса нейротрансмиттеров	C.a. [199]
Гексабромциклододекан	2 нМ-2 мкМ конц-я в среде	Не выявлено	A549 ¹⁶ [200]
Полихлорбифенил РСВ-153	50 мг/кг в/ж раз в две недели, 10 недель	Не выявлено	M. [201]

Примечание: 1 — R — *Rattus norvegicus*, 2 — M — *Mus musculus*, 3 — *Homo sapiens*, 4 — эмбриональные стволовые клетки человека, 5 — *Danio rerio*, 6 — перспективные гербициды, ингибиторы 4-гидроксифенилтируват диоксигеназы (КФ 1.13.11.27), 7 — *Carassius auratus*, 8 — *Pinctada martensii*, 9 — *Lumbricus rubellus*, 10 — *Leishmania infantum*, 11- *Liza aurata*, 12 — *Ruditapes decussatus*, 13 — *Eisenia fetida*, 14 — *Daphnia magna*, 15 — Клетки ANA-1, 16 — A549 и HepG2/C3A клетки человека.

Диапазон организмов, применяемых в качестве модельных в токсикологических исследованиях, довольно широк, однако основными являются крысы или мыши, хотя есть и единичные исключения: с использованием рыб *Danio rerio* [182] и *Liza aurata* [188] в водоемах была проведена оценка воздействия концентраций ртути, релевантных их содержанию в окружающей среде, то есть данные работы являются примером использования метаболомики для биомониторинга. Другим примером выявления маркеров воздействия экологически релевантных концентраций токсичных соединений является работа [176], в которой авторы выявили маркеры разложения навозных червей под воздействием триклозана.

Нецелевое метаболическое профилирование биологических образцов человека для выявления негативного воздействия токсичных химических соединений ограничивается исследованием воздействия регулярного употребления этилового спирта [158] и мониторингом воздействия 2,3,7,8-тетрахлордibenзо-*пара*-диоксиана [159,160].

В результате обобщения доступных литературных данных о применении нецелевого метаболического профилирования при токсикологических исследованиях можно сделать следующий вывод — публикации по токсикометаболомике можно условно разделить на две категории. Основная часть работ посвящена изучению механизмов токсического действия химических соединений, выявлению новых путей токсичности, новых органов-мишеней или процессов, нормальное течение которых нарушено под воздействием исследуемого химического фактора, например, в статьях [180,202] сделан вывод о том, что дихлофос влияет на метаболизм углеводов и жирных кислот.

Вторая группа работ посвящена выявлению паттернов (образов или сигнатур токсичности) воздействия различных химикатов на органы или организм в целом. Показательным примером является проект базы данных MetaMapWTox [150], в которую вошли более 500 химических соединений. В таблице 1 со ссылкой на публикацию [150] приведены только 4 соединения, остальные, содержащиеся в базе данных MetaMapWTox, в публикации не раскрыты.

Только в трех работах цели исследователей отличались от установления механизмов токсичности и выявления сигнатур токсичности: выполнено сравнение чувствительности метаболомного и классического токсикологического методов определения токсикометрических параметров "NOEL" и "NOAEL".

Вопрос сравнения чувствительности классических и метаболомных подходов к токсикометрии химических соединений, поднятый в работе [130], представляется достаточно актуальным, так как метаболомные подходы, наряду с другими "омиками", активно внедряются в токсикологические исследования. В качестве токсикометрического параметра авторы [130] использовали уровень доз и концентраций, не вызывающий видимых вредных эффектов (NOAEL). В отечественной практике аналогами NOAEL (No observed Adverse Effect Level) является МНК — максимальная недействующая концентрация (или МНД — максимально недействующая доза).

При этом было проведено сравнение чувствительности определения NOAEL для 104 различных химических соединений при использовании классического и метаболомного методов. Сравнимая чувствительность методов была достигнута в 75% случаев, в 8% более чувствительным оказалась метаболомика и в 17% классический подход. Классический подход был реализован в соответствии с [203], а метаболомный в соответствии с [204].

Стоит пояснить, что при метаболомном определении NOAEL в качестве критерия было принято "отсутствие постоянного изменения в метаболическом профиле, связанного с вредным эффектом"[203,204].

Все случаи большей чувствительности (в определении NOAEL) метаболомного подхода были связаны с негативным воздействием веществ на печень, которые не проявлялись ни при гистологическом исследовании, ни в увеличении массы органа, ни в биохимических маркерах [130]. Большая чувствительность метаболомики при выявлении гепатотоксичности связана с тем, что печень ответственна за состав большинства низкомолекулярных соединений крови, поэтому метаболомный анализ крови — это во многом анализ эффектов печени. С другой стороны, гепатотоксичность очень распространена по сравнению с другими видами токсичности.

Классический подход оказался чувствительнее, в основном, при выявлении интегральных или физиологических маркеров: уменьшение массы тела, шумы в легких, количество лейкоцитов и кристаллы в моче.

Другим токсикометрическим параметром, использованным для сравнения чувствительности классического и метаболомного подхода, является NOEL (No observed Effect Level) — уровень доз и концентраций, не вызывающий видимых эффектов. Данный параметр не имеет прямого аналога в отечественной токсикологии.

В качестве метаболомного критерия NOEL авторы предложили следующее определение: концентрация (доза), при которой менее 5% компонентов метаболического профиля достоверно изменены с уровнем статистической значимости $p < 0.05$ по сравнению с контрольной группой. Соответственно, чувствительность определения NOEL сильно зависит от чувствительности выбранного метода метаболического профилирования, а также от количества аналитов определяемых выбранным методом. Стоит отметить, что метаболомное определение NOEL связано только со статистически значимыми отклонениями, а не с негативным воздействием. Метаболомный критерий NOEL согласуется с классическим в 69% случаев, в 15% более чувствителен метаболомный критерий, в 4% более чувствителен классический.

Примеров сравнения чувствительности метаболомного и классического определения токсикометрического параметра "LOAEL" (Lowest Observed Adverse Effect Level) в доступной литературе обнаружить не удалось, хотя можно предположить метаболомные критерии его определения аналогичными NOAEL. Параметр LOAEL имеет аналоги в отечественной практике: Lim_{ac} — порог однократного действия или Lim_{ch} — порог хронического действия, минимальная концентрация (доза), вызывающая изменения биологических показателей, нижний уровень доз и концентраций, оказывающих вредное действие.

Несмотря на то, что токсикометаболомика является активно развивающейся областью науки, актуальной представляется задача не только сравнения классических и метаболомных

критериев токсичности химических соединений, но и активное внедрение метаболомных подходов в химико-токсикологический анализ. Для этого необходимо проводить сравнение чувствительности методов выявления как биомаркеров экспозиции, так и биомаркеров эффекта негативного химического фактора. Причем, увеличение чувствительности аналитического метода обеспечивает возможность детектирования большего спектра метаболитов, увеличивая шансы обнаружить релевантные биомаркеры, паттерны изменений метаболических профилей [205,206,207,208], и, следовательно, позволяет повысить чувствительность определения критериев токсичности, а также чувствительность методов выявления факта воздействия негативного химического фактора.

1.3.2. Инструментальные методы метаболического профилирования

Метаболомика — это, в первую очередь, методология химического и биохимического анализа, направленная на исчерпывающее определение метаболитов (метаболического профиля) в биологических жидкостях и тканях. Изначально объектом исследования в метаболомике были т.н. "биожидкости" — плазма или сыворотка крови, моча, позже были исследованы грудное молоко [209], слюна [210], пот [211], спинномозговая жидкость [212], а также выдыхаемый воздух [213], ткани [214,215] и клеточные культуры [216,217].

В контрасте с геномикой и протеомикой, в которых аналиты — это биологические макромолекулы, весьма похожие с точки зрения химии [240], в метаболомике химические классы целевых соединений весьма диверсифицированы [218,219,220,221], а значительный динамический диапазон концентраций метаболитов усложняет получение информации об образце [222].

Наиболее часто используемые инструментальные методы в метаболомных анализах — это ЯМР-спектроскопия на различных ядрах (^1H , ^{13}C , ^{31}P и пр.) [223], ВЭЖХ-МС и ГХ-МС [224,225], выбор которых зависит от поставленных целей. Каждая аналитическая платформа предоставляет комплементарную информацию со своими преимуществами и недостатками.

Условно, методологию метаболомики можно разделить на две части: целевая и нецелевая [12] (рисунок 4). Первая предполагает целевой поиск и, как правило, количественный анализ ограниченного числа заведомо известных веществ; в этом смысле может показаться, что она мало чем отличается от лабораторно-клинического, химического или биохимического анализа.

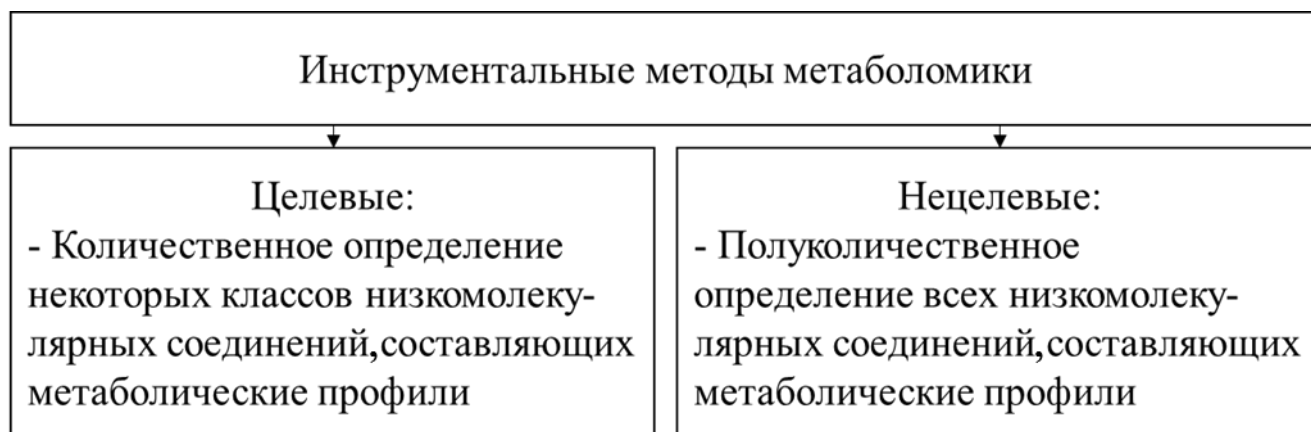


Рисунок 4 — Целевые и нецелевые инструментальные методы метаболомики

Нецелевая метаболомика — это исчерпывающий анализ всех измеряемых метаболитов, в том числе неизвестных, а потому такой анализ по определению не может быть количественным по отношению ко всем метаболитам сразу. На практике часто получается так, что изначально нецелевая метаболомика постепенно становится целевой, по мере того как неизвестные метаболиты становятся известными или, что более важно, становится известна их роль и место в метаболизме.

В целевом анализе только ограниченное число предварительно определенных метаболитов рассматривается в тщательно спланированном аналитическом методе. Этот анализ характеризуется чувствительностью, но дает ограниченную информацию об общем метаболоме. Нецелевые методы ставят целью определить наибольшее число метаболитов в одном анализе, однако такие методы зачастую полуколичественны, так как невозможно оптимизировать метод для всех соединений. Третий подход — диагностический, фокусируется на нескольких валидированных биомаркерах, используя простые и доступные технологии.

Диаграмма, показывающая покрытие различными инструментальными методами (ЯМР, ГХ-МС, ВЭЖХ-МС и пр.) различных количеств соединений, составляющих метаболические профили сыворотки крови, приведена на рисунке 5. Цифрами обозначены количества соединений, покрываемых тем или иным методом, в пересечение кругом на диаграмме указаны соединения, определяемые различными методами.

Стоит отметить, что всего, по оценке приведенной в работе [114], метаболом сыворотки крови состоит из 4229 низкомолекулярных соединений, в то время как с использованием 5 различных аналитических платформ ВЭЖХ-МС/МС, ЯМР, ТСХ/ГХ-ПВД, ГХ-МС и DFI-MS — масс-спектрометрию прямого ввода, возможно покрыть 3564 соединения.

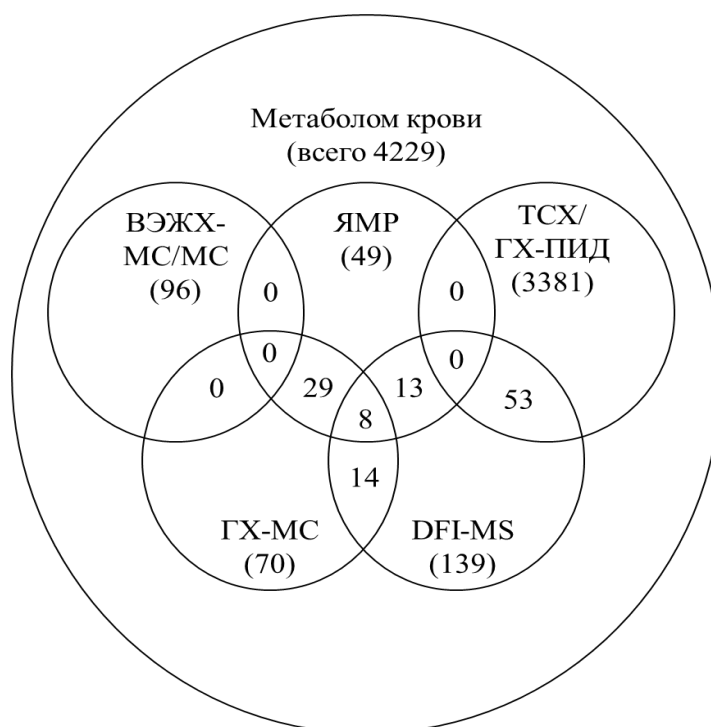


Рисунок 5 — Диаграмма, показывающая покрытие различными инструментальными методами (ЯМР, ГХ-МС, ВЭЖХ-МС и пр.) различных количеств соединений, составляющих метаболические профили сыворотки крови [114]

Преимущества ЯМР — простота пробоподготовки и интерпретации спектра, высокая производительность, а основной недостаток — низкая чувствительность, достаточная для определения лишь тех метаболитов, концентрации которых относительно велики. Метод ВЭЖХ-МС намного более чувствителен при определении низкомолекулярных метаболитов и даже пептидов, его высокая прецизионность и точность позволяют безошибочно определять многие пептиды и нуклеозиды даже в сложных матрицах [226]. В то же время, метод ВЭЖХ-МС имеет ограничения при определении многих низкомолекулярных соединений, например, жирных кислот, которые являются важнейшими компонентами метаболизма. Методы газовой хроматографии с квадрупольными или времяпролетными масс-анализаторами, несмотря на то, что требуют проведения предварительной дериватизации образцов, имеют значительные преимущества перед другими методами, так как обладают высокой чувствительностью и воспроизводимостью, а также характеризуются простотой интерпретации масс-спектров метаболитов [227,228]. Для идентификации метаболитов по масс-спектрам используют аналитические стандарты и библиотеки масс-спектров, например, библиотеку Национального института стандартов и технологий США (NIST). Методами ГХ-МС возможно проводить определение метаболитов с молекулярными массами приблизительно до 700 Да. Необходимым, но не всегда достижимым условием использования методов хроматографии для метаболомики является полное хроматографическое разделение всех компонентов биологического образца. Кроме того, полный набор аналитических

стандартов компонентов метаболических профилей обычно недоступен, поэтому нецелесообразное метаболическое профилирование по сути происходит в режиме т.н. "безэталонной идентификации", что позволяет унифицировать подходы, применяемые к метаболическому профилированию и к расширенному токсиколого-аналитическому скринингу. Стоит отметить, что, несмотря на большое количество известных баз данных метаболитов (Human Metabolome Database (HMDB) [218,229], KEGG [230], LipidMaps [231], PubChem [232], ChEBI [233], MMCD [234], Metlin [235] и MassBank [236]), в одном образце, зачастую, может быть идентифицировано только 10-30%.

Как и метод токсиколого-аналитического скрининга, эффективный метод метаболомного профилирования должен покрывать большой набор метаболитов, которые присутствуют в любом биологическом образце [8]. Однако создание такого метода представляет собой методическую проблему, так как необходимо обеспечить покрытие столь разнообразных химических классов соединений, которые обнаруживаются в образце в крайне широком диапазоне концентраций — более 8 порядков. Отсутствие стандартизированных процедур отбора образцов, их последующего хранения, подготовки проб и контроля качества методик приводит к значительной погрешности при определении концентраций лабильных метаболитов [8].

Важнейшим этапом, занимающим до 80% времени работы химико-аналитической лаборатории, является подготовка биологических образцов для анализа. Принципиальная схема подготовки проб для профилирования приведена на рисунке 6.

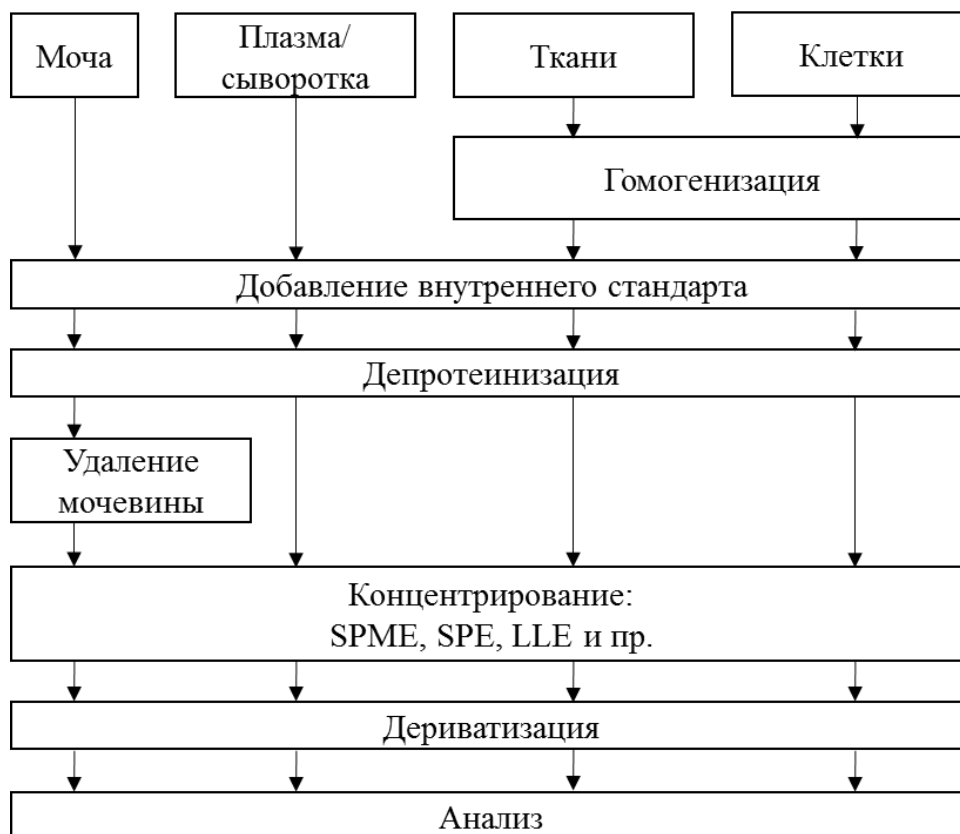


Рисунок 6 — Общая схема подготовки образцов для метаболического профилирования

Наиболее распространенный и общепринятый в данный момент метод подготовки образцов плазмы крови для ГХ-МС анализа включает три стадии: депротенинизацию, защиту оксо-групп метоксиамином и дериватизацию триметилсилильным агентом для повышения летучести [237] и повышения стабильности метаболитов [238]. Депротенинизация удаляет мешающие компоненты, в основном альбумин, типичная концентрация которого в крови составляет 34–50 г/л. После депротенинизации образцы высушивают, затем метоксимируют раствором CH_3ONH_2 в пиридине. Метоксимирование не только защищает оксо-группы, но, как следствие, подавляет кето-енольную таутомерию и образование различных ацеталей и кеталей, помогает уменьшить количество альдоз, но результатом метоксимирования является два различных стереоизомера: *син*- и *анти*-. Силилирование позволяет заменить подвижные атомы водорода в различных функциональных группах: гидроксильных (-OH), карбоксильных (-COOH), аминных (-NH₂), тиольных (-SH), и фосфатных (O=P(OH)_x). Аминогруппы, благодаря более низкой скорости образования силильных производных, могут образовывать несколько производных: с одной или двумя ТМС группами [239].

По сравнению с плазмой крови, моча имеет ряд преимуществ при использовании ее в качестве матрицы для метаболического профилирования: неинвазивность и практически неограниченный объем образцов. Зачастую именно легкость получения биологических образцов определяет выбор матрицы [240].

Использование органов и тканей в качестве матрицы для метаболического профилирования встречается достаточно часто в публикациях (см. таблицу 2), однако отсутствуют единые и общепринятые методы подготовки проб [8].

В таблице 2 приведен краткий обзор инструментальных методов и методов подготовки образцов для анализа, использованных при исследованиях механизмов токсичности химических соединений. Образцы разделены на группы: плазма или сыворотка крови, моча и различные образцы органов, тканей или клеточных культур. В таблице приведены краткие описания методов подготовки проб, использованные инструментальные методы и методы статистической обработки данных.

Перечень химических соединений приведен в таблице 1. В данном разделе рассмотрены методы подготовки образцов для нецелевого метаболического профилирования методами ГХ-МС и ВЭЖХ-МС, поэтому методы ЯМР, КЭ, ИК — не приведены в таблице, хотя в некоторых работах использовано сочетание методов, например, ГХ и ПМР [168].

В большинстве публикаций в качестве метода математической обработки данных были использованы PCA и PLS-DA, причем с помощью одного и того же ПО — SimcaP, случаи применения других ПО зачастую единичны, см. например EZinfo [180], MetaboAnalyst [182], XCMS

[174], IDEOM [187], MZmine [191] и LatentiX [190]. В редких случаях авторы указывали, что для оценки значимости обнаруженных маркеров использовали вычисление параметров важности переменных (VIP) или ROC-кривые, которые также позволяет вычислять ПО SimcaP.

Таблица 2 — Методы подготовки образцов для нецелевого метаболического профилирования методами ГХ-МС и ВЭЖХ-МС

Метод подготовки проб для анализа	Ссылка	Инструментальный метод	Метод математической обработки
1	2	3	4
Плазма или сыворотка крови			
Разделение образца плазмы крови на две фракции: 1. Полярная: анализ методом ВЭЖХ-МС в режиме МРМ. 2. Неполярная: ЖЖЭ, кислотный гидролиз неполярной фракции в метаноле, упаривание досуха, силилирование, анализ ГХ-МС.	[112]	GC-TOF ¹ , LC-MS/MS ²	PCA и PLS-DA (Simca P)
Аналогично предыдущему, но перед силилированием образцы неполярной фракции были обработаны метоксиамином.	[167,173,154, 178]	GC-TOF, LC-MS/MS	PCA и PLS-DA (Simca P)
Депротенизация плазмы крови метанолом, плазма/метанол: 1/5, экстракция хлороформом, упаривание досуха, метоксимирование и силилирование.	[168]	GC-TOF, NMR	PCA и PLS-DA (Simca P), OSC ³
Депротенизация плазмы крови ацетонитрилом.	[175]	LC-QTOF ⁴	PCA и PLS-DA, VIP, ROC, (Simca P)
	[162]	LC-QTOF	PCA(XCMS)
Депротенизация сыворотки крови метанолом.	[153,161,193]	LC-MS/MS	PCA и PLS-DA (Simca P)
Моча			
Депротенизация мочи после заморозки до -80 °С.	[180]	LC-QTOF	PCA и PLS-DA (EZinfo)
Депротенизация мочи метанолом.	[151]	LC-QTOF	PCA и PLS-DA, VIP, (Simca P)
Депротенизация мочи ацетонитрилом.	[172]	LC-QTOF	PCA и PLS-DA, VIP (Simca P)
Центрифугирование и разбавление водой.	[169,171]	LC-QTOF	PCA и PLS-DA, VIP, XCMS и (Simca P)
	[170]	LC-MS/MS	PCA
Центрифугирование.	[155]	LC-MS/MS	PCA и PLS-DA (XCMS)
ТФЭ, экстракция метанолом, упаривание досуха, перерастворение в ацетонитриле.	[159,160]	LC-QTOF	PLS-DA (Simca P)
Гидролиз уреазой, экстракция смесью хлороформ/метанол: 5/2, промывка орг. слоя водой, упаривание, метоксимирование и силилирование.	[198]	GC-TOF	PLS-DA (Simca P)
Образцы органов, тканей или клеточных культур			

Метод подготовки проб для анализа	Ссылка	Инструментальный метод	Метод математической обработки
1	2	3	4
Гомогенизация червей, экстракция фосфатным буфером, упаривание досуха, метоксимирование и силилирование.	[191]	GC-qMS ⁵	PCA (MZmine 2)
Экстракция из клеточных культур смесью метанол/хлороформ : 3/1, 3 цикла заморозки/разморозки при -196°C, затем отделение органической фазы, упаривание досуха, метоксимирование и силилирование.	[192]	GC-TOF	PCA и PLS-DA (Simca P)
Гомогенизация печени в смеси MeOH/H ₂ O и экстракция хлороформом.	[184]	FTICR-MS ⁶	PCA и PLS-DA (Simca P)
Гомогенизация печени, экстракция смесью вода/метанол: 1/1, упаривание, перерастворение.	[163]	LC-QTOF	PCA и PLS-DA, VIP (Simca P)
Гомогенизация печени, экстракция водой, депротеинизация ацетоном, центрифугирование, упаривание, метоксимирование и силилирование.	[194,164]	GC-qMS	PCA (Simca P)
Гомогенизация червей, экстракция смесью хлороформ/метанол: 1/2, упаривание, метоксимирование и силилирование. Вторую аликвоту метилировали BF ₃ /MeOH.	[186]	GC-qMS	PCA и PLS-DA, VIP (Simca P)
Экстракция тестикул метанолом, центрифугирование, упаривание, метоксимирование и силилирование.	[177]	GC-qMS	PLS-DA (Simca P)
Гомогенизация рыб и экстракция смесью хлороформ/метанол/вода: 2/5/2, упаривание, силилирование.	[179]	GC-qMS	PLS-DA (Simca P)
Экстракция из клеточных культур смесью хлороформ/метанол/вода: 1/1/0.9.	[200]	DIMS ⁷	PCA
Гомогенизация тканей рыб и экстракция метанолом	[182]	LC-MS/MS	PCA и PLS-DA (MetaboAnalyst)
Центрифугирование клеточных культур, высушивание досуха в вакууме и перерастворение в подвижной фазе	[174]	LC-QTOF	PLS-DA (XCMS)
Гомогенизация клеточных культур в этаноле, депротеинизация смесью CHCl ₃ , MeOH и H ₂ O.	[187]	LC-Orbitrap ⁸	PLS-DA (IDEOM)

Примечание: ¹-GC-TOF — газовая хроматография с времяпролетным масс-селективным анализатором; ² — LC-MS/MS высокоэффективная жидкостная хроматография с tandemным масс-селективным детектированием (низкого разрешения); ³ — OSC — коррекция ортогонального сигнала (ЯМР); ⁴ — LC-QTOF высокоэффективная жидкостная хроматография с системой из квадруполь и времяпролетного масс-анализатора в качестве детектора; ⁵ -GC-qMS — газовая хроматография с квадрупольным масс-анализатором (низкого разрешения); ⁶ -FTICR-MS — масс-спектрометр ион-циклотронного резонанса; ⁷ -DIMS — масс-спектрометрия прямого ввода; ⁸ — LC-Orbitrap — высокоэффективная жидкостная хроматография с орбитальной ионной ловушкой.

Для нормализации полученных хроматомасс-спектрометрических данных авторы использовали большой набор различных внутренних стандартов. Самым интересным примером является использование в качестве внутреннего стандарта смеси метиловых эфиров жирных кислот (FAME) [192].

Основной массив результатов, представленных в таблицах 1 и 2 получен при использовании ВЭЖХ-МС или ГХ-МС высокого разрешения, при этом ВЭЖХ-МС низкого разрешения с одним квадруполом была использована всего в одном исследовании [170], ВЭЖХ с системой трех квадруполов использовалась чаще.

В результате обзора работ по токсикометаболомике не удалось обнаружить примеров использования ГХ-МС низкого разрешения для метаболического профилирования образцов крови или мочи с целью установления механизмов действия токсичных соединений, хотя такие примеры известны для медицинских или фармацевтических целей [227,241]. Однако удалось обнаружить всего 5 случаев применения ГХ-МС низкого разрешения и только для метаболического профилирования образцов органов и тканей. Несмотря на это, метод ГХ-МС низкого разрешения обладает главным преимуществом перед другими методами метаболического профилирования — возможностью надежной идентификации аналитов, благодаря воспроизводимым масс-спектрам ионизации электронами, а также возможностью обращения к доступным базам масс-спектров и хроматографических параметров удерживания [242].

1.3.3. Математическая обработка результатов метаболического профилирования

Математический анализ полученных экспериментальных данных призван выявлять биомаркеры, являющиеся ответом на исследуемый негативный фактор, а не обусловленные иными процессами, в том числе случайными. Математическая обработка влияет на качество конечного результата и возможность последующей биологической интерпретации результатов [242].

Выявление биологических маркеров и метаболических ответов организма на различные воздействия можно выполнять двумя различными способами: первый способ в различных источниках называют формальным или "черным" (англ. soft — мягкий), второй способ называют содержательным или "белым" (англ. hard — жесткий). По мнению [248] термины soft и hard для характеристики методов моделирования следует заменить на "формальный" и "содержательный".

При использовании формальных моделей данные описываются эмпирической зависимостью, справедливой в ограниченном диапазоне экспериментальных данных. В этом случае отсутствует необходимость понимания механизма исследуемого процесса, однако такой метод не позволяет решать задачи экстраполяции. Параметры формальных моделей лишены физического смысла и интерпретируются только математическими методами.

Содержательное моделирование базируется на физико-химических принципах и позволяет интерпретировать поведение системы на новые условия. Параметры содержательной модели имеют смысл и могут помочь при интерпретации найденной зависимости. Однако этот метод применим только в том случае, когда модель известна априори.

Интерес к формальным методам моделирования обусловлен большими трудностями выбора и подтверждения правильности содержательной модели. Во многих случаях все сводится к простому перебору внутри короткого набора конкурирующих зависимостей. Однако такой подход не гарантирует правильности выбранного метода и может приводить к грубым ошибкам.

Формальные многофакторные линейные модели и надлежащие методы их анализа гораздо лучше приспособлены к учету "неидеальности" данных. Они работают и в тех случаях, когда ни о какой содержательной физико-химической модели не может быть и речи. Такой формальный подход накладывает некоторые условия на дизайн эксперимента. Общепринятый подход подразумевает формирование контрольных групп, по меньшей мере, двух: положительный и отрицательный контроль. Первая группа подвергается воздействию, вторая нет. Затем проводится сравнение результатов анализа биологических образцов и выявление отличий, которые и являются биомаркерами воздействия. В частном случае животные или добровольцы-испытуемые, составляющие две группы, могут быть одними и теми же, но разделенными во времени: до и после воздействия.

Развитие современных методов подготовки проб и масс-спектрометрического анализа в метаболомике позволяет генерировать большое число больших наборов данных, что приводит к необходимости улучшения подходов к анализу данных, в частности, предварительной обработке [243]. Ключевым требованием к методу обработки и анализа данных является способность различить подлинные биологические изменения и метаболические изменения от аналитических помех.

Общая схема математической обработки многомерных массивов ГХ- и ВЭЖХ-МС данных при метаболическом профилировании приведена на рисунке 7.



Рисунок 7 — Общая схема обработки данных при метаболическом профилировании

Обзор существующего программного обеспечения сделан в работе [242], хотя, стоит отметить, что большинство исследований, представленных в таблице для многофакторного анализа используют ПО SIMCA-P (Umetrics, Umea, Sweden).

Предварительная обработка данных (как на рисунке 7) состоит из следующих стадий:

- детектирование пиков на хроматограмме;
- отнесение пиков;
- интегрирование пиков;
- нормализация;
- многофакторный анализ.

Опционально в алгоритм предварительной обработки включают деконволюцию и многофакторный анализ. Надежное детектирование пиков и их сравнение между хроматограммами имеет решающее значение для выявления изменений концентраций метаболитов между различными образцами, а также для количественного определения метаболитов. Таким образом, первичная обработка данных как для ВЭЖХ-МС, так и для ГХ-МС концентрируется на выделении пиков метаболитов на фоне мешающих компонентов и артефактов, образующихся при подготовке образцов к анализу.

Основной трудностью при отнесении пиков является их количество: множество пиков, детектируемых в режиме ионизации электрораспылением, могут содержать изотопы, быть аддуктами (Na^+ , K^+ в режиме ESI^+ ; Cl^- в режиме ESI^-) или димерами. Детектирование пиков в условиях неполного хроматографического разделения осуществляется с помощью деконволюции, которая особенно часто используется при обработке результатов ГХ-МС анализа.

Соотнесение пиков на различных хроматограммах между собой в первую очередь затруднено из-за дрейфа времен удерживания в результате колебаний температуры, давления и подвижной фазы (состава и скоростей потока), изменений в стационарной фазе на хроматографической колонке (насыщение или деградация фазы), или изменения матричного эффекта образца, а также из-за изменений в составе образца, например, растворителя и соли [244]. Важно отметить, что использование UHPLC и колонок с размерами частиц менее 2 мкм позволяет снизить дрейф времен удерживания в ВЭЖХ и увеличить селективность хроматографического разделения.

Источники погрешности в ГХ-МС анализе при определении времен удерживания включают старение колонки, колебания температуры и изменения в стационарной фазе. Дрейф времен удерживания может быть устранен с помощью хроматографического выравнивания профиля, сравнения результатов детектирования пиков после обнаружения или автоматической коррекции времени удерживания. Снижение дрейфа времен удерживания имеет решающее значение для нецелевого метаболического профилирования.

Следующим этапом предварительной обработки данных является их нормализация. Нормализация позволяет избежать нежелательных изменений в интенсивностях пиков между образцами, производить количественное сравнение компонентов метаболических профилей между образцами, и тем самым уменьшить систематическую ошибку. Систематические ошибки могут быть связаны с загрязнением источника ионов, деградацией колонки или образца.

Нормализация может быть выполнена различным образом:

1. С помощью добавления одного или нескольких внутренних стандартов в образец до экстракции или внешнего стандарта после экстракции.
2. С помощью статистических моделей для получения оптимальных коэффициентов масштабирования для каждого образца, основанного на наборе данных, например, нормализация на единицу интенсивности нормы или медианы [245,246] или с помощью метода максимального правдоподобия [247].

Результатом предварительной обработки хроматомасс-спектрометрических данных является большая матрица, состоящая из N (образцов) \times K (переменных), причем N в основном является малым по сравнению с K : как правило, от десятков до сотен образцов против тысяч концентраций метаболитов (переменных). Переменные представляют собой количественные характеристики обнаруженных компонентов (нормализованная площадь пика, интенсивность и пр.).

Для выделения полезной информации из такого большого набора первичных данных необходимо использовать методы сжатия данных [248]. Идея состоит в том, чтобы представить исходные данные, используя новые скрытые переменные. При этом, во-первых, число новых переменных должно быть существенно меньше, чем число исходных переменных и, во-вторых, потери от такого сжатия должны быть сопоставимы с шумом в данных. Методы сжатия многомерных данных позволяют представить полезную информацию в более компактном виде, удобном для визуализации и интерпретации. Это увеличивает возможность обнаружения значимой информации в данных и облегчает обнаружение "выбросов".

Методы факторного анализа, как правило, делятся на методы без обучения и методы с обучением [248]. Методы без обучения используются для анализа данных без каких-либо априорной информации, касающейся выборочных групп/классов и, следовательно, представляют собой хороший способ выявления групп или кластеров в данных.

Типичные методы сжатия данных без обучения, применяемые к метаболическим данным, включают анализ главных компонент (англ. PCA — principal component analysis) [249,250,251], являющийся основой для других аналогичных методов, включая эволюционный факторный анализ (EFA) [252], оконный факторный анализ (WFA) [253], итерационный целевой факторный анализ (ITTFA) [254], независимого анализа компонент (ICA), также для многих методов классификации, например, формального независимого моделирования аналогий классов (SIMCA) [255]. Наряду с PCA применяют многомерное шкалирование (MDS), иерархическую кластеризацию, средства кластеризации и самоорганизующихся карт (SOM) [248].

С математической точки зрения метод главных компонент — это декомпозиция исходной двухмерной матрицы X , т.е. представление ее в виде произведения двух двухмерных матриц T и P (см. формулу 1):

$$X = TP^t + E = \sum_{a=1}^A t_a p_a^t + E, \quad (1)$$

где T — матрица счетов; P — матрица нагрузок; E — матрица остатков.

При исследовании данных методом PCA особое внимание уделяется графикам счетов и нагрузок. Пример графика счетов и нагрузок, построенный методом PCA, приведен на рисунке 8.

Счета и нагрузки несут в себе информацию, полезную для понимания того, как устроены данные. На графике счетов каждый образец изображается в координатах t_1 и t_2 (старшие главные компоненты ГК1 и ГК2) или в координатах младших компонент t_3 , t_4 и пр. Близость двух точек означает их схожесть, т.е. положительную корреляцию. Точки, расположенные под прямым углом, являются некоррелированными, а расположенные диаметрально противоположно — имеют отрицательную корреляцию. График нагрузок используется для исследования роли переменных.

На графике нагрузок каждый образец изображается в координатах p_1 и p_2 . Анализ графика нагрузок дает данные о том, какие переменные коррелируют друг с другом. Так, например, из анализа графика нагрузок на рисунке 8 справа можно сделать вывод о том, что метаболиты M2 и M3 присутствуют в более высоких концентрациях в группе образцов G1, а метаболит M1 в группе образцов G2 [242].

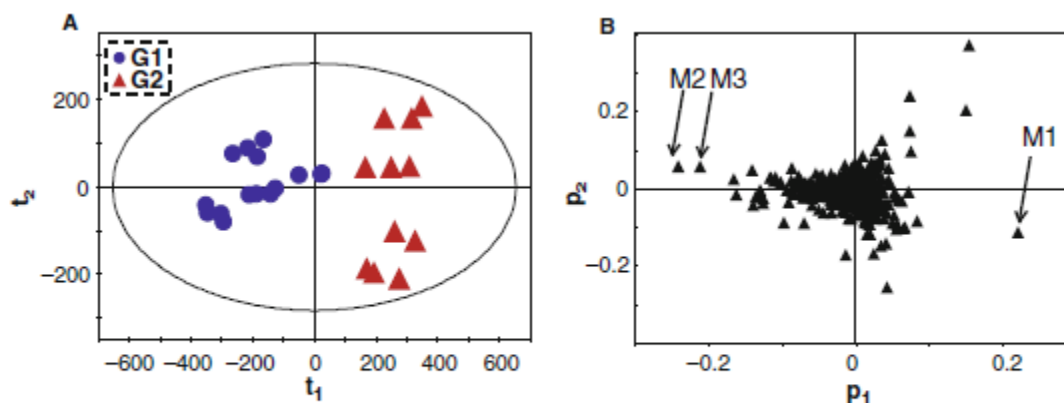


Рисунок 8 — Пример графика счетов (слева) и нагрузок (справа), построенный методом PCA [242]

На рисунке 9 приведен пример исключения "выброса" из исходного набора данных с помощью метода PCA. В дальнейшем результаты анализа этой пробы должны быть исключены из рассмотрения.

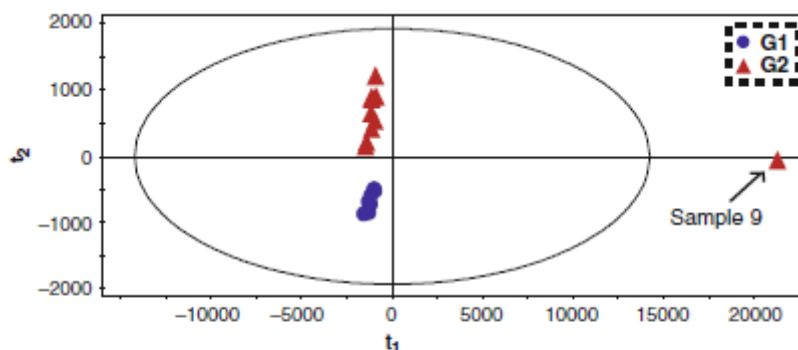


Рисунок 9 — Исключение выбросов с помощью метода PCA [242]

При анализе больших партий образцов с использованием ГХ-МС и ВЭЖХ-МС наблюдаемые различия между первым и последним образцом могут быть связаны с изменениями условий проведения анализа (деградация колонки, загрязнение ионного источника и пр.) или изменениями состава образца с течением времени. Для оперативного контроля качества можно использовать специально приготовленные пулированные образцы (QC) (см. рисунок 10) [256,257], которые позволяют провести проверку распределения точек на графике счетов в соответствии с порядком ввода образца в хроматографическую систему. Для этого образец QC периодически вводят в хроматографическую систему (как правило, каждые 6-10 анализов). На графике счетов

точки, соответствующие профилям пулированных образцов, должны быть плотно сгруппированы (рисунок 10 слева). Наблюдаемый дрейф при последовательном вводе QC в систему свидетельствует об изменениях в хроматографической системе, масс-спектрометре или составе образца (рисунок 10 справа).

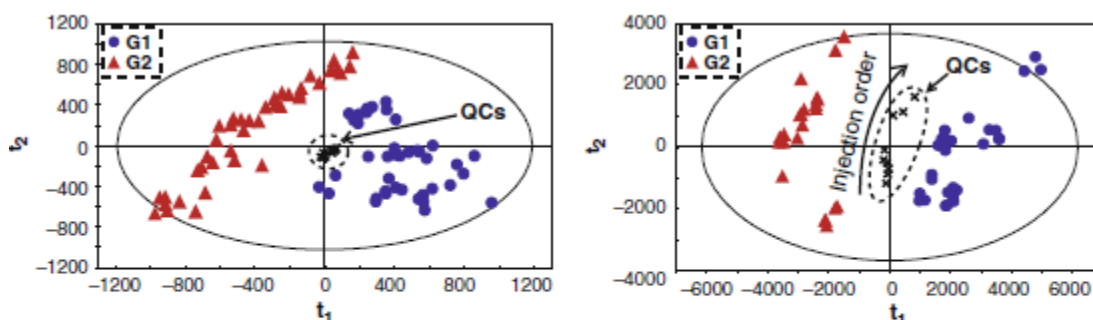


Рисунок 10 — Использование контрольных образцов (QC) для оперативного контроля качества выполнения измерений [242]

PCA — отличная отправная точка для анализа структуры многомерных данных. В случае четкого разделения метаболических профилей по группам, как на рисунке 8, не требуется применения дополнительных методов анализа, включающих в себя отнесение образца к соответствующей контрольной группе *a priori*. Однако направление наибольшего распределения в данных, выявленное методом PCA, не всегда совпадает с направлением наибольшей разницы между группами [242]. Для выявления различий в таких, более сложных данных, применяют дискриминационные методы с обучением: PLS-DA и OPLS-DA, которые включают в себя отнесение образца к заданному классу (контрольной группе).

Методы с обучением, наиболее часто применяемые для обработки результатов метаболического профилирования, включают в себя линейную регрессию (PLS) [258], ортогональные проекции на латентные структуры OPLS [259], дискриминантный анализ с помощью регрессии на латентные структуры (PLS-DA) [214,228,260,261], случайные леса, метод опорных векторов (SVM) и классификация по k ближайшим соседям (kNN). Выбор некоторых методов по сравнению с другими зависит от цели анализа и от типа исходных данных. Результатом исследования должны быть выявленные возможные различия между группами животных с точки зрения метаболических профилей и обнаружить биомаркеры токсических эффектов.

Метод PLS-DA основан на методе PLS — проекции на латентные структуры, и представляет собой регрессионный вариант PCA. PLS моделирует взаимосвязь между таблицей данных X и матрицей откликов Y . При обработке данных метаболического профилирования в таблице X содержатся относительные площади хроматографических пиков метаболитов, в таблице Y — отнесение образцов к группе. В то время как PCA — это проекция максимальной вариации данных в таблице X , метод PLS выявляет максимальную ковариацию между X и Y . Анализ графиков

счетов и нагрузок, построенных методом PLS-DA, аналогичен методу PCA приведенному ранее [242].

Модификация метода PLS, называемая OPLS (ортогональные проекции на латентные структуры) позволяет выявлять структуры в еще более сложных данных за счет разделения вариаций данных в таблице X на часть, которая коррелирует с матрицей Y и на часть, которая ей ортогональна.

На рисунке 11 приведено сравнение графиков счетов, полученных различными способами из одного набора данных. Все математические модели, полученные методами PCA или PLS-DA, необходимо подвергать кросс-валидации [186] для оценки статистической значимости модели. Кросс-валидация представляет собой процедуру, при которой рассматриваемая модель последовательно перестраивается каждый раз с использованием только части (например, 6/7, 1/10 и т.д.) данных в качестве обучающей выборки. Полученная промежуточная модель затем используется для прогнозирования класса оставшихся данных, который служит в качестве тест-набора.

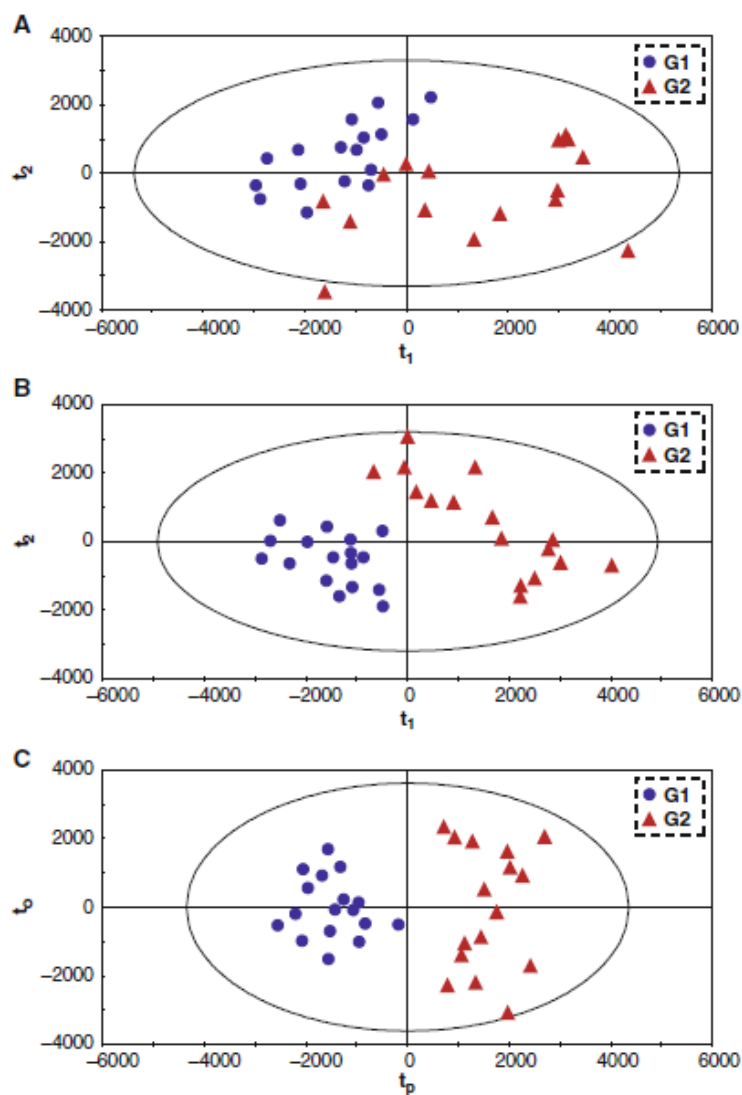


Рисунок 11 — Графики счетов, полученные из одного набора данных различными способами: PCA (вверху), PLS-DA (посередине) и OPLS-DA (внизу) [242]

Перекрестная проверка используется для вычисления доли наблюдаемой вариации в X- и Y-матрицах, объясняемых моделью (Q^2), доли суммы квадратов X-матрицы и Y-матрицы, объясняемых моделью и (R^2X и R^2Y , соответственно). Эти значения могут изменяться в диапазоне от 0 до 1, и являются показателем того, насколько хорошо конкретная модель описывает вариации в исходных данных. Как правило, надежная модель имеет $R^2 > 0.5$ и $Q^2 > 0.4$, в то время как оценка между 0.7 и 1.0 показывает, что модель является высоконадежной [262].

Кросс-валидация позволяет вычислить погрешность вычисления коэффициентов в модели для определения вклада в модель каждого коэффициента. На основании вычисленных вкладов коэффициентов затем могут быть вычислены параметры важности переменных (VIP), позволяющие оценить вклад переменных в модель.

Результатом многофакторного анализа является математическая модель, которая позволяет находить зависимости в сложных многомерных данных, полученных при нецелевом метаболическом профилировании. Модель позволяет выявить взаимосвязи между группами образцов или концентрациями метаболитов, производить отнесение неизвестных образцов к группе, находить различия между группами и, в конечном итоге, выявлять биомаркеры.

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Расширенный токсиколого-аналитический скрининг

В результате выполнения данной работы был усовершенствован метод расширенного токсиколого-аналитического скрининга токсичных химических соединений в крови и моче человека с использованием сочетания газовой хроматомасс-спектрометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-селективным детектированием высокого разрешения. Метод включает в себя методики определения легколетучих органических соединений в паровой фазе над образцом, средне- и условно летучих соединений в экстрактах после предварительной дериватизации, а также нелетучих органических соединений методом жидкостной хроматографии. Наряду с методиками подготовки проб для анализа, методиками анализа, метод также включает в себя рекомендации по безэтальной идентификации токсичных химических соединений с использованием электронных баз аналитических характеристик. Результатом внедрения метода явилась "Стандартная процедура идентификации токсичных и сильнодействующих соединений в биологических пробах методами газовой и жидкостной хромато-масс-спектрометрии", включенная в методические рекомендации "Процедура проведения количественного хромато-масс-спектрометрического анализа токсичных и сильнодействующих веществ в биологических объектах" (МР ФМБА России 4.1.23-2014) [263].

Особенностями используемого подхода является обнаружение и идентификация легколетучих соединений при парофазном анализе, а также оптимизированные методы дериватизации

аналитов для повышения возможностей их идентификации без использования стандартных соединений, а общее количество соединений, которые могут быть идентифицированы, составляет несколько тысяч. Ключевым моментом скрининга является совмещение высокой производительности за счет автоматизированной обработки и интерпретации результатов ГХ-МС анализа и надежности за счет снижения вероятности ошибок, как первого, так и второго рода.

На рисунке 12 приведена общая схема химико-токсикологического анализа в режиме расширенного токсикологического скрининга. Рекомендации по отбору, транспортировке и хранению биологических проб для проведения химико-токсикологических исследований не приведены в данной работе.

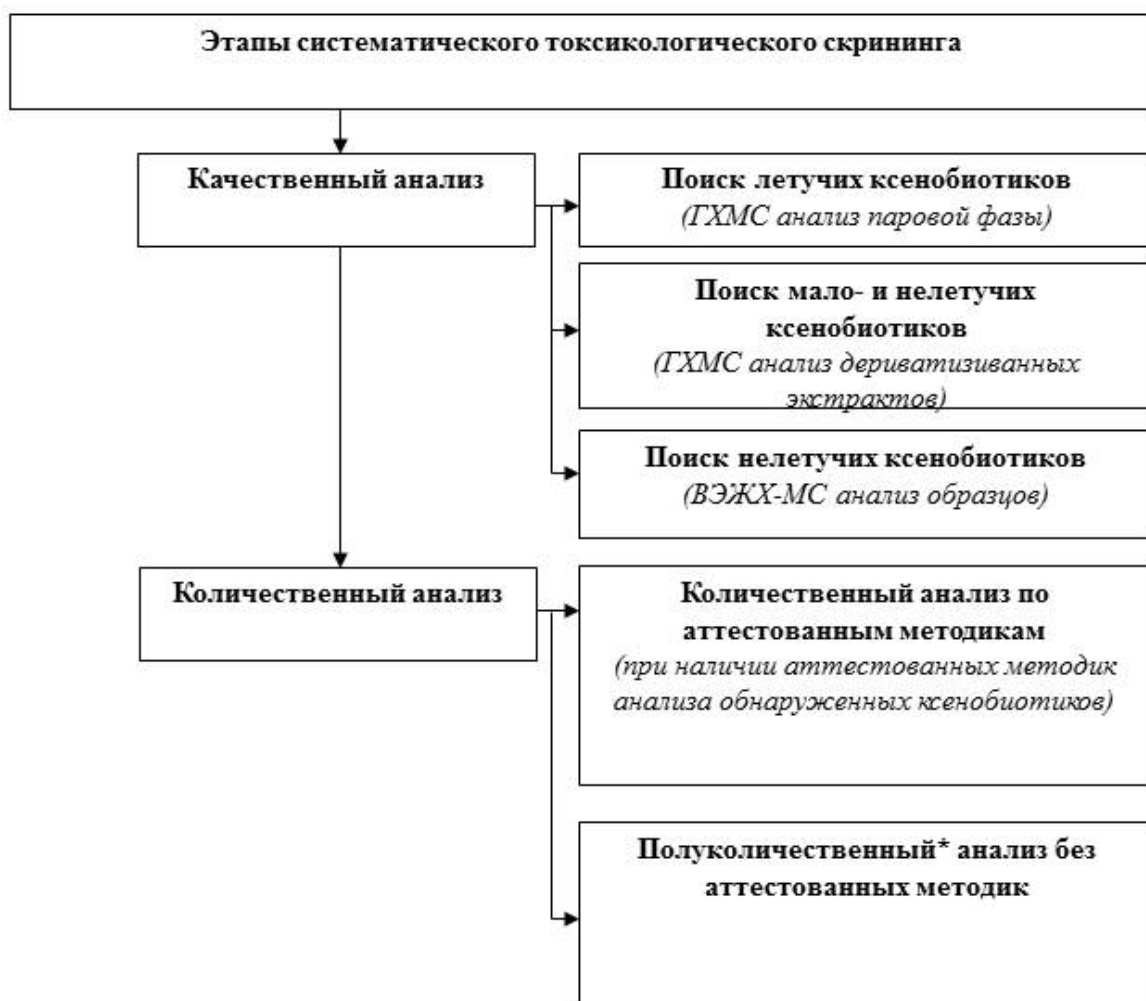


Рисунок 12 — Общая схема химико-токсикологического анализа

Для проведения скринингового исследования необходимый объем пробы крови составляет не менее 5 мл цельной крови или 2.5 мл плазмы крови (1 мл для анализа паровой фазы, 1 мл для получения экстрактов и 0.3 мл для ВЭЖХ-МС/МС анализа). Объем пробы мочи должен составлять не менее 5 мл.

Пробу соответствующим образом аликвотируют и анализируют различными методами:

- идентификацию органических соединений в виде производных проводят по методике, описанной в пунктах 2.1.1 — подготовка проб крови, 2.1.2 — подготовка проб мочи для анализа и 2.1.3 — дериватизация аналитов;

- идентификацию летучих органических соединений проводят по методике, описанной в пункте 2.1.4;

- обработку результатов скрининга проводят в соответствии с п. 2.1.5;

- проведение идентификации и подтверждения с помощью ГХ-МС/МС или ВЭЖХ-МС высокого разрешения проводят в соответствии с пп. 2.1.6 и 2.1.7, соответственно.

2.1.1. Подготовка образцов крови для расширенного токсиколого-аналитического скрининга

На рисунке 13 приведена принципиальная схема расширенного токсикологического скрининга, которая была использована при определении ксенобиотиков в образцах крови.

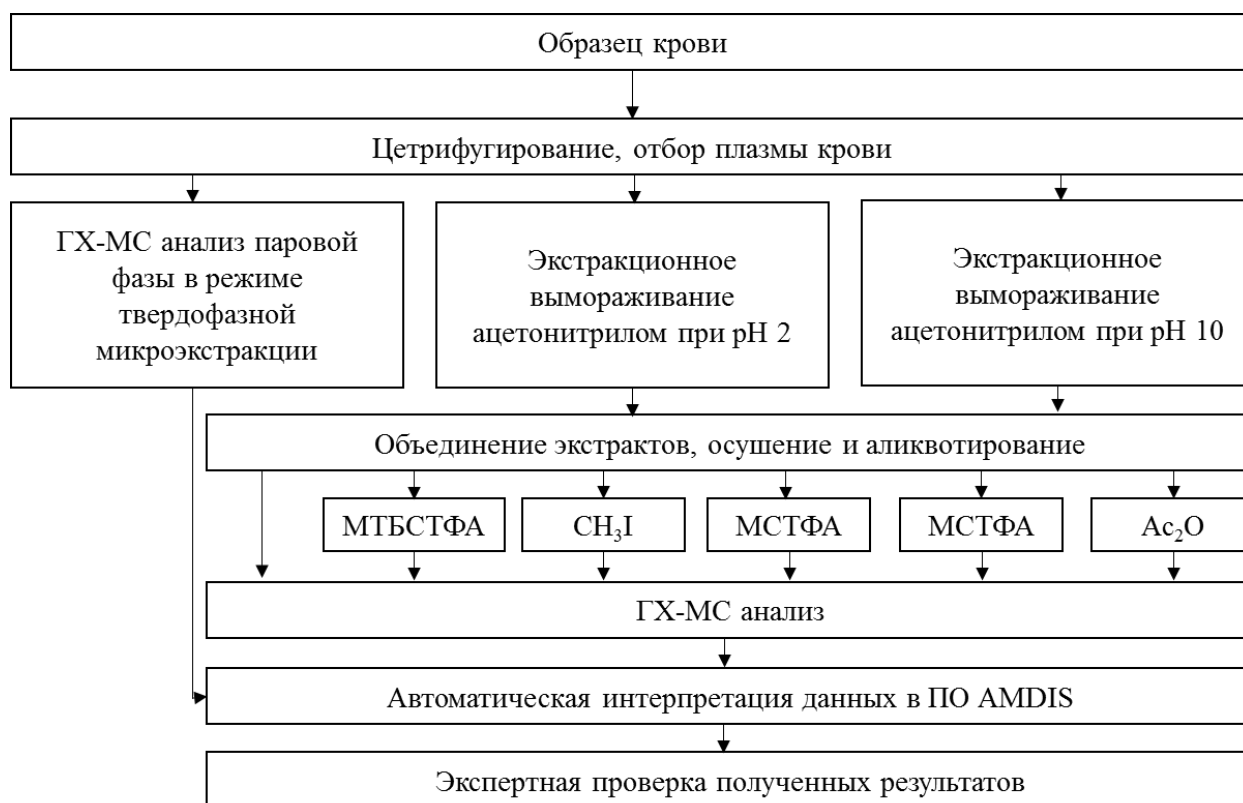


Рисунок 13 — Общая схема токсиколого-аналитического скрининга биологического образца крови методом ГХ-МС. После жидкость-жидкостной экстракции при разных значениях pH, полученные экстракты объединяются

Плазму из цельной крови получали центрифугированием при 4000G в течение 15 минут, после чего отбирали верхний слой. Так как, в основном, конъюгаты ксенобиотиков с глюкуроновой кислотой присутствуют в крови в крайне малых количествах, их ферментативный гидролиз в крови не требуется.

Пробы плазмы объемом 1 мл подкисляли 0.6 мл 6N HCl и обрабатывали 3 мл ацетонитрила в режиме экстракционного вымораживания (выдерживали в течение одного часа в криотермостате при температуре -20°C). Верхний слой отделяли от замороженного водного остатка декантацией. Водный остаток размораживали и обрабатывали 2 мл диэтилового эфира. Водный остаток подщелачивали 1.2 мл 10% KOH и вновь последовательно обрабатывали ацетонитрилом и эфиром в режиме экстракционного вымораживания. Четыре органических экстракта объединяли, пропускали через воронку с 0.5 г безводного сульфата натрия и делили на 6 аликвотных частей. Каждую аликвотную часть упаривали в виале с коническим дном досуха в токе азота. Одну аликвотную часть разбавляли 50 мкл ацетонитрила и вводили в инжектор газового хроматографа без дериватизации.

Дериватизацию *N*-(*трет*-бутилдиметилсилил)-*N*-метилтрифторацетамидом (ТБДМС), йодистым метилом (CH₃I), *N*-метил-*N*-триметилсилилтрифтор-ацетамидом (МСТФА), 1-(трифторацетил)имидазолом (ТФА) или *N*-метил-*бис*-трифторацетамидом (МБТФА) и уксусным ангидридом выполняли согласно процедуре, приведенной в п. 2.1.3.

2.1.2. Подготовка образцов мочи для расширенного токсиколого-аналитического скрининга

На рисунке 14 приведена схема подготовки образцов мочи для проведения расширенного токсикологического скрининга.

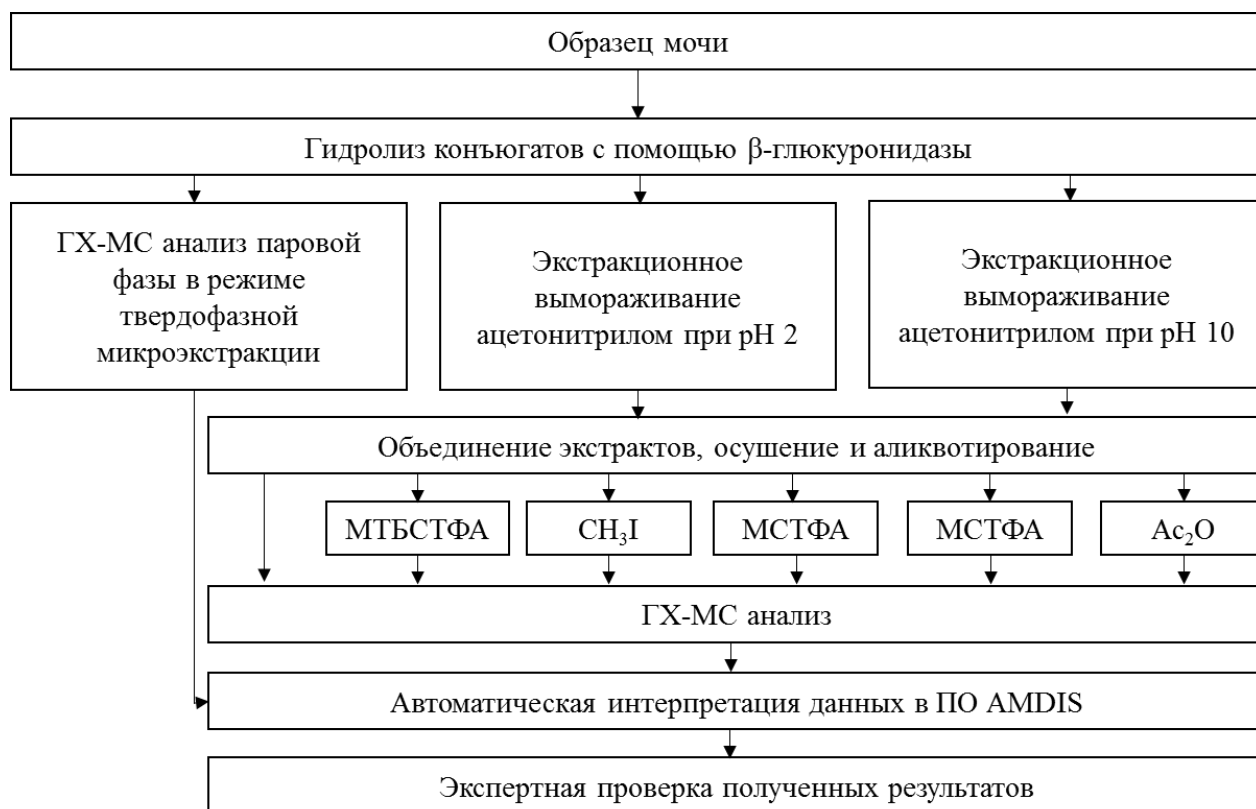


Рисунок 14 — Общая схема токсиколого-аналитического скрининга биологического образца мочи методом ГХ-МС. После жидкость-жидкостной экстракции при разных значениях pH, полученные экстракты объединяются

Гидролиз конъюгатов в образцах мочи проводили следующим образом: в хроматографическую виалу объемом 15 мл, содержащую 4 мл мочи, добавляли 1 мл фосфатного буфера (рН 6.5) и 0.05 мл β -глюкуронидазы *E. coli*, затем выдерживали при температуре 55°C в течение одного часа. Пробу охлаждали до комнатной температуры.

Образцы мочи после гидролиза подкисляли 0.6 мл 6N HCl и обрабатывали 3 мл ацетонитрила в режиме экстракционного вымораживания (выдерживали в течение одного часа в криотермостате при температуре минус 20°C). Верхний слой отделяли от замороженного водного остатка декантацией. Водный остаток размораживали и обрабатывали 2 мл диэтилового эфира, как указано выше. Водный остаток подщелачивали 1.2 мл 10% КОН и вновь последовательно обрабатывали ацетонитрилом и эфиром в режиме экстракционного вымораживания.

Четыре органических экстракта объединяли, пропускали через воронку с 0.5 г безводного сульфата натрия и делили на 6 аликвотных частей. Каждую аликвотную часть упаривали досуха в виале с коническим дном в токе азота. Одну аликвотную часть разбавляли 50 мкл ацетонитрила и вводили в инжектор газового хроматографа без дериватизации. Дериватизацию ТБДМС, СН₃I, МСТФА, ТФА или МБТФА и уксусным ангидридом выполняли согласно процедуре, приведенной в п. 2.1.3.

2.1.3. Дериватизация и ГХ-МС анализ экстрактов из крови и мочи

Дериватизация N-(трет-бутилдиметилсилил)-N-метилтрифторацетамидом.

Данный дериватирующий агент присоединяет трет-бутилдиметилсилильную группу вместо активного атома водорода (в аминах первичных и вторичных, спиртах, кислотах, в том числе аминокислотах). Дериватизацию проводили следующим образом: к остатку образца в виале после отдувки растворителя добавляли 50 мкл ТБДМС, герметично закрывали и выдерживали в нагревателе при 70°C в течение 30 минут. 1 мкл полученного раствора вводили в инжектор газового хроматографа.

Дериватизация йодистым метилом.

Данный дериватирующий агент присоединяет метильную группу вместо активного атома водорода (в аминах первичных и вторичных, спиртах и кислотах), особенно эффективен для дериватизации карбоновых кислот.

Дериватизацию проводили следующим образом: остаток образца в виале после отдувки растворителя перерастворяли в 50 мкл метанола, добавляли 50 мкл йодистого метила, герметично закрывали и выдерживали в нагревателе при 70°C в течение 30 минут. 1 мкл полученного раствора вводили в инжектор газового хроматографа.

Дериватизация N-метил-N-триметилсилилтрифторацетамидом.

Данный дериватирующий агент присоединяет триметилсилильную группу вместо активного атома водорода (в аминах первичных и вторичных, спиртах и кислотах). Одновременное использование МСТФА и ТБДМС объясняется стремлением к наиболее полному использованию баз данных, так как для ряда соединений известен только один вид производных. Дериватизацию проводили следующим образом: к остатку образца в виале после отдувки растворителя добавляли 50 мкл МСТФА, герметично закрывали и выдерживали в нагревателе при 70°C в течение 30 минут. 1 мкл полученного раствора вводили в инжектор газового хроматографа.

Дериватизация 1-(трифторацетил)имидазолом.

Данный дериватирующий агент присоединяет трифторацетильную группу вместо активного атома водорода (в аминах первичных и вторичных, а также спиртах), особенно эффективен для дериватизации первичных и вторичных аминов. Дериватизацию проводили следующим образом: остаток образца в виале после отдувки растворителя перерастворяли в 50 мкл пиридина, и добавляли 50 мкл ТФА, герметично закрывали и выдерживали в нагревателе при 70°C в течение 30 минут. 1 мкл полученного раствора вводили в инжектор газового хроматографа.

Таблица 3 — Условия ГХ-МС анализа дериватизированных экстрактов

Условия анализа	Характеристики
Газ-носитель	Гелий газообразный высокой чистоты марки 6.0, объемная доля гелия не менее 99.9999 % об.
Режим ввода пробы	Объем пробы 1 мкл, без деления потока (1 мин), под давлением 69 кПа
Температурный режим термостата колонки	1 мин при температуре 70 °С, затем подъем до 280 °С со скоростью 10 °С/мин, 30 минут при конечной температуре.
Температура инжектора	250 °С
Объемная скорость газаносителя через колонку	1 мл/мин
Режим работы масс-спектрометра	Ионизация электронами с энергией 70 эВ. Температура источника ионов: 200 °С. Температура интерфейса: 270 °С. Масс-селективное детектирование в режиме сканирования по полному ионному току в диапазоне m/z от 40 до 600.

Дериватизация уксусным ангидридом.

Данный дериватирующий агент присоединяет ацетильную группу вместо активного атома водорода (в аминах первичных и вторичных, а также спиртах), особенно эффективен для дериватизации первичных и вторичных аминов. Одновременное использование 1-(трифторацетил)имидазола и уксусного ангидрида объясняется стремлением к наиболее полному использованию баз данных, так как для ряда соединений известен только какой-то один вид производных. Дериватизацию проводили следующим образом: остаток образца в виале после отдувки растворителя перерастворяли в 10 мкл пиридина, добавляли 10 мкл уксусного ангидрида, герметично закрывали и выдерживали в нагревателе при 70°C в течение 30 минут. 1 мкл полученного раствора вводили в инжектор газового хроматографа.

Все дериватизированные образцы (за исключением ТМС-производных) рекомендуется хранить не более суток в морозильной камере при температуре не выше минус 20°C. Экстракт, дериватизированный МСТФА, не рекомендуется хранить более 4-5 часов ввиду неустойчивости производных.

Условия хроматографического разделения и масс-спектрометрического определения: хроматомасс-спектрометр Shimadzu QP2010plus (или аналогичный с квадрупольным масс-анализатором) с капиллярной колонкой с неподвижной фазой HP5-MS30 м x 0.25 мм x 0.25 мкм (или аналогичной с полидиметилсилоксановой неподвижной фазой с содержанием фенильных групп от 0 до 5%). Условия хроматомасс-спектрометрического анализа приведены в таблице 3. Начало регистрации зависит от используемого дериватизирующего агента и составляет от 4 до 9 минут.

2.1.4. Анализ паровой фазы над образцами крови и мочи

Анализ паровой фазы над образцом крови или мочи предназначен для выявления летучих органических соединений с молекулярной массой до ~200 а.е.м. и температурой кипения, не превышающей 170 °С.

Газовый хроматограф — масс-спектрометр Shimadzu QP2010 (или аналогичный с квадрупольным масс-анализатором), оборудованный капиллярной колонкой с неподвижной фазой HP1-MS 60 м x 0.25 мм x 0.25 мкм (или аналогичной с полидиметилсилоксановой неподвижной фазой длиной не менее 60 м). Условия хроматомасс-спектрометрического анализа приведены в табл. 4. Таблица 4 — Условия ГХ-МС анализа паровой фазы

Условия анализа	Характеристики
Газ-носитель	Гелий газообразный высокой чистоты марки 6.0, объемная доля гелия не менее 99.9999 % об.
Режим ввода пробы	Объем пробы 1 мкл, без деления потока (1 мин), под давлением 69 кПа
Температурный режим термостата колонки	3 мин при температуре 40°C, затем подъем до 55°C со скоростью 5°C/мин, затем до 220 °C со скоростью 10°C/мин, 20 минут при конечной температуре.
Температура инжектора	250 °C
Объемная скорость газаносителя через колонку	1 мл/мин
Режим работы масс-спектрометра	Ионизация электронами с энергией 70 эВ. Температура источника ионов: 200°C. Температура интерфейса: 270°C. Масс-селективное детектирование в режиме сканирования по полному ионному току в диапазоне m/z от 40 до 600.

Парофазный анализ проводили следующим образом: в хроматографическую виалу для парофазного анализа объемом 4 мл вносили 1 мл крови или 3 мл мочи. Пробу термостатировали в течение 60 минут при 40°C при постоянном перемешивании с использованием магнитной ме-

шалки или агитатора. Отбор пробы производили на микроволокно 85 μm Carboxen/PDMS из равновесного пара в течение 60 минут при постоянном перемешивании пробы и при 40 °С. Термодесорбцию сорбированных аналитов проводили в горячем инжекторе хроматографа в течение 1 минуты.

2.1.5. Обработка результатов скрининга

Анализ полученных масс-хроматограмм проводили в режиме автоматической интерпретации с помощью ПО AMDIS 2.66 [264] с подключенными библиотеками масс-спектров NIST14 [265,266], PMW [267], Wiley [268]. Для расчета газохроматографических индексов удерживания были использованы *n*-алканы C₆–C₄₄ (Supelco, кат № 500631). Индексы удерживания определяли в автоматическом режиме с помощью ПО AMDIS. Стоит отметить, что для повышения надежности расчета ИУ требуется, чтобы концентрация алканов была минимальной и составляла примерно 10 нг на колонку (10 мкг/мл). Условия анализа должны быть полностью идентичны рабочим. Процедуру регистрации рекомендуется повторять каждый день до анализа. Смесь может быть также подготовлена вручную, главное требование — чтобы смесь содержала *n*-алканы, равномерно перекрывающие область времен удерживания анализируемых компонентов. Расчет ИУ производится автоматически ПО AMDIS 2.66.

В общем виде интерпретация полученных результатов включает в себя следующие стадии [263]:

1. Регистрация масс-хроматограммы с помощью программно-аппаратного комплекса.
2. Деконволюция полученной масс-хроматограммы с помощью ПО AMDIS, выделение и регистрация присутствующих пиков компонентов масс-хроматограммы.
3. Автоматическая идентификация соединений с помощью подключенной библиотеки NIST/EPA/NIH, Pflieger-Mauger-Weber, или иных БД в зависимости от имеющейся информации об образце.
4. Отнесение соединений к фоновым, мешающим или биогенным
5. Выделение неидентифицированных соединений.
6. Целевой количественный анализ и подтверждение наличия соединений, выявленных при автоматической идентификации.
7. Представление неидентифицированных соединений в виде масс-спектра и индекса удерживания.

Настройки идентификации, деконволюции и учета ИУ должны быть подобраны, таким образом, чтобы программа выдавала несколько положительных ответов в отчете, даже при заведомо "чистой" пробе (см. рисунок 15).

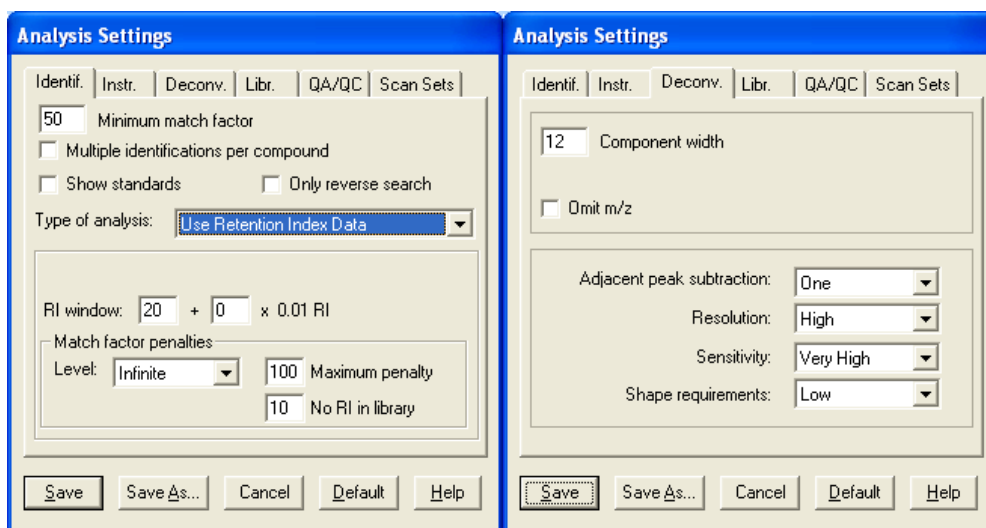


Рисунок 15 — Вкладки Identif. (слева) и Deconv. (справа)

Поскольку набор соединений, обнаруживаемых при анализе в моче или крови человека, всегда приблизительно одинаков, то составление перечня соединений, встречающихся в образцах, увеличивает вероятность исключения ложных ответов за счет отнесения обнаруженного соединения к биогенным. Такая задача успешно решена при составлении оптимизированных баз хроматомасс-спектрометрических данных компонентов метаболических профилей (см. раздел 3.5).

2.1.6. Подтверждающий ГХ-МС/МС анализ

Анализ экстрактов из образцов крови и мочи, приготовленных по процедуре, приведенной в пп. 2.1.1-2.1.3, выполняли для подтверждения положительных результатов на содержание ксенобиотиков с использованием тандемного хроматомасс-спектрометра Agilent QQQ 7000 [51].

Условия регистрации масс-спектров целевых соединений (см. п. 3.1) в режиме мониторинга множественных реакций (ММР) приведены в таблице 5.

Таблица 5 — Условия подтверждающего ГХ-МС/МС анализа.

Условия анализа	Характеристики
Газ-носитель	Гелий газообразный высокой чистоты марки 6.0, объемная доля гелия не менее 99.9999 % об.
Режим ввода пробы	Объем пробы 1 мкл, без деления потока (1 мин), под давлением 69 кПа
Температурный режим термостата колонки	1 мин при температуре 70°C, затем подъем до 280°C со скоростью 10 °C/мин, затем 30 минут при конечной температуре.
Температура инжектора	250°C
Объемная скорость газа-носителя через колонку	1 мл/мин
Режим работы масс-спектрометра	Ионизация электронами с энергией 70 эВ. Температура источника ионов: 280°C. Температура интерфейса: 280°C. Масс-селективное детектирование в режиме мониторинга множественных реакций: диазепам 256 → 221, нордиазепам 342 → 269, темазепам 357 → 283, оксазепам 430 → 341, трамадол 245 → 216. Энергия коллизии 20 В.

2.1.7. Подтверждающий ВЭЖХ-МС/МС анализ

Подтверждающий анализ экстрактов методом ВЭЖХ-МС/МС проводили следующим образом: 1 мл образца мочи центрифугировали на центрифуге Eppendorf при 13000 об мин⁻¹ в течение 5 мин, затем из супернатанта отбирали аликвоту 0.5 мл и разводили дистиллированной водой до 1.5 мл, затем раствор переносили в виалу вместимостью 2 мл [51].

Условия хроматографического анализа: жидкостный хроматограф Accela (Thermo, США) с масс-спектрометрическим детектором LTQ Orbitrap Velos (Thermo, США) с орбитальной ионной ловушкой. Хроматограф с колонкой Zorbax SB-C18 — 4.6 × 150 мм × 1.8 мкм:

- объемная скорость подвижной фазы через колонку 0.4 млмин⁻¹;
- температура термостата колонки 35 °С;
- объем вводимой пробы 10 мкл;
- состав подвижной фазы:
компонент А — 0.1% раствор муравьиной кислоты (НСООН) в воде,
компонент Б — ацетонитрил + 0.1 % НСООН (Фаза Б);
- режим элюирования — градиент: 5% Б (0 – 1.5мин), от 5% до 90%Б (1.5 — 10мин), 90% Б (10 — 11мин), 5%Б (11 — 17мин).

Условия работы масс-селективного детектора (электроспрей в режиме положительной ионизации):

- температура газа-осушителя 380°С, давление на распылителе 35 psig, напряжение на капилляре 3 кВ, температура капилляра 400°С. Разрешение: R=60000;
- детектирование в режиме сканирования по полному ионному току (SCAN): регистрация ионов в диапазоне m/z от 70 до 1000 на протяжении всего анализа.

2.2. Определение метаболитов алифатических углеводов C₆-C₁₀ в плазме крови методом ГХ-МС и ВЭЖХ-МС

ГХ-МС анализ экстрактов из образцов плазмы крови

Анализ экстрактов из образцов плазмы крови выполняли с использованием газового хроматомасс-спектрометра ShimadzuQP2010plus, оборудованного капиллярной колонкой HP-5MS, 30 м × 250 мкм × 0.25 мкм, а также жидкостного хроматографа Accela (Thermo, США) с масс-спектрометрическим детектором LTQ Orbitrap Velos (Thermo, США) с орбитальной ионной ловушкой, оборудованного колонкой Zorbax SB-C18 — 4.6 мм × 150 мм × 1.8 мкм [316].

Образцы плазмы крови от одной группы крыс объединяли так, чтобы полученный объем пулированного образца составлял 3 мл. Затем последовательно добавляли два раза по 3 мл ацетонитрила, два раза по 3 мл диэтилового эфира, два раза по 3 мл этилацетата. При этом каждый раз пробирку помещали в вортекс на 5 минут для интенсивного встряхивания, а затем центрифугировали в течение 5 минут при 3900 об/мин (что примерно соответствует 4000G).

Объединенный органический слой упаривали под током азота в FMSSuperVar до объема в 10 мкл. Затем отбирали аликвоту в 1 мкл и вводили в инжектор газового хроматографа. Остаток разбавили метанолом до 100 мкл и аликвоту в 5 мкл вводили в жидкостной хроматограф, затем остаток упаривали досуха под током азота при комнатной температуре и к сухому остатку прибавляли 20 мкл N-метил-N-триметилсилилтрифторацетамида. Далее пробу выдерживали в нагревателе 30 минут при 80°C. После охлаждения анализировали 1 мкл реакционной смеси. Условия хроматомасс-спектрометрического анализа приведены в таблице 6.

Таблица 6 — Условия газохроматографического разделения и масс-селективного детектирования метаболитов смеси УВ C₆-C₁₀

Условия анализа	Характеристики
Газ-носитель	Гелий газообразный высокой чистоты марки 6.0, объемная доля гелия не менее 99.9999% об.
Режим ввода пробы	Объем пробы 1 мкл, без деления потока (1 мин), под давлением 69 кПа
Температурный режим термостата колонки	1 минута при температуре 70°C, затем подъем до 200°C со скоростью 10°C/мин, затем подъем до 270 °C со скоростью 15°C/мин, затем 10 минут при конечной температуре.
Температура инжектора	250°C
Объемная скорость газа-носителя через колонку	1 мл/мин
Режим работы масс-спектрометра	Температура источника ионов: 280°C. Температура квадруполей: 150°C. Температура интерфейса: 280°C.

ВЭЖХ-МС анализ образцов плазмы крови.

Градиентное элюирование осуществлялось с использованием 5 мМ раствора HCOONH₄ (Фаза А) и 0.01% раствора HCOOH в воде (Фаза Б). Скорость подачи подвижной фазы 0.2 мл/мин. На начальном этапе состав элюента (100% А), затем, после 3 мин до 15 мин от 0 до 80% фазы Б. От 15 до 17 мин 80% фазы Б. От 17 до 17.01 мин 80-0% Б. От 17 до 22 мин 0% Б. Объем вводимой пробы — 5мкл

Условия работы масс-спектрометрического детектора: (электроспрей в режиме отрицательной ионизации): температура газа-осушителя 300°C, скорость потока газа-осушителя 8 дм³/мин, давление на распылителе 35 psig. Напряжение на капилляре 3 кВ.

ГХ-МС анализ паровой фазы над образцами плазмы крови.

Определение целевых веществ выполняли методом газовой хроматографии масс-спектрометрии в режиме электронной ионизации. Концентрирование соединений из плазмы крови крыс осуществляли в режиме газовой экстракции при нагревании в замкнутом объеме, с последующим разделением на капиллярной колонке и количественным определением по индивидуальным характеристическим ионам.

Исследование равновесной паровой фазы над пробами плазмы крови крыс было проведено

при помощи газового хроматомасс-спектрометра Shimadzu QP2010 Plus в режиме автоматической пробоподготовки и введения проб с помощью автодозатор АОС-5000. Концентрирование летучих органических соединений из равновесной паровой фазы проводили на микроволокно карбоксен/полидиметилсилоксан с толщиной пленки неподвижной фазы 85 мкм. Перед началом анализа проб волокно регенерировали в токе азота при 200°C в течение 30 минут.

Образцы плазмы крови каждой исследуемой группы крыс объединяли таким образом, чтобы полученный объем пулированного образца составлял 3 мл, и помещали в виалы объемом 10 мл с завинчивающимися крышками и тефлоновыми прокладками. Условия хроматомасс-спектрометрического определения метаболитов смеси УВ C₆-C₁₀ аналогичны приведенным в разделе 2.1.4 и 2.2.

2.3. Определение метаболитов алифатических углеводородов C₁-C₅ в плазме крови методом ГХ-МС

Определение целевых веществ выполняли методом ГХ-МС в режиме ионизации электронами. Концентрирование соединений из плазмы крови крыс осуществляли в режиме газовой экстракции при нагревании в замкнутом объеме, с последующим разделением на капиллярной колонке и количественным определением по индивидуальным характеристическим ионам [342].

Исследование равновесной паровой фазы над пробами плазмы крови крыс было проведено при помощи газового хроматомасс-спектрометра Shimadzu QP2010 Plus в режиме автоматической пробоподготовки и введения проб с помощью автодозатора АОС-5000. Концентрирование летучих органических соединений из равновесной паровой фазы проводили на микроволокно карбоксен/полидиметилсилоксан с толщиной пленки неподвижной фазы 85 мкм. Перед началом анализа проб волокно регенерировали в токе азота при 200°C в течение 30 минут.

Газовый хроматограф Shimadzu QP2010 Plus с масс-селективным детектором оборудован капиллярной колонкой HP-5MS 60 м × 0.25 мм × 0.25 мкм. Условия газохроматографического разделения и масс-селективного детектирования приведены в таблице 7.

Образцы плазмы крови каждой исследуемой группы крыс объединяли таким образом, чтобы полученный объем пулированного образца составлял 3 мл, и помещали в виалы объемом 10 мл с завинчивающимися крышками и тефлоновыми прокладками. Перед отбором паровой фазы проводили термостатирование проб в течение 10 минут при температуре 40°C. Затем в паровую фазу над пробой вводили микроволокно и проводили концентрирование летучих компонентов паровой фазы в течение 10 минут. По окончании периода сорбции волокно вводили в инжектор хроматографа и проводили термодесорбцию сконцентрированных соединений в хроматографическую колонку в течение 1 минуты.

Таблица 7 — Условия газохроматографического разделения и масс-селективного детектирования метаболитов смеси УВ C₁-C₅

Условия анализа	Характеристики
Газ-носитель	Гелий газообразный высокой чистоты марки 6.0, объемная доля гелия не менее 99.9999 % об.
Режим ввода пробы	Объем пробы 1 мкл, без деления потока (1 мин), под давлением 69 кПа
Температурный режим термостата колонки	1 мин при температуре 40°C, затем подъем до 280°C со скоростью 10°C/мин, затем 35 минут при конечной температуре.
Температура инжектора	250°C
Объемная скорость газаносителя через колонку	1 мл/мин
Режим работы масс-спектрометра	Ионизация электронами с энергией 70 эВ. Температура источника ионов: 280°C. Температура интерфейса: 280°C. Масс-селективное детектирование в режиме мониторинга избранных ионов (SIM): (<i>m/z</i> 43, 58 для ацетона, <i>m/z</i> 43, 45 для пропанола-2, <i>m/z</i> 59 для трет-бутанола, <i>m/z</i> 43, 72 для бутанола, <i>m/z</i> 74 для изобутанола, <i>m/z</i> 41, 43, 56 для бутанола-1, <i>m/z</i> 43, 58, 71, 86 для пентанола-2).

2.4. Подготовка и анализ образцов плазмы крови и мочи для нецелевого метаболического профилирования

2.4.1. Нецелевое метаболическое профилирование методом ГХ-МС

Для метаболического профилирования образцов плазмы крови и мочи использовали газовый хроматомасс-спектрометр Shimadzu QP2010plus или Agilent7890 с масс-спектрометром Agilent 5975C и капиллярной колонкой HP-5MS, 60 м × 250 мкм × 0.25 мкм.

В пробах мочи предварительно проводили ферментативный гидролиз избытка мочевины с использованием уреазы. В пробирку для центрифугирования объемом 2 мл вносили 400 мкл плазмы крови (EDTA-K3), или 0.4мл мочи, 10 мкл смеси внутренних стандартов (3-фторбензойной, 4-диметиламиномасляной и пальмитиновой-d₃₁ кислот, см. раздел 3.5) и 1.2 мл MeOH, затем тщательно встряхивали в течение 5 минут и центрифугировали 15 минут при 14000 об/мин.

Супернатант объемом 1 мл отделяли и переносили в хроматографическую виалу объемом 2 мл, затем упаривали досуха под током азота при комнатной температуре. Затем к сухому остатку прибавляли 50 мкл раствора метоксиамина в пиридине (15 мг/мл) и выдерживали в темноте при комнатной температуре в течение 16 часов. Полученный раствор упаривали досуха и к остатку добавляли 50 мкл БСТФА, затем выдерживали 30 минут при 70°C. Перед анализом раствор охлаждали до комнатной температуры. Условия газохроматографического разделения и масс-селективного детектирования приведены в таблице 8.

Таблица 8 — Условия газохроматографического разделения и масс-селективного детектирования при нецелевом метаболическом профилировании

Условия анализа	Характеристики
Газ-носитель	Гелий газообразный высокой чистоты марки 6.0, объемная доля гелия не менее 99.9999 % об.
Режим ввода пробы	Объем пробы 1 мкл, без деления потока (1 мин), под давлением 69 кПа
Температурный режим термостата колонки	1 мин при температуре 40°C, затем подъем до 280°C со скоростью 10°C/мин, затем 35 минут при конечной температуре.
Температура инжектора	250°C
Объемная скорость газа-носителя через колонку	1 мл/мин
Режим работы масс-спектрометра	Ионизация электронами с энергией 70 эВ. Температура источника ионов: 280°C. Температура интерфейса: 280°C. Масс-селективное детектирование в режиме регистрации полного ионного тока в диапазоне m/z от 40 до 600.

2.4.2. Нецелевое метаболическое профилирование методом ВЭЖХ-МС

Для метаболического профилирования образцов плазмы крови и мочи использовали жидкостный хроматограф Accela (Thermo, США) с масс-спектрометрическим детектором LTQ Orbitrap Velos (Thermo, США) с орбитальной ионной ловушкой был оборудован колонкой Zorbax SB-C18 — 4.6 мм × 150 мм × 1.8 мкм.

Подготовка проб для ВЭЖХ-МС анализа заключалась в депротеинизации образцов метанолом в соотношении 1 к 4 и центрифугировании. Каждую аликвоту образцов анализировали дважды в режиме регистрации положительно и отрицательно заряженных ионов. Условия анализа аналогичны приведенным в разделе 2.2.

2.4.3. Математическая обработка результатов профилирования

Для обработки результатов, полученных методом ГХ-МС, применяли оптимизированные базы хроматомасс-спектрометрических характеристик эндогенных соединений и систему автоматической идентификации и деконволюции (AMDIS) (см. п. 3.5). Для интерпретации результатов ВЭЖХ-МС анализа использовали программное обеспечение XCMS [269,270].

Дискриминантный анализ полученных данных проводили методом PLS-DA. При идентификации обнаруженных соединений использовали базы данных NIST/EPA/NIH 2014 [265,266], GOLMMETABOLOMDATABASE [271,272], MetLin [235,273].

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с помощью прикладного пакета программ "STATISTICA" (версия 6.0, StatSoft Inc, 2001) и Microsoft Excel 2007 с дополнением Multibase 2015. Для выявления взаимосвязей между изучаемыми показателями вычисляли коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Для всех видов анализа статистически значимыми по сравнению с контролем считали значения с $p < 0.05$.

2.5. Методы экспериментального моделирования интоксикаций органическими соединениями

Экспериментальное моделирование проведено коллективом лаборатории общей токсикологии НИИ ГПЭЧ. Эксперименты проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 180-230 г (если не указано иное). Условия содержания экспериментальных животных соответствовали "Правилам лабораторной практики в Российской Федерации (GLP)" (утв. Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 19.06.2003 N 267). Для получения плазмы кровь, отобранную после декапитации крыс в пробирки с ЭДТА-К3, центрифугировали 15 мин при 4000 g. Мочу отбирали с использованием мочесборников.

2.5.1. Фосфорорганические отравляющие соединения

Экспериментальное моделирование интоксикации фосфорорганическими отравляющими веществами проводили в двух сериях экспериментов [274] (см. таблицу 9), введение подкожное.

Таблица 9 – Группы экспериментальных животных (n=6), использованные при экспериментальном моделировании интоксикации ФОС

Группа	Вещества, дозы
1	90 мкг/кг зарина
2	45 мкг/кг зомана
3	6 мкг/кг RVX
4	10 мг/кг карбоксима и 30 мг/кг атропин
5 (контроль №1)	Физиологический раствор
6	Дважды через 1 час по 4.8 мкг/кг RVX
7	Дважды через 1 час по 4.8 мкг/кг RVX затем карбоксим 10 мг/кг
8 (контроль №2)	Физиологический раствор

2.5.2. Фосфорорганические пестициды

Для экспериментального моделирования интоксикации ФОП использовали 4-х кроликов породы шиншилла, полученных из питомника "Рапполово". Навески всех ФОП объединяли и готовили *extempore* раствор в 50 %-м этаноле (w/v), из расчета 1 мл/кг. Дихлофос, диметоат, диазинон и метилпаратион вводили в/ж в дозе 1/10 DL₅₀, хлорпирифос и фозалон — в/ж в дозе 1/50 DL₅₀. Токсикометрические данные ФОП (DL₅₀) при пероральном введении лабораторным животным взяты из литературных источников и приведены в таблице 9.

Отбор крови осуществляли из краевой вены уха сначала до введения ФОП (фоновый контроль), затем через 20-30 мин, 1, 2, 3, 4 и 6 часов, 1, 2, 3, 4 и 6 суток после введения ФОП. Мочу кроликов собирали до введения ФОП, затем в течение первых 3-6 часов, далее через 1, 2, 3, 5, 7, 14 и 21 сутки.

Таблица 9 — Фосфорорганические пестициды: систематические названия, номера ГСО, среднесмертельные дозы

№	Соединение, систематическое название	Номер ГСО	DL ₅₀ в/ж (кролики), мг/кг
1	Дихлофос (<i>O,O</i> -диметил- <i>O</i> -2,2-дихлорвинилфосфат)	7407-97	11-12.5 [275,276]
2	Диметоат (<i>O,O</i> -диметил- <i>S</i> -[2-(метиламино)-2-оксоэтил] дитиофосфат)	7406-97	400-500 [277]
3	Диазинон (<i>O,O</i> -диэтил- <i>O</i> -[4-метил-6-(пропан-2-ил)пиримидин-2-ил]фосфоротиоат)	7405-97	143 [277,278]
4	Метилпаратион (<i>O,O</i> -диэтил- <i>O</i> -(4-нитрофенил)фосфоротиоат)	7888-2001	420 [279, 280]
5	Хлорпирифос (<i>O,O</i> -диэтил- <i>O</i> -3,5,6-трихлорпиримидин-2-ил фосфоротиоат)	7418-97	1000 [277]
6	Фозалон (6-хлоро-3-(диэтоксифосфинотиоил-сульфанилметил)-1,3-бензоксазол-2-он)	7416-97	1530 [281]

2.5.3. Летучие промышленные загрязнители

Для экспериментального моделирования интоксикации ЛПЗ использовали 4-х кроликов породы шиншилла, полученных из питомника "Рапполово". Введение токсикантов осуществляли подкожно. Токсикометрические данные ЛПЗ (DL₅₀) при пероральном введении лабораторным животным взяты из литературных источников и приведены в таблице 10 [105].

Таблица 10 — Летучие промышленные загрязнители: названия, среднесмертельные дозы для кроликов (*per os*) и введенная доза

№	Соединение	DL ₅₀ в/ж (кролики), мг/кг	Введенная доза, мг/кг
1	Акрилонитрил	25-186	0.22 (0.001-0,009 DL ₅₀)
2	Аллилхлорид	23	0.22 (0.009 DL ₅₀)
3	Дисульфид углерода	2780	0.22 (7.0×10 ⁻⁵ DL ₅₀)
4	Хлорацетонитрил	71-85	0.22 (0.0025-0,003DL ₅₀)
5	<i>n</i> -Бутилхлорид	2670	0.22 (8.2×10 ⁻⁵ DL ₅₀)
6	<i>транс</i> - 1,4-Дихлор-2-бутен	89	0.22 (0.0025DL ₅₀)
7	Диэтиловый эфир	1215	0.22 (1.8×10 ⁻⁴ DL ₅₀)
8	Этилметакрилат	3630	0.22 (6.0×10 ⁻⁵ DL ₅₀)
9	Гексахлорэтан	4460	0.22 (7.0×10 ⁻⁵ DL ₅₀)
10	Метакрилонитрил	268	0.22 (8.2×10 ⁻⁴ DL ₅₀)
11	Метилакрилат	300	0.22 (7.0×10 ⁻⁴ DL ₅₀)
12	Метилметакрилат	7872	0.22 (2.8×10 ⁻⁵ DL ₅₀)
13	Нитробензол	780	0.22 (2.8×10 ⁻⁴ DL ₅₀)
14	2-Нитропропан	75	0.22 (0.003DL ₅₀)
15	Пентахлорэтан	920	0.22 (2.4×10 ⁻⁴ DL ₅₀)
16	Тетрагидрофуран	1650	0.22 (1.3×10 ⁻⁴ DL ₅₀)

Промышленные токсиканты представлены коммерчески доступной смесью 18 летучих соединений, растворенных в 1 мл метанола в концентрации около 2 мг/мл для каждого компонента смеси (EPA 524.2 Revision 4 Mix, Supelco, 47427-U, 1 мл). 1 мл указанной смеси разводили в метаноле до 3 мл, каждому кролику весом 3 кг вводили по 1 мл разведенной смеси подкожно. Таким образом, каждому кролику было введено примерно по 0.67 мг каждого компонента смеси (0.22 мг/кг).

Отбор крови осуществляли из краевой вены уха сначала до введения смеси (фоновый контроль), затем через 10 мин, 30 мин, 1, 2, 4, 6 часов, 1, 2, 5 суток после введения смеси. Мочу кроликов собирали до введения смеси, затем в течение первых 3-6 часов, далее через 1, 2, 3, 5 суток.

2.5.4. Смесью нормальных алифатических углеводородов C₆-C₁₀

Для оценки токсических свойств смеси нормальных алифатических углеводородов C₆-C₁₀, а именно гексана, гептана, октана, нонана и декана был проведен хронический 90-суточный эксперимент [313,316].

Концентрации УВ в воздухе при экспонировании животных были довольно низкими: содержание гептана в смеси составляло всего 104.7 мг/м³ в первой группе, 20.3 мг/м³ во второй и 3.4 мг/м³ в третьей. Соотношения предельных углеводородов в смеси заданы соотношениями их концентраций в атмосферном воздухе вблизи нефтеперерабатывающих заводов (см. таблицу 11).

Смесь предельных углеводородов подавали в камеры непрерывно в течении 90 суток с помощью специально сконструированного дозатора, позволяющего точно регулировать и постоянно поддерживать заданную концентрацию смеси в камере в течение эксперимента.

Таблица 11 — Концентрации компонентов смеси углеводородов C₆-C₁₀

Группа	Суммарное содержание смеси УВ, мг/м ³	Углеводород	Содержание УВ, мг/м ³
Группа 1 (высокая доза)	160 ± 21	гексан C ₆ H ₁₄	25.9
		гептан C ₇ H ₁₆	104.7
		октан C ₈ H ₁₈	25.9
		нонан C ₉ H ₂₀	1.8
		декан C ₁₀ H ₂₂	1.8
Группа 2 (средняя доза)	31 ± 6	гексан C ₆ H ₁₄	5.0
		гептан C ₇ H ₁₆	20.3
		октан C ₈ H ₁₈	5.0
		нонан C ₉ H ₂₀	0.34
		декан C ₁₀ H ₂₂	0.34
Группа 3 (низкая доза)	5 ± 1	гексан C ₆ H ₁₄	0.84
		гептан C ₇ H ₁₆	3.4
		октан C ₈ H ₁₈	0.84
		нонан C ₉ H ₂₀	0.06
		декан C ₁₀ H ₂₂	0.06

Подопытные животные были разделены на 4 группы: первая группа была экспонирована смесью с концентрацией $160 \pm 21 \text{ мг/м}^3$, вторая – $31 \pm 6 \text{ мг/м}^3$, третья — $5 \pm 1 \text{ мг/м}^3$ и четвертая — контрольная. В каждой группе было по 6 животных. После отбора крови у животных были взяты образцы органов, которые незамедлительно замораживали в жидком азоте ($-196 \text{ }^\circ\text{C}$) и затем гомогенизировали.

2.5.5. Гидроксиламин

Гидроксиламин представляет собой прозрачную бесцветную жидкость с достаточно выраженным ароматическим запахом. В остром эксперименте использовали одну группу животных, которым внутрижелудочно вводили по 101.6 мг/кг ГА, что составляет $\frac{1}{2} \text{ DL}_{50}$. Отбор проб крови производили декапитацией через 2 часа после затравки и через 24 часа, отбор проб мочи производили в течение 24 часов [282]. В хроническом эксперименте использовали 4 группы животных, которым давали ГА с питьевой водой в течение 30 дней, таким образом первая группа получала дозу ГА 565 мкг/кг , вторая — 113.1 мкг/кг , третья — 22.6 мкг/кг , четвертая группа — контрольная. В каждой группе было по 6 животных.

2.5.6. Смесь нормальных алифатических углеводородов $\text{C}_1\text{-C}_5$

Подопытные животные подвергались ингаляционному непрерывному 90-суточному воздействию смеси предельных углеводородов $\text{C}_1\text{-C}_5$ в концентрациях: $1250 \pm 52 \text{ мг/м}^3$ (3 группа), $256 \pm 16 \text{ мг/м}^3$ (2 группа), $50 \pm 6 \text{ мг/м}^3$ (1 группа) [342]. Состав смеси приведен в таблице 12.

Таблица 12 — Концентрации компонентов смеси предельных углеводородов $\text{C}_1\text{-C}_5$

Группа	Суммарное содержание смеси УВ	Углеводород	Содержание УВ, мг/м^3
Группа 3 (высокая доза)	$1250 \pm 52 \text{ мг/м}^3$	Метан CH_4	287.5
		Этан C_2H_6	37.5
		Пропан C_3H_8	600.0
		Изобутан C_4H_{10}	87.5
		<i>n</i> -Бутан C_4H_{10}	137.5
		Изопентан C_5H_{12}	62.5
		<i>n</i> -Пентан C_5H_{12}	37.5
Группа 2 (средняя доза)	$256 \pm 16 \text{ мг/м}^3$	Метан CH_4	58.7
		Этан C_2H_6	7.7
		Пропан C_3H_8	122.4
		Изобутан C_4H_{10}	17.9
		<i>n</i> -Бутан C_4H_{10}	28.1
		Изопентан C_5H_{12}	12.8
		<i>n</i> -Пентан C_5H_{12}	7.7
Группа 1 (низкая доза)	$50 \pm 6 \text{ мг/м}^3$	Метан CH_4	11.5
		Этан C_2H_6	1.5
		Пропан C_3H_8	24.0
		Изобутан C_4H_{10}	3.5
		<i>n</i> -Бутан C_4H_{10}	5.5
		Изопентан C_5H_{12}	2.5
		<i>n</i> -Пентан C_5H_{12}	1.5

Смесь предельных углеводородов подавали в камеры непрерывно в течении 90 суток. Соотношения компонентов смеси определены их соотношениями в атмосферном воздухе вблизи нефтеперерабатывающих заводов.

2.5.7. 1,4-дихлоргексафторбутен-2 (хладон RL316)

Для оценки токсических свойств ДХГФ был проведен эксперимент с однократным и многократным экспонированием крыс-самцов ДХГФ. Однократное экспонирование ДХГФ было проведено в течение 4-х часов при концентрации 600 мг/м^3 . При многократном ингаляционном эксперименте крысы подвергались воздействию ДХГФ в течение 30 суток по 4 часа в день, кроме выходных дней, в концентрациях: $84 \pm 7 \text{ мг/м}^3$ (1 группа подопытных крыс), $19 \pm 1 \text{ мг/м}^3$ (2 группа крыс) и $4.7 \pm 0.2 \text{ мг/м}^3$ (3 группа крыс), 4 группа крыс служила контролем.

2.6. Определение гидроксиламина и его метаболитов в плазме крови и моче методом газовой хроматомасс-спектрометрии

Для определения биомаркеров экспозиции гидроксиламином использовали газовый хроматограф Agilent 7890A, с масс-селективным детектором Agilent 5975C или tandemным масс-спектрометром с системой трех квадруполей Agilent 7000. Газовый хроматограф оборудован капиллярной колонкой HP-5MS $30 \text{ м} \times 0.25 \text{ мм} \times 0.25 \text{ мкм}$ [282]. Условия газохроматографического разделения и масс-селективного детектирования приведены в таблице 13.

Таблица 13 — Условия газохроматографического разделения и масс-селективного детектирования триметилсилиловых эфиров аддуктов гидроксиламина с бензальдегидом

Условия анализа	Характеристики
Газ-носитель	Гелий газообразный высокой чистоты марки 6.0, объемная доля гелия не менее 99.9999 % об.
Режим ввода пробы	Объем пробы 1 мкл, без деления потока (1 мин), под давлением 69 кПа
Температурный режим термостата колонки	3 минуты при температуре 50°C , затем подъем до 140°C со скоростью 20°C/мин , затем подъем до 280°C со скоростью 5°C/мин , затем 8 минут при конечной температуре.
Температура инжектора	250°C
Поток газа-носителя	1 мл/мин
Режим работы масс-спектрометра с одним квадруполем, Agilent 5975C	Ионизация электронами с энергией 70 эВ. Температура источника ионов: 280°C . Температура квадруполя: 150°C . Температура интерфейса: 280°C . Масс-селективное детектирование в режиме мониторинга избранных ионов (SIM): m/z 193, 178, 135 (внутренний стандарт)
Режим работы масс-спектрометра с системой трех квадруполей, Agilent 7000	Ионизация электронами с энергией 70 эВ. Температура источника ионов: 280°C . Температура квадруполя: 150°C . Температура интерфейса: 280°C . Поток азота в ячейке соударений 1.5 мл/мин, поток гелия — 2.25 мл/мин. Масс-селективное детектирование в режиме мониторинга множественных реакций (MRM): $193 \Rightarrow 89$ (10 В), $178 \Rightarrow 75$, (10 В), $135 \Rightarrow 77$ (20 В) — внутренний стандарт.

Реактивы и стандарты: гидрохлорид гидроксиламина (ACS reagent, кат № 255580), гидрохлорид метоксиамина (Aldrich, кат № 226904), *бис*-(триметилсилил)трифторацетамид (далее — БСТФА, Supelco, кат № 33024), бензальдегид (Sigma-Aldrich, кат № 09143), уксусная кислота, CH_2Cl_2 , JT Baker.

Подготовка образцов к анализу: к 400 мкл плазмы крови добавляли 10 мкл метанольного раствора внутреннего стандарта (метоксиамина) с концентрацией 20 нг/мкл, 10 мкл ледяной уксусной кислоты и 10 мкл бензальдегида. Смесь перемешивали в Vortex в течение 5 минут, после чего прибавляли 2 мл хлористого метилена и еще раз перемешивали в Vortex в течение 5 минут, органический слой отделяли и процедуру экстракции водного остатка повторяли еще дважды. Органический экстракт объединяли и упаривали досуха под током азота при комнатной температуре. К сухому остатку прибавляли 50 мкл БСТФА и выдерживали при 70°C течение 30 минут, аликвотную часть объемом 1 мкл вводили в инжектор хроматографа.

Внесение ГА в кровь или мочу *in vitro* выполняли следующим образом: к 1 мл свежей цельной крови человека (или 2 мл мочи), отобранной из кубитальной вены в пробирки с ЭДТА-К₃, прибавили 2.5 мг (в мочу вносили 5 мг) гидроксиламина в виде 100 мкл водного раствора гидрохлорида. В контрольный образец крови вносили 100 мкл дистиллированной воды. Затем образцы инкубировали при 37°C в течение двух часов, после чего образцы охладили, и из цельной крови отобрали плазму после центрифугирования.

Извлечение метаболитов ГА из плазмы крови проводили следующим образом: к 400 мкл плазмы крови прибавляли ацетонитрил (2×1 мл) и 50 мг NaCl, после встряхивания центрифугировали при 4000 g и отбирали надосадочную жидкость. Полученные экстракты объединяли и упаривали досуха в токе азота. К сухому остатку прибавили БСТФА и анализировали 1 мкл на ГХ-МС. Извлечение из мочи выполняли аналогично, но брали 2 мл мочи и экстрагировали ацетонитрилом (2×2 мл). В качестве внутреннего стандарта были использованы циклогексанол и пальмитиновая кислота-d31.

Условия масс-спектрометрической регистрации метаболитов ГА: I — оксим глицеральдегида m/z 321, $RT^3 = 10.990$ и 11.428 мин (*E* и *Z*-изомеры оксимов); II — оксим пировиноградной кислоты (пируватоксим), m/z 232, $RT = 8.150$ и 8.442 мин; III — оксим N-формилглицина m/z 102, $RT = 6.302$ и 6.750 ; IV — оксим глиоксалевой кислоты m/z 160, $RT = 9.180$ и 9.222 ; V-VII оксимы моносахаридов m/z 319, $RT = 18,708$, $18,790$, $19,332$, $19,451$ и $19,937$.

³ RT — время удерживания соединения, мин.

2.7. Определение ДХГФ и его метаболитов в плазме крови и моче

Определение ДХГФ и его летучих метаболитов выполняли методом газовой хромато-масс-спектрометрии с твердофазной микроэкстракцией с использованием газового хроматографа Agilent 7890 с масс-спектрометром Agilent 5975. Газовый хроматограф оборудован высокополярной капиллярной колонкой SP2560, 75 м × 180 мкм × 0.14 мкм. Концентрирование летучих органических соединений из равновесной паровой фазы проводили на микроволокно карбоксен/полидиметилсилоксан/дивинилбензол с толщиной пленки неподвижной фазы 50 мкм ("серое"). Перед началом анализа проб волокно регенерировали в токе азота при 200°C в течение 30 минут.

Образцы плазмы крови каждой исследуемой группы крыс объединяли таким образом, чтобы полученный объем пулированного образца составлял 3 мл, и помещали в виалы для парового анализа объемом 10 мл с завинчивающимися крышками и тефлоновыми прокладками. Перед отбором паровой фазы проводили термостатирование проб в течение 10 минут при температуре 40°C. Затем в паровую фазу над пробой вводили микроволокно и проводили концентрирование летучих компонентов паровой фазы в течение 10 минут. По окончании периода сорбции волокно вводили в инжектор хроматографа и проводили термодесорбцию сконцентрированных соединений в хроматографическую колонку в течение 1 минуты. Условия газохроматографического разделения и масс-селективного детектирования приведены в таблице 14.

Таблица 14 — Условия хроматографического разделения и масс-селективного детектирования

Условия анализа	Характеристики
Газ-носитель	Гелий газообразный высокой чистоты марки 6.0, объемная доля гелия не менее 99,9999% об.
Режим ввода пробы	Десорбция с микроволокна в течение одной минуты
Температурный режим термостата колонки	2 минуты при температуре 40°C, затем подъем до 200°C со скоростью 5°C/мин
Температура инжектора	200°C
Объемная скорость газа-носителя через колонку	1 мл/мин
Режим работы масс-спектрометра	Ионизация электронами с энергией 70 эВ. Температура источника ионов: 280°C. Температура квадруполя: 150°C. Температура интерфейса: 280°C. Масс-селективное детектирование в режиме мониторинга избранных ионов (SIM): m/z 147, 197 для ДХГФ и 63, 78 — 2-хлорпропан, 151 и 178 метаболиты L-I и L-II.

Масс-спектр ионизации электронами ДХГФ: 69 (10), 81 (3), 85 (8) $[CF_2Cl]^+$, 87 (3), 93 (37), 109 (8), 111 (3), 112 (9), 131 (16), 147 (85) $[M-CF_2Cl]^+$, 149 (31), 162 (6), 163 (25), 165 (16), 167 (3), 197 (100) $[M-Cl]^+$, 198 (5), 199 (37), 232 (7) $[M]^+$, 234 (5) $[M+2]^+$, 236 (0.7) $[M+4]^+$.

Определение нелетучих метаболитов ДХГФ выполняли методом ВЭЖХ-МС высокого разрешения.

2.8. Установление структур позиционных изомеров алкилфенолов

Получение смесей изомерных алкилфенолов.

Для алкилирования фенола алифатическими спиртами в присутствии $AlCl_3$ в одnogорлую круглодонную колбу на 100 мл, снабженную обратным холодильником, помещали 0.03 моль безводного $AlCl_3$ (4 г) и добавляли 0.02 моль фенола (1.9 г), растворенного в 0.04 моль соответствующего спирта (таблица 15) [283,284]. Смесь нагревали на масляной бане при температуре 130°C в течение 3 ч (первичные спирты) или 1 ч (вторичные и третичные спирты).

Реакционные смеси промывали последовательно водой и соляной кислотой, экстрагировали хлороформом и анализировали полученные экстракты. В качестве смеси изомерных нонилфенолов был использован образец Sigma (кат. №290858 Aldrich).

Условия хроматомасс-спектрометрического анализа: tandemное масс-спектрометрическое детектирование компонентов растворов реакционных смесей в хлористом метиле проводили на газовом хроматографе Agilent 7890A с масс-спектрометром с системой трех квадруполей Agilent 7000. Использовали кварцевую WCOT-колонку HP-5 MS 30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм в режиме программирования температуры от 40 °C до 280 °C (30 мин) со скоростью 5 град/мин. Температура испарителя 250 °C, интерфейса и детектора 280 °C. Объемная скорость газ-носителя (гелий) 1.5 мл/мин, деление потока при вводе проб 1:30. Температура источника ионов 250°C. Выбран режим химической ионизации (газ-реагент CH_4) с регистрацией положительных ионов. Поток метана в источнике составлял 20 % от потока газа-носителя. Режим регистрации масс-спектров ДИС: поток азота в ячейке соударений — 1.5 мл/мин, поток гелия — 2.25 мл/мин. Энергию соударений варьировали в интервале 5-60 В (см. комментарии в разделе 3.4).

Таблица 15 — Условия реакции алканолов с фенолом

Алканол	Объем алканола, мл (время реакции)
Бутанол-1	3.7 мл (3 ч)
Бутанол-2	3.7 мл (3 ч)
2-Метилпропанол-1	3.7 мл (1 ч)
1,1-Диметилэтанол	3.7 мл (1 ч)
Пентанол-1	4.4 мл (3 ч)
3-Метилбутанол-1	4.4 мл (3 ч)
2-Метилбутанол-2	4.4 мл (1 ч)
Гексанол-1	5.1 мл (3 ч)
Гептанол-1	5.8мл (3 ч)
Октанол-1	6.5мл (3 ч)

2.9. Определение дихлофоса, диметоата, хлорпирифоса, фозалона, диазинона и метилпара-тиона в крови и моче методом ГХ-МС/МС

Для определения ФОП использовали газовый хроматограф Agilent 7890A с tandemным масс-селективным детектором Agilent 7000 и капиллярной колонкой HP-5MS, 30 м × 250 мкм, толщина слоя фазы 0.25 мкм. Условия газохроматографического разделения и масс-селективного

детектирования ФОП приведены в таблицах 16 и 17 [31].

Для приготовления модельных растворов использовали ГСО фосфорорганических пестицидов (см. п. 2.5.6). Производитель ГСО: ФГУП "Всероссийский Научно-исследовательский институт химических средств защиты растений", научно-производственный кооператив "Блок-1". Таким образом, в модельную группу вошли: один чрезвычайно опасный, один высокоопасный и четыре умеренно опасных ФОП (согласно ГОСТ 12.1.007-76).

Таблица 16 — Условия газохроматографического разделения и масс-селективного детектирования

Условия анализа	Характеристики
Газ-носитель	Гелий газообразный высокой чистоты марки 6.0, объемная доля гелия не менее 99.9999 % об.
Режим ввода пробы	Объем пробы 1 мкл, без деления потока (1 мин), под давлением 69 кПа.
Температурный режим термостата колонки	1 минута при температуре 70°C, подъем до 200°C со скоростью 10°C/мин, подъем до 270°C со скоростью 15°C/мин, 10 минут при конечной температуре.
Температура инжектора	250°C
Объемная скорость газа-носителя через колонку	1 мл/мин
Режим работы масс-спектрометра	Температура источника ионов: 280°C. Температура квадруполей: 150°C. Температура интерфейса: 280 °C. Масс-селективное детектирование в режиме мониторинга множественных реакций (ММР): см. таблицу 17.
Газ в ячейке соударений	Азот особой чистоты, объемная доля азота не менее 99.999 %.
Режим работы ячейки соударений	Поток азота в ячейке соударений 1.5 мл/мин, поток гелия — 2.25 мл/мин.

Таблица 17 — Аналитические характеристики целевых соединений. Временные интервалы регистрации и характеристичные реакции (режим ММР)

№ п/п	Временной интервал, мин	Название соединения	Время удерживания, мин	$m/z \Rightarrow m/z$	Энергия соударений, В ¹
1	8.00 — 13.00	Дихлофос	10.082	109 => 79	5
2	14.00 — 16.60	Диметоат	16.199	87 => 46	15
3	16.85 — 17.40	Диазинон	16.942	137 => 84	15
4	17.40 — 18.20	Метилпаратион	17.796	263 => 109	15
5	18.20 — 21.50	Хлорпирифос	18.601	197 => 169	15
6	22.30 — 30.60	Фозалон	22.600	182 => 111	15

Примечание: ¹ — Энергия соударений приведена в вольтах, так как это один из параметров режима работы ячейки соударений в тандемном масс-спектрометре.

Отбор проб.

Пробу крови объемом не менее 5 мл отбирали в вакуумную пробирку с антикоагулянтom ЭДТА. Пробы мочи отбирали в стерильные контейнеры. Отобранные образцы допускается хранить в холодильнике не более 1 суток при температуре от 4 до 6°C и не более 30 суток при температуре не выше минус 20°C.

Подготовка проб для анализа.

В пробирку для центрифугирования объемом 10 мл, содержащую 250 мг сульфата натрия безводного и 500 мг хлорида натрия, вносили 2 мл ацетонитрила и 1 мл анализируемой крови (мочи).

Пробирки тщательно встряхивали в течение одной минуты и подвергали центрифугированию в течение 5 минут при 4000 об/мин. После центрифугирования верхний органический слой отбирали из пробирок с помощью дозатора и переносили в пробирки Eppendorf объемом 2 см³, в которые было предварительно внесено по 50 мг безводного сульфата натрия. Пробирки тщательно встряхивали в течение одной минуты и подвергали центрифугированию в течение 5 минут при скорости вращения центрифуги 14000 об/мин. Затем экстракты помещали в хроматографические виалы с коническим дном, упаривали досуха под током азота при комнатной температуре и незамедлительно перерастворяли в 50 мкл ацетонитрила. Аликвотную часть объемом 1 мкл вводили в инжектор газового хроматографа.

2.10. Определение смеси летучих органических соединений в крови и моче методом ГХ-МС

На рисунке 16 представлена блок-схема разработанной методики определения летучих органических соединений в крови и моче методом ГХ-МС.



Рисунок 16 — Блок-схема методики определения летучих органических соединений в биологических образцах

В виалу для парофазного анализа объемом 10 мл вносили 3 мл образца (деионизованной воды, крови или мочи). Затем пробу термостатировали в течение 10 минут при 40 °C при постоянном перемешивании. Отбор пробы производили на микроволокно 85 мкм Carboxen/PDMS из равновесного пара в течение 10 минут при постоянном перемешивании пробы и при 40 °C. Термодесорбцию аналитов проводили в горячем инжекторе хроматографа при 250 °C в течение 1 минуты.

Для определения ЛПЗ использовали газовый хроматограф — масс-спектрометр GCMSQP 2010 с капиллярной колонкой DB-624 30 м x 0.25 мм x 1.4 мкм. Масс-спектрометрический анализ: энергия ионизирующих электронов 70 эВ, температура ионного источника 200 °С, режим мониторинга избранных ионов (SIM). Времена удерживания и характеристичные ионы приведены в таблице 18.

Таблица 18 — Газохроматографические времена удерживания и характеристичные ионы компонентов модельной смеси. Приведено сравнение времен удерживания зарегистрированных с использованием колонок SPB-1701 и DB-624

№ п/п	Название соединения	Время удерживания на колонке SPB 1701, мин	Время удерживания на колонке DB-624, мин	Характеристичные ионы, <i>m/z</i>
1	Этиловый эфир	1.76	3.39	59 , 45, 74
2	Дисульфид углерода	1.86	3.99	76
3	Аллилхлорид	1.95	4.21	41, 76
4	Акрилонитрил	2.29	4.75	52, 53
5	Метилакрилат	2.67	6.67	55
6	Тетрагидрофуран	2.71	6.84	42, 72
7	Метакрилонитрил	2.79	7.49	67
8	Бутилхлорид	2.92	7.49	56
9	Метилметакрилат	4.12	9.56	69 , 100
10	2-Нитропропан	5.19	10.15	41, 43
11	Хлорацетонитрил	5.85	10.22	48, 75 , 77
12	Этилметакрилат	5.95	11.59	69
13	Пентахлорэтан	11.02	15.52	117 , 167
14	<i>транс</i> -1,4-дихлор-2-бутен	11.98	16.47	75 , 89, 124
15	Гексахлорэтан	12.13	18.17	117 , 201
16	Нитробензол	14.78	19.36	77, 123

*Примечание: жирным шрифтом выделены *m/z*, использованные для количественного анализа.*

Газохроматографическое разделение: температура испарителя 250 °С; ввод пробы без деления потока (0.5 мин); температурная программа: начальная температура колонки 40°С (3 мин), скорость подъема температуры с 5 °С/мин до 55 °С, скорость подъема температуры 10 °С/мин, конечная температура колонки 220 °С, выдержка при конечной температуре — 5 мин; газ-носитель — гелий, расход газа-носителя через колонку 1 мл/мин. Температура интерфейса 270 °С.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В главе 3 представлены основные результаты, полученные при разработке и внедрении в практику токсикологических исследований совокупности методов выявления чувствительных биомаркеров экспозиции и эффекта токсичных органических соединений. Предлагаемая методология является дополнением и расширением "классического" токсиколого-аналитического скри-

нинга: методы выявления биомаркеров экспозиции в токсиколого-аналитическом скрининге дополнены пакетом методик количественного анализа, а также методами выявления биомаркеров эффекта с помощью целевой и нецелевой метаболомики. Принципиальная схема такого подхода приведена на рисунок 17.

Для повышения эффективности выявления биомаркеров экспозиции нами были разработаны методические рекомендации для расширенного токсиколого-аналитического скрининга с использованием современных видов хроматомасс-спектрометрии (МР ФМБА России 4.1.23-2014) [263]. Результаты апробации рекомендаций подтвердили возможность безэталонной идентификации заранее неизвестных органических соединений и их метаболитов в биожидкостях (раздел 3.1).

Внедрение методов определения биомаркеров экспозиции позволило обнаружить и идентифицировать маркеры хронического воздействия углеводов на уровне порога хронического действия (разделы 3.2.2 и 3.2.3), биомаркеры экспозиции гидроксиламином (раздел 3.2.4), ДХГФ (раздел 3.2.5), а также биомаркеры экспозиции фосфорорганическими пестицидами и летучими промышленными токсикантами в крови в течение 6 дней после отравления дозами эквивалентными $\frac{1}{2} DL_{50}$ (разделы 3.2.).

Количественное определение концентраций биомаркеров экспозиции позволяет проводить оценку внутренней или абсорбированной дозы веществ. Возможность такой оценки опробована нами (см. раздел 3.3.3), при этом показано, что отклонение при оценке дозы редко превышает 100% и не зависит от точки отбора пробы крови.

Для обнаружения и идентификации биомаркеров эффекта в данной работе было использовано сочетание ГХ-МС низкого разрешения и ВЭЖХ-МС высокого разрешения. Для эффективного использования результатов полученных с использованием рутинного метода ГХ-МС низкого разрешения был предложен новый подход, заключающийся в создании оптимизированных баз хроматомасс-спектрометрических характеристик эндогенных соединений и использовании системы автоматической идентификации и деконволюции (раздел 3.5).

В результате применения предложенной методологии было впервые описано воздействие фосфорорганических отравляющих веществ на профиль свободных и этерифицированных жирных кислот плазмы крови (3.6.1), выявлены биомаркеры эффекта алифатических углеводов C_1-C_{10} (разделы 3.6.2 — 3.6.4), гидроксиламина (раздел 3.6.5) и ДХГФ (раздел 3.6.6).

Преимуществом предложенной методологии является объединение подходов к обнаружению и идентификации биомаркеров экспозиции и эффекта в рамках одного метода хроматомасс-спектрометрии. Использование масс-спектропии низкого разрешения позволяет значительно удешевить необходимое оборудование.

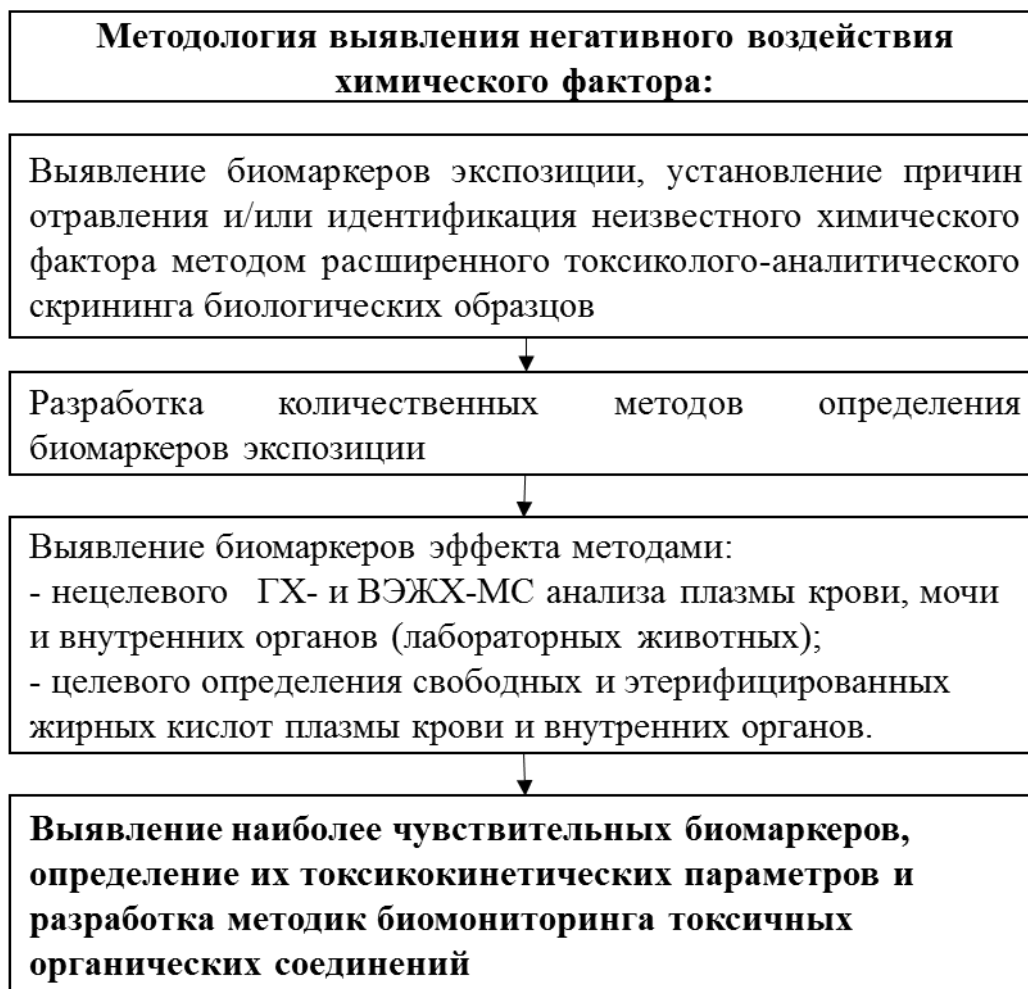


Рисунок 17 — Принципиальная схема разработки методики выявления негативного воздействия химического фактора методами хроматомасс-спектрометрии

Полученные результаты позволили выявить наиболее чувствительные биомаркеры токсичных органических соединений, которые впоследствии могут быть использованы для биомониторинга лиц, профессионально контактирующих с целевыми соединениями или проживающих вблизи потенциально опасных химических предприятий.

3.1. Расширенный токсиколого-аналитический скрининг биологических образцов

Сложившуюся на сегодняшний день в Российской Федерации ситуацию в области определения токсикантов и их метаболитов в биосредах человека нельзя считать удовлетворительной. Это связано не только с отсутствием полноценной экспериментальной и методологической базы в учреждениях, призванных решать задачи токсикологической химии, но и с отсутствием подготовленных специалистов, слабым межлабораторным взаимодействием, разъединенностью клинической и химико-аналитической составляющих диагностического процесса. Нет общедоступных и полноценных баз данных аналитических характеристик химических соединений в токсикологии и экологии. Учеными-практиками отмечается отсутствие методологии согласованного

клинического, судебно-медицинского и экологического анализа. Если в части анализа неорганических соединений очевиден прогресс в поиске как концептуального, так и технического решения проблемы, то применительно к идентификации органических соединений обобщающих методических подходов не разработано.

Непосредственное проведение хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования, и, что особенно важно — интерпретация данных анализа в условиях отсутствия априорной информации также методически не проработаны. В то же время практика настоятельно требует решения этих задач. Если отравления носят тяжелый и/или массовый характер, их доказательная диагностика становится задачей федерального масштаба.

В данном разделе рассмотрены результаты разработки и апробации подхода к расширенному токсиколого-аналитическому скринингу при анализе биологических жидкостей пациентов с различными симптомами острого отравления. Используемая процедура включает: анализ методом ГХ-МС паровой фазы над образцом в режиме твердофазной микроэкстракции и обработанных дериватирующими агентами экстрактов из крови и мочи, а также автоматическую интерпретацию полученных масс-хроматограмм. Особенности используемого подхода является обнаружение в скрининге легколетучих соединений при парофазном анализе, а также оптимизированные методы дериватизации аналитов для повышения возможностей их идентификации без использования стандартных соединений.

Значительным преимуществом ГХ-МС является высокая воспроизводимость масс-спектров. Хорошие совпадения могут быть получены между спектрами, зарегистрированными на разных приборах в разных лабораториях и даже в составе разных образцов [60]. В библиотеке NIST 14 содержится 276259 спектров для 242477 уникальных соединений. В этой базе данных собрана вся доступная информация о соединениях, поэтому в общедоступных базах данных целевые соединения или их метаболиты приведены в виде различных производных, следовательно, необходимо проводить дериватизацию образцов различными видами дериватирующих агентов. Оптимальным, по нашему мнению, является перечень из пяти агентов (см. экспериментальную часть): МСТФА, CH_3I , ТФА, МТБСТФА и Ac_2O .

Экстракцию наибольшего количества соединений различной химической природы целесообразно проводить при различных значениях pH. Извлечение аналитов ацетонитрилом (полярным растворителем) при pH 2 и pH 9, а также диэтиловым эфиром (слабополярным растворителем в режиме экстракционного вымораживания), позволяет изолировать соединения кислотного, основного и нейтрального характера. В работе [88] предложено для сокращения времени анализа объединять кислые и щелочные экстракты, что подтверждается и нашим опытом.

Анализ зарегистрированных масс-хроматограмм проводится в режиме автоматической интерпретации с помощью программного обеспечения AMDIS 2.66 [264] с подключенными библиотеками масс-спектров NIST [265,266], PMW [267], Wiley [268]. Режим идентификации и деконволюции мы рекомендуем настраивать таким образом, чтобы в отчете содержались ложноположительные ответы, которые далее следует проверять "вручную". Ручная проверка любого спектрального совпадения все равно необходима, несмотря на наличие автоматизированных систем библиотечного поиска и деконволюции [285,286]. Следующим этапом является подтверждение результатов идентификации.

Это позволяет минимизировать вероятность ложноотрицательных ответов (при содержании определяемого вещества в пробе выше предела обнаружения). Полное описание предложенного метода приведено в экспериментальной части и МР ФМБА [263].

В усовершенствованном методе расширенного токсиколого-аналитического скрининга использованы идентичные подходы при анализе летучих и нелетучих органических соединений, что позволяет систематизировать полученные результаты.

Ограниченные возможности программы AMDIS при обращении к неспецифическим базам данных большого объема (NIST) были подтверждены нами при выполнении НИР "Биопроба-10". Было показано, что автоматическая идентификация летучих компонентов биосред (мочи, цельной крови, гомогенатов тканей) при интерпретации исключительно масс-спектров приводит к многочисленным ложноположительным результатам. Все ложные результаты идентификации могут быть отклонены на основании интерпретации индексов удерживания. Таким образом, обоснована необходимость проведения автоматической идентификации исключительно в формате совместной интерпретации хроматографических и спектральных данных.

Базовый вариант идентификации предполагает обращение в режиме онлайн только к библиотекам масс-спектров. Фактор совпадения в этом случае характеризует степень подобия экспериментального масс-спектра после деконволюции и библиотечного масс-спектра. В программе AMDIS заложена возможность проведения интегрированного поиска по базам данных МС и ИУ. В этом случае итоговый отчет будет содержать только те ответы, которые с заданной степенью совпадения будут соответствовать справочным величинам ИУ и параметрам МС в соответствующих базах данных.

В настоящее время качество и объем баз данных ИУ значительно выше, чем несколько лет назад (так, в БД NIST (версия 2014 года) содержится 276259 масс-спектров для 242477 уникальных соединений и 387463 ИУ для 82868 уникальных соединений). Стоит отметить, что далеко не все вещества обладают физико-химическими свойствами, позволяющие охарактеризовать их газохроматографическими ИУ.

С учетом перечисленных обстоятельств, мы считаем более эффективным обращение к

базам данных ИУ проводить не в автоматическом режиме, а при непосредственном участии аналитика, который принимает решение, какую величину выбрать в качестве справочного ИУ: усредненную из имеющихся вариантов, полученную в наиболее близких экспериментальных условиях (разумеется, при наличии этой информации в базе) или предоставленную наиболее авторитетным источником. Кроме того, если для процесса поиска по данным МС пороговое значение фактора совпадения, как правило, задается одинаковым для всех обрабатываемых пиков в пределах одной масс-хроматограммы, то при идентификации по ИУ этот порог может иметь плавающее значение и "назначается" аналитиком с учетом комплекса сопутствующих обстоятельств.

Анализ паровой фазы в режиме твердофазной микроэкстракции позволяет проводить идентификацию токсикологически актуальных легколетучих соединений, (алкоголь, суррогаты алкоголя, технические жидкости). Токсиколого-аналитические задачи, решаемые включением анализа паровой фазы, приведены на рисунке 18.



Рисунок 18 — Классификация типичных задач токсикологического скрининга

Основными преимуществами парового анализа являются: простота, малое время анализа, высокая чувствительность (в режиме твердофазной микроэкстракции), хорошая точность,

возможность автоматизации и отсутствие растворителей в аналитической процедуре, что позволяет минимизировать вторичное загрязнение пробы [287,288]. Анализ сконцентрированной паровой фазы является хорошей альтернативой прямому газохроматографическому анализу экстрактов (без дериватизации), поскольку, в отличие от последнего, не приводит к значительному загрязнению хроматографической системы.

3.1.1. Выявление и систематизация неэтанольных маркеров алкогольной интоксикации

Этиловый спирт и его суррогаты, согласно отечественной статистике, наиболее часто служат причиной острых отравлений. Алкогольная интоксикация зачастую сочетается с отравлениями окисью углерода, уксусной кислотой, снотворными (в основном барбитуратами и смесями различных лекарственных средств психотропного действия), средствами бытовой химии (преимущественно фосфорорганическими соединениями), трициклическими антидепрессантами и др. Воздействие алкоголя на организм не только провоцирует неадекватное поведение, в результате которого происходят случайные отравления, но и часто провоцирует суицидальные попытки. Установление факта отравления алкоголем, а также факта наличия алкоголя в организме в связи с другими инцидентами являются практически важными задачами.

Методом парофазного анализа возможно определить следующие маркеры алкогольной интоксикации:

1. Этанол;
2. Конгены этанола;
3. Этиловые эфиры жирных кислот;
4. Маркеры кетоацидоза;
5. Уксусную кислоту.

Конгены этанола это неэтанольные компоненты алкогольных напитков. В крови в качестве конгенов обычно обнаруживаются: метанол, ацетон, изопропанол, пропанол-1, бутанон-2, бутанол-2, изобутанол, бутанол-1, 3-метилбутанол, 2-метилбутанол. Ацетон и пропанол-2 образуются также в результате реципрокного метаболизма алкоголя с участием алкогольдегидрогеназы.

Этиловые эфиры жирных кислот — маркеры тяжелого алкогольного отравления, рассматриваются как токсичные медиаторы повреждения клеток, вызванного воздействием алкоголя, обнаруживаются в органах в высоких концентрациях. Этиловые эфиры жирных кислот вовлечены в такие процессы как патологические изменения липидного обмена и спровоцированный потреблением алкоголя панкреатит. Этиловые эфиры жирных кислот, обнаруживаемые в печени и жировой ткани, в работе [289] рекомендовано рассматривать как посмертные маркеры алкогольного отравления. Этиловые эфиры жирных кислот — продукты, так называемого, неокислительного метаболизма спиртов.

Кетоновые тела являются маркерами кетоацидоза: ацетон, ацетоацетон, β -гидроксипутират. Прямой продукт метаболизма этанола — ацетальдегид, разносится из печени циркулирующей крови. В свободном виде в крови и тканях трупа его трудно обнаружить, т.к. он химически чрезвычайно активен и образует основания Шиффа с аминокислотами и аддукты с некоторыми белками. Методами протеомики возможно определение модифицированного ацетальдегидом альбумина. При взаимодействии с катехоламинами ацетальдегид образует дигидрокситетрагидроизохинолины. Наиболее представлен в этой группе салсолинол (1-метил-6,7-дигидрокси-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин), образующийся в результате неэнзиматической циклизации допамина с ацетальдегидом и представляющий собой рацемическую смесь 2-х энантиомеров. По второму пути салсолинол образуется при конденсации допамина с пируватом, с последующим ферментативным декарбокислированием и восстановлением. Нор-салсолинол (6,7-дигидрокси-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин) образуется при конденсации допамина с ацетальдегидом.

Нелетучий салсолинол определяют методом ГХ-МС после дериватизации. Масс-спектр ди-ТМС эфира имеет лишь один интенсивный сигнал m/z 308. Устойчивым продуктом окислительного метаболизма этанола является уксусная кислота.

Этилглюкуронид — прямой метаболит алкоголя, соединение нелетучее, и методом ГХ-МС не определяется, поэтому для его определения требуется предварительное силилирование или ацилирование.

Постановка диагноза [290] и назначение адекватной терапии, как синдрома алкогольной зависимости, так и соматической патологии алкогольного генеза нередко зависит от своевременного установления факта злоупотребления алкоголем, поскольку большинство пациентов либо отрицают употребление алкоголя, либо значительно занижают его количество.

Для выявления острой алкогольной интоксикации или установления факта употребления алкоголя определяют содержание алкоголя в крови, моче и выдыхаемом воздухе. При отсутствии диагностически значимых концентраций алкоголя в крови, можно считать, что пациент не употреблял алкоголь в течение 6-8 часов. Быстрое окисление алкоголя определяет необходимость измерения уровней его метаболитов. Повышенное содержание в крови ацетальдегида, β -гидроксипутирата, а также молочной и яблочной кислот свидетельствует о приеме спиртных напитков в течение прошедших 24 часов. Эти тесты нашли применение только при проведении криминалистической экспертизы и не имеют клинического значения. Наиболее перспективным тестом для контроля за абстиненцией является определение этилглюкуронида. Этилглюкуронид, являясь прямым метаболитом алкоголя, определяется в моче уже через несколько часов после алкогольного эксцесса и сохраняется на протяжении 5 дней. Высокочувствительными методами является также определение в крови нескольких неокисленных прямых метаболитов этанола — этиловых эфиров жирных кислот, которые

выявляют в течение 24 часов после алкоголизации, и фосфатидилэтанола, который определяется в течение 2 недель после длительной алкоголизации (7-14 дней).

В то же время, определение собственно этанола остается ключевой задачей диагностики. У 2-х из 12 пациентов токсикологической реанимации НИИ им. Джанелидзе в моче и крови обнаружено повышенное содержание этанола.

В рамках прижизненной диагностики воздействия алкоголя на организм важным моментом является определение конгенов — сопутствующих этанолу соединений. Это различные кислородсодержащие низкомолекулярные соединения. Наиболее проблемными, с точки зрения парофазного анализа, являются спирты. Несмотря на то, что спирты — полярные соединения, они более эффективно извлекаются на угольное микроволокно.

Апробация определения конгенов этанола в моче

Для определения предела обнаружения спиртов в моче были приготовлены образцы воды с различным содержанием спиртов (концентрация изопропанола, пропанола, 2-бутанола, изобутанола, 1-бутанола, изопентанола 200 нг/мл, этанола 400 нг/мл, метанола 4000 нг/мл). В таблице 19 представлены результаты, полученные при использовании микроволокон 70 μm Carbowax/DVB и 50/30 μm DVB/Carboxen/PDMS StableFlex.

Таблица 19 — Результаты идентификации спиртов в моче при использовании различных микроволокон для извлечения спиртов из мочи

RT, мин	Компоненты модельной смеси	50/30 μm DVB Carboxen/PDMS StableFlex	70 μm Carbowax/DVB
6.108	Метанол	+	-
10.090	Этанол	+	-
12.797	Изопропанол	+	-
14.125	Пропанол	+	-
16.443	2-Бутанол	+	-
17.173	Изобутанол	+	-
17.833	1-Бутанол	+	-
20.774	Изопентанол	+	-

Пределы обнаружения конгенов спиртов в моче при использовании метода ГХМС-ТФМЭ приведены в таблице 20. Приведенные пределы обнаружения установлены при анализе искусственной смеси веществ — конгенов этанола, внесенных в мочу. Исходную смесь готовили в ацетонитриле. Последовательные разведения проводили деионизованной водой. Смесь вносили в биопробы в концентрациях 5, 10, 400, 500 и 1000 нг/мл. Предел обнаружения соответствовал отношению сигнал: шум 1:10.

Таблица 20 — Пределы обнаружения конгенов этанола в воде и моче, в рамках метода ГХМС-ТФМЭ с использованием микроволокна 50/30 μm DVB Carboxen/PDMS StableFlex

Вещество	Предел обнаружения, нг/мл	
	в воде	в моче
Метанол	1000	1000
Этанол	400	400
Ацетон	10	5*
Бутаналь	500	500
Бутилацетат	10	10
Изопропанол	500	500
Пропанол	500	500
2-Бутанон	10	10
Этилацетат	10	10*
Бутанол-2	500	500
Изобутанол	500	500
Бутанол-1	500	500
2-Пентанон	10	10
Пентаналь	500	500
Пропилацетат	5	-*
Изоамиловый спирт	500	500
Пентанол	500	500
2-Гексанон	50	10

Примечание: * фоновые уровни отличны от нулевых.

В таблице 21 приведены маркеры алкогольной интоксикации — этиловые эфиры жирных кислот.

Таблица 21 — Этиловые эфиры жирных кислот как маркеры алкогольной интоксикации

Название	М.в.	Мол. формула	Примечание
Этиллаурат	228.4	$\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}_2$	Обычно обнаруживается и у лиц, не подвергшихся воздействию, поэтому не включен в общий список
Этилмиририлат	256.4	$\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$	-
Этилпальмитат	284.5	$\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$	Установлена патологическая концентрация 2.0 нмоль/г
Этилпальмитолеат	282.5	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$	-
Этилстеарат	312.5	$\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{O}_2$	-
Этилолеат	310.5	$\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{O}_2$	Одиночный биомаркер [291]
Этиллинолеат	308.5	$\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{O}_2$	-
Этиллиноленат	306.5	$\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_2$	-
Этиларахидонат	332.5	$\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}_2$	-
Этилгептадеканоат	298.5	$\text{C}_{19}\text{H}_{38}\text{O}_2$	Внутренний стандарт, не является эндогенным продуктом

Проведенные исследования показали, что пределы обнаружения конгенов этанола в моче и крови при использовании микроволокна типа 50/30 μm DVB Carboxen/PDMS StableFlex очень сильно зависят от природы вещества и мало зависят от типа матрицы.

3.1.2. Идентификация органических соединений в пробах крови и мочи пациентов

В качестве экспериментальной модели для апробации метода определения органических соединений в крови и моче, включающего рекомендации по подготовке к анализу, ГХ-МС анализу и интерпретации данных, использованы пробы мочи и крови пациентов токсикологической реанимации НИИ скорой помощи им. Джанелидзе. Пробы были отобраны медперсоналом отделения и доставлены в лабораторию аналитической токсикологии ФГУП "НИИ ГПЭЧ" [80].

Таблица 22 — Результаты токсиколого-аналитического скрининга образцов биологических жидкостей пациентов НИИ им. Джанелидзе.

Номер	Предполагаемая причина отравления	Ксенобиотики, выявленные в биологических образцах
1	Отравление неустановленной смесью лекарств	Этиловый спирт. Обнаружен методом HS-SPME.
2	Отравление феназепамом	Дифенилгидрамин (димедрол, <i>N,N</i> -диметил-2-(дифенилметокси)-этиламин). Идентифицирован в нативной форме, т.к. не вступает в реакции дериватизации. Толуол. Обнаружен в крови методом HS-SPME, в моче пациента обнаружен его метаболит, <i>n</i> -крезол, идентифицирован в виде ТМС-эфира). При обнаружении в значительных количествах свидетельствует об отравлении техническими жидкостями.
3	Отравление анаприлином и донормилом	Донормил (доксиламин, 2-[α -(диметиламино)-этокси]- α -метилбензил]-пиридин). Идентифицирован в нативной форме, т.к. не вступает в реакции дериватизации. Фенобарбитал (5-Этил-5-фенил-2,4,6(1H,3H,5H)-пиримидинтрион). Идентифицирован в виде ТМС-эфиров, ТБДМС-эфиров и диметилловых эфиров.
4	Отравление донормилом	Ксенобиотиков не обнаружено
5	Нет данных	Этиловый спирт. Обнаружен методом HS-SPME. Амфетамин. Обнаружен в виде ТМС-эфира, трифторацетильного и ацетильного производного.
6	Отравление феназепамом	Этиловый спирт. Обнаружен методом HS-SPME.
7	Отравление гамма-оксибутиратом натрия (ГОМК)	Диэтилтиокарбаминовой кислоты метиловый эфир (метил-ДТК) — активный метаболит дисульфирама, используемого в препаратах типа "Эспераль".
8	Отравление феназепамом	Феназепам. Седативное средство. Обнаружен в нативном виде наряду с тремя его метаболитами: оксазепамом, темазепамом и нордазепамом.
9	Нет данных	Корвалол (валидол и т.п.). Обнаружены фенобарбитал (см. п. 3) и этиловый эфир 2-бромизовалериановой кислоты в количествах значительно превышающих терапевтические.
10	Отравление аминазином	Аминазин (хлорпромазин, 2-хлор-10-[3-диметиламинопропил]фенотиазин). Нейролептик. Идентифицирован в нативной форме, т.к. не вступает в реакции дериватизации.
11	Отравление опиатами	Карбпромал (адалин, <i>N</i> -аминокарбонил)-2-бром-2-этилбутанамид. Снотворное средство. Обнаружен в виде ТМС- и ТБДМС-производных.

Результаты токсиколого-аналитического скрининга приведены в таблице 22. Наряду с результатами скрининга указаны предполагаемые причины отравления, выявленные в основном по результатам опроса пациентов.

Из таблицы 22 следует, что данные химико-токсикологического анализа, проведенного методом ГХ-МС, существенно дополняют и корректируют априорные сведения о причинах отравления. В рамках ГХ-МС скрининга весь объем итоговой информации мог бы быть получен и в отсутствие априорных сведений о причинах отравления, что свидетельствует об эффективности примененного методического подхода.

Из всех пациентов образцы которых были исследованы двое представляют особый интерес так как у них наблюдались признаки острого отравления неясной этиологии.

3.1.3. Идентификация органических соединений в пробах крови и мочи пациента "А"

В лабораторию аналитической токсикологии ФГУП "НИИ ГПЭЧ" поступили образцы биологических проб пациента А с признаками острого отравления в состоянии почечной комы. Пробы представляли собой: охлажденную цельную кровь, замороженную цельную кровь, замороженную плазму крови, два образца замороженной мочи.

По результатам общего токсикологического скрининга биологических проб с использованием методов газовой хромато-масс-спектрометрии было выявлено наличие следующих ксенобиотиков или их метаболитов (помимо тех, которые входили в курс терапии в стационаре):

1. Диазепам (седативное), подтверждено методом ГХ-МС/МС, выявлены метаболиты (оксазепам, нордазепам и темазепам);
2. Анальгин (обезболивающее), выявлен метаболит (ацетилметамизол);

В качестве причины экзогенной токсикации может рассматриваться диазепам в сочетании с анальгином.

Подтверждение идентификации и количественное определение содержания препарата диазепам в биожидкостях выполняли с использованием газового хромато-масс-спектрометра с тройным квадруполом Agilent 7000. В качестве образца сравнения был приготовлен раствор из препарата "Релиум", содержащего 5 мг диазепама. Конечная концентрация использованного раствора составляла: 4,51 мкг/мл. В таблице 23 приведены концентрации диазепама в биологических образцах.

Таблица 23 — Результаты количественной оценки содержания препарата Диазепам в биожидкостях пациента "А"

Маркировка	Концентрация, нг/мл
Плазма крови	204
Моча 1*	10
Моча 2*	15
Кровь (замороженная)	144
Кровь (охлажденная)	107

* — отобраны в первый и второй день пребывания в стационаре.

Употребление пациентом "А" препарата диазепам подтверждено наличием метаболитов диазепама (нордиазепама, темазепама и оксазепама) в образцах. Данные о переходах ММР этих соединений взяты из оригинальной статьи [292]. Времена удерживания составляют: диазепам — 22.3 мин, нордиазепам — 20.8 мин темазепам — 23.6 мин, оксазепам — 21.7 мин. Таким образом, идентификация диазепама и его метаболитов может рассматриваться как бесспорная.

Была проведена ориентировочная оценка возможной дозы принятого препарата, содержащего диазепам: концентрация в крови на третий день составила 107 нг/мл, следовательно, принимая во внимание период полувыведения препарата (21-37 ч), максимальная концентрация (через 1.5 часа после возможного приема), составила бы приблизительно 600 нг/мл (с ошибкой не более 25%).

Бензодиазепины, и диазепам в том числе, редко вызывают кому, однако в оригинальных работах описано достаточно большое количество таких эпизодов [293]. При этом отмечается, что тяжелые последствия передозировки диазепама (кома, смерть) наступают в случае его сочетания с алкоголем или некоторыми лекарственными препаратами. Согласно литературным данным, терапевтическая концентрация диазепама в крови колеблется в широких пределах (10-100 нг/мл). С мочой выделяется около 10% дозы препарата. Соотношение концентраций диазепама в крови и моче по результатам анализа биопроб, отобранных как в день поступления в стационар, так и через сутки составляет приблизительно 10:1. Данное обстоятельство свидетельствует в пользу трактовки высоких концентраций диазепама в биожидкостях как следствия скорее передозировки, чем накопления препарата в организме после его длительного приема. Гипотеза передозировки подтверждается также высоким соотношением концентраций диазепама и нордиазепама в плазме крови — (10:1). Согласно литературным данным [294], если это соотношение больше, чем 3:1, следует сделать вывод о передозировке, а не хроническом воздействии.

3.1.4. Идентификация органических соединений в пробах крови и мочи пациента "Б"

В лабораторию аналитической токсикологии ФГУП "НИИ ГПЭЧ" поступили образцы биологических проб пациента "Б" с симптомами острого отравления. Пробы представляли собой: цельную кровь, сыворотку крови и образец мочи.

По результатам общего токсикологического скрининга биологических проб с использованием методов газовой хромато-масс-спектрометрии было выявлено наличие следующих ксенобиотиков или их метаболитов:

3. Метоклопрамид (обезболивающее);
4. Пропрофол (препарат для ИВЛ);
5. Трамадол (наркотический анальгетик), выявлены метаболиты (продукты О- и N-деметилирования трамадола);
6. Лидокаин (обезболивающее);
7. Анальгин (обезболивающее) обнаружен в скрининге в виде метаболита (ацетиламиноантипирин), не подтвержден в дальнейшем или присутствует в следовых количествах;
8. Неизвестное экзогенное соединение идентифицированное, впоследствии, как N,N-диметиламинофенол.

Количественный анализ содержания трамадола в образце мочи пациента "Б" методом ГХ-МС/МС.

В пробах мочи пациента "Б" были обнаружены трамадол и его метаболиты. Так как стандарт трамадола в период исследований был недоступен, были выполнены подтверждение и полуколичественная оценка содержания трамадола в моче пациента методом ГХ-МС/МС. В крови следы трамадола обнаружены на качественном уровне. Обнаружение трамадола и его метаболитов в моче методами ГХ-МС в режиме регистрации полного ионного тока и методом ГХ-МС/МС в режиме детектирования ММР-переходов можно считать двумя независимыми методами.

В лаборатории был проведен полуколичественный анализ содержания трамадола с использованием метода ГХ-МС/МС, с использованием *m*-фторбензойной кислоты в качестве вещества сравнения для приблизительной оценки содержания трамадола в исследованных биожидкостях. Для этого был приготовлен стандартный раствор *m*-фторбензойной кислоты в ацетонитриле с концентрацией 10 мкг/мкл, который был дериватизирован МСТФА, как указано выше. Итоговое содержание стандарта в пробе составило 20 мкг.

Содержание трамадола в моче пациента "Б" составляло приблизительно 7 мкг/мл. Содержание О-дезметилтрамадола (активный метаболит) составляло 2 мкг/мл. Содержание N-дезметилтрамадола (неактивный метаболит) — 0.5 мкг/мл.

Суммарная концентрация трамадола и его метаболитов в моче, согласно ориентировочной оценке, составляла 10 мкг/л. Интерпретировать данную концентрацию можно только зная сроки приема (введения) трамадола. Из литературы известно, что передозировка трамадола вызывает судороги, потерю сознания, тяжелые поражения печени [295,296].

Терапевтическая доза трамадола составляет 50-100 мг (в одной таблетке содержится 50 мг) разово 4-6 раз в день, всего максимальная рекомендуемая доза составляет 400 мг/день. Максимальная концентрация в плазме достигается через 2 часа, объем распределения 3 л/кг. Связывание протеинами плазмы — 20%. Период полувыведения составляет 5 часов.

Установление структуры обнаруженного экзогенного соединения, идентифицированного как N,N-диметиламинофенол.

В образце дериватизированного МСТФА экстракта из мочи в значительной концентрации было обнаружено неизвестное экзогенное соединение, масс-спектр которого отсутствует в базах данных [51]. Масс-спектр ИЭ (70 эВ, $I_{\text{отн}} \geq 10\%$): 210 (10), 209 (48), 208 (71), 194 (21), 182 (6), 181 (16), 180 (100), 179 (14), 164 (11), 73 (15). В крови это соединение было обнаружено в следовых количествах.

Для установления структуры неизвестного соединения было выполнено следующее:

1. Проведена дериватизация экстрактов из мочи пациента уксусным ангидридом для получения ацетильного производного аналита.
2. Проведен хромато-масс-спектрометрический анализ недериватизированного экстракта для получения справочных характеристик исходного соединения.
3. Получен масс-спектр неизвестного соединения с использованием масс-анализатора с тандемным детектированием (ГХ-МС/МС).

При анализе ацилированного (уксусным ангидридом) экстракта из мочи пациента был идентифицирован N,N-диметиламинофенилацетат — дериватизированная форма N,N-диметиламинофенола, что подтвердило структуру, предположительно предсказанную при интерпретации масс-спектра ТМС-производного.

N,N-диметиламинофенол был также обнаружен в нативном виде при прямом анализе экстракта мочи (без дериватизации). Масс-спектр ИЭ (70 эВ, $I_{\text{отн}} \geq 10\%$): 137 (82), 136 (100), 121 (13), 108 (10), 94 (10), 65 (10).

Исследование характера фрагментации ионов 208 и 209 (диссоциативная ионизация соударением, ДИС) в масс-спектре ТМС-эфира N,N-диметиламинофенола показало, что действительно пик молекулярного иона составляет всего 70% интенсивности сигнала [M-1]. Указанное обстоятельство затрудняло интерпретацию масс-спектра. Спектры ДИС при энергии коллизии 20В приведены в таблице 24.

Таким образом, N,N-диметиламинофенол был обнаружен в моче как в нативном виде, так и в виде двух разных производных, что свидетельствует о высоком уровне надежности идентификации [51].

Таблица 24 — Масс-спектры ДИС ионов-фрагментов ТМС-эфира N,N-диметиламинофенола. Энергия соударений 20 В.

Ион-прекурсор, m/z	Масс-спектр ДИС [20В, $m/z \geq 45$, $I_{\text{отн}} \geq 5\%$]
164 [M-H-N(CH ₃) ₂]	164 (51), 162 (37), 149 (65) [M-CH ₃], 136 (55), 120 (50), 118 (7), 104 (8), 92 (100), 91 (5), 77 (7), 65 (5), 45 (10)
180 [M-29]	180 (100), 179 (13), 165 (11) [M-CH ₃], 164 (36), 150 (15), 111 (7), 106 (59), 79 (28), 77 (8), 75 (9)
194 [M-CH ₃]	194 (4), 179 (24) [M-CH ₃], 178 (4), 164 (100), 136 (4), 120 (9)
208 [M-H]	208 (37), 193 (100)[M-CH ₃], 178 (37), 136 (20), 73 (78) [Si(CH ₃) ₃]

По литературным данным [297] было установлено, что N,N-диметиламинофенол может быть метаболитом препарата неостигмин, "3-(диметилкарбамоилокси)-N,N,N-триметилбензоламмоний" (рисунок 19):

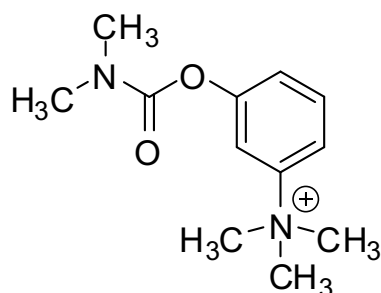


Рисунок 19 — Структурная формула неостигмина

Подтверждение обнаружения препарата неостигмин в моче может быть выполнено только методами жидкостной хроматографии, так как целевое соединение представляет собой четвертичную аммониевую соль.

Неостигмин входит в состав отечественного препарата "Прозерин" в виде метилсульфата неостигмина. Для подтверждения обнаружения был приготовлен стандарт препарата "Прозерин", представляющего собой неостигмина метилсульфат с концентрацией 0.5 мкг/мл. На рисунке 20 приведена схема метаболизма неостигмина.

С использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-селективным детектированием точных масс (использован прибор LTQ Orbitrap Velos с орбитальной ионной ловушкой), были определены основные хромото-масс-спектрометрические характеристики неостигмина (см. таблицу 25).

Методом ВЭЖХ-МС/МС подтверждено обнаружение диметиламинофенола в моче пациента "Б". Теоретически вычисленная масса протонированной формы диметиламинофенола составляет 138.09189 а.е.м. Экспериментально измеренное значение — 138.09117 а.е.м. Погрешность определения массы — 5 ppm.

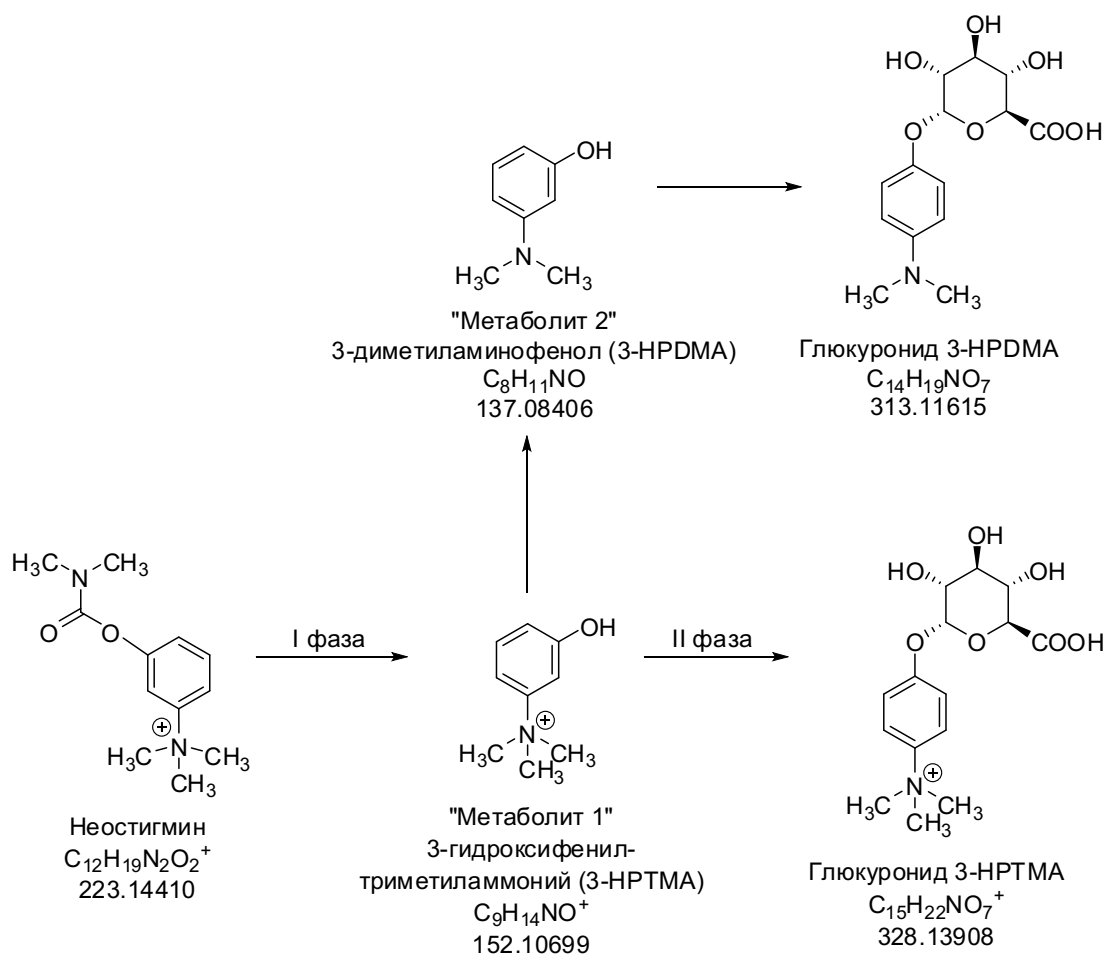


Рисунок 20 — Схема метаболизма неостигмина. Показано образование метаболитов первой и второй фазы метаболизма (глюкурониды) [297]

При регистрации диметиламинофенола по точной массе был выявлен еще один метаболит, о котором в доступной литературе встречается упоминание как о неизвестном метаболите неостигмина. Точная масса этого метаболита полностью совпадает с определенной массой диметиламинофенола, что говорит об изомерии.

Таблица 25 — Основные аналитические характеристики препарата неостигмин

Время удерживания	8.29 ± 0.29 мин
Теоретически вычисленное значение массы	223.1441 а.е.м.
Экспериментальное значение массы	223.1432 а.е.м.
Погрешность определения массы	4.03 ppm
МС2 переход неостигмина, энергия коллизии 30В	223.10 (±0.25 а.е.м.) => 208.1188
Теоретически вычисленное значение массы иона-продукта	208.12118 а.е.м.
Экспериментальное значение массы иона-продукта	208.11882 а.е.м.
Погрешность определения массы иона-продукта	11.3 ppm

При анализе не был обнаружен метаболит — 3-гидроксифенилтриметил-аммоний, равно как и его глюкуронид, упоминающиеся в [297].

Для исключения возможных ложноположительных результатов из-за загрязнения хроматографической системы или мешающего влияния биогенных соединений была

зарегистрирована масс-хроматограмма заведомо чистой пробы мочи. Показано, что обнаружение неостигмина и его метаболита не может быть объяснено различными мешающими влияниями.

Аналогичным образом был проведен ВЭЖХ-МС/МС анализ сыворотки крови пациента "Б". Обнаружены следы неостигмина. Диметиламинофенол не обнаружен, что косвенно свидетельствует о его метаболическом происхождении.

Количественная оценка содержания неостигмина в моче пациента "Б" составляет 1.84 мкг/мл. В сыворотке крови — 1.2 нг/мл. Содержание свободного N,N-диметиламинофенола в моче — приблизительно 4.54 мкг/мл. Содержание N,N-диметиламинофенола в виде глюкуронида — 7.74 мкг/мл. Общее содержание неостигмина и его метаболитов в моче составляет приблизительно 14 мкг/мл.

Известен пример возможного использования неостигмина (прозерина) в криминальных целях⁴. Не исключено, что южнокорейского консула Чой Дук Кина, убитого неизвестными преступниками 1 октября 1996 г. во Владивостоке, предварительно подвергли воздействию прозерина в токсической дозе. Наличие в теле консула сильнодействующего медицинского препарата — прозерина или неостигмина метилсульфата было показано в результате двух независимых экспертиз.

В результате апробации показано, что использование различных типов дериватирующих агентов, наряду с анализом экстрактов без дериватизации, значительно повышает надежность идентификации [51]. Так, масс-спектр триметилсилильного эфира N,N-диметиламинофенола не содержится ни в одной библиотеке масс-спектров, и только анализ ацетилированного экстракта и недериватизированного экстракта позволил установить структуру и обнаружить факт употребления сильнодействующего препарата — прозерина.

3.1.5. Апробация метода идентификации органических соединений в межлабораторном тесте

Для апробации разработанных методических рекомендаций ([263]), был проведен межлабораторный тест совместно с ООО "Аналит Продактс". По условиям теста в лабораторию аналитической токсикологии был представлен пулированный образец мочи, содержащий наркотические препараты.

Далее было проведено исследование полученного образца с целью выявления лекарственных, наркотических или других препаратов, или их метаболитов в представленном образце. Расширенный токсикологический скрининг был проведен с использованием газового хроматомасс-спектрометра Shimadzu QP2010plus и методических рекомендаций [263].

⁴ по сообщению газеты «Владивосток» от 09.12.1996 г. <http://old.vladnews.ru/magazin>.

Идентификация компонентов пробы проводилась по масс-спектрам электронного удара с последующей проверкой результата идентификации по индексам удерживания. По результатам общего токсикологического скрининга биологической пробы с использованием метода газовой хроматомасс-спектрометрии было выявлено наличие следующих ксенобиотиков или их метаболитов (см. таблицу 26).

Проверка полученных результатов автоматической интерпретации масс-спектров была выполнена путем сравнения экспериментально зарегистрированных газохроматографических линейных ИУ с доступными библиотечными.

Таким образом, пик с временем удерживания 16.786 не может быть идентифицирован как пик папаверина, так как разница между его ИУ с библиотечным более 1000 ед.инд. В случае остальных пиков разницы между ИУ также составляют значительные величины (от 40 до 100 ед.инд.), что в одних случаях можно объяснить погрешностями при составлении библиотек, в других явно требует дополнительной проверки.

Таблица 26 — Результаты обнаружения ксенобиотиков в образце мочи

Время удерживания, мин	Название	Библиотечный ИУ, ед.инд.	Экспериментальный ИУ, ед.инд.	Библиотека
16.7860	<i>Папаверин</i> **	2825	1659	M/N*
14.080	Пропофол	1346	1447	M/N
25.4070	Диазепам	2436	2536	M/N
26.0385	Хлорпромазин	2525	2612	M/N
30.2860	Галоперидол	2942	3125	M/N
29.187	Галоперидол-ТМС	2965	2992	M/N
23.59	Метаболит (1) хлорпромазина	2100	2335	M
29.86	Метаболит (2) хлорпромазина	2990	3073	M
29.100	Галоперидол-Н ₂ O	2915	2981	M
18.36	Пировалерон	1882	1794	M/N
31.100	AB-CHMINACA	3162	3212	C

*Примечание: * M — библиотека Pfleger-Maurer-Weber 2007, N — NIST/EPA/NIH 2008, C — библиотека каннабиноидов и каннабимиметиков; ** — Идентификация папаверина впоследствии трактована как ложная по результатам интерпретации ИУ и проверки независимым методом (ВЭЖХ-МС/МС).*

В последней колонке таблицы приведено указание на библиотеку, содержащую искомый масс-спектр или ИУ. Стоит отметить, что масс-спектр соединения с временем удерживания 31.100 мин, идентифицированного как компонент т.н. курительных смесей, не содержится в общеизвестных библиотеках NIST или PMW, и включен только в "Библиотеку каннабиноидов, каннабимиметиков и их метаболитов". Структуры обнаруженного синтетического каннабиноида "AB-CHMINACA" и его метаболита приведены на рисунке 21.

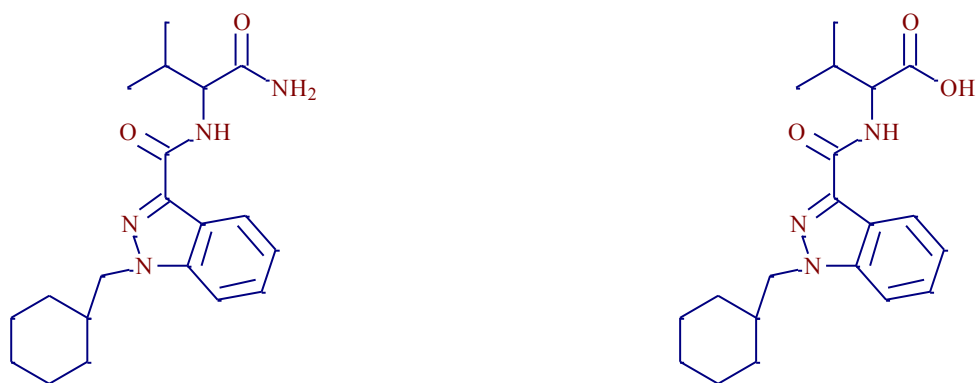


Рисунок 21 — Структурные формулы синтетического каннабиоида "АВ-СНМІNАСА" (слева) и его метаболита (справа)

Для подтверждения полученных результатов был проведен анализ пробы мочи независимым методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения на приборе фирмы Thermo Scientific — Orbitrap Velos. Идентификацию компонентов из выше указанной таблицы проводили по их точным молекулярным массам. При идентификации искомых соединений отклонение в точности масс определяемых компонентов составляло менее 1 ppm. Полученные масс-хроматограммы представлены на рисунке 22.

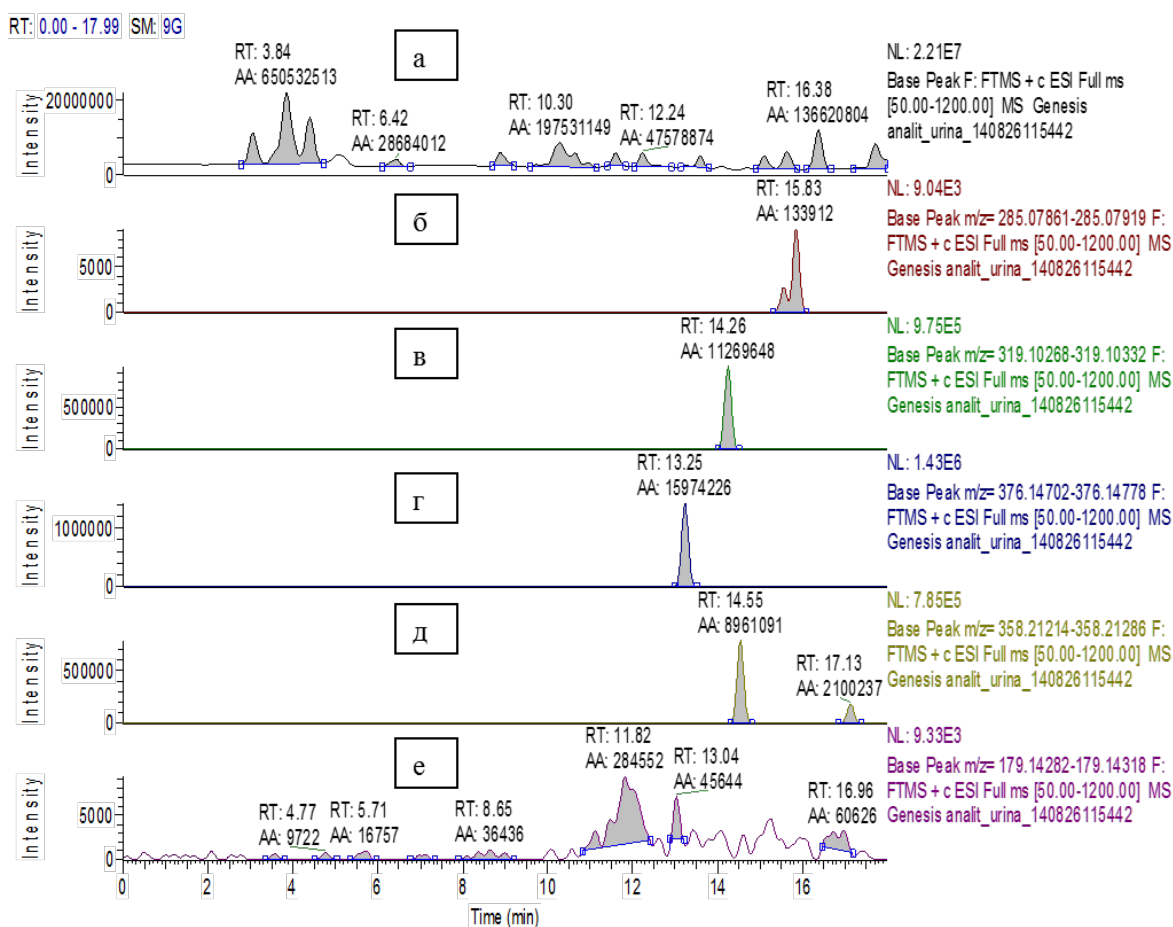


Рисунок 22 — Масс-хроматограммы пробы мочи, реконструированные: а) по общему ионному току; б) по m/z (M+H)⁺ диазепам (285.0789); в) по m/z (M+H)⁺ хлорпромазина (319.1030); г) по m/z (M+H)⁺ галоперидола (376.1474); д) по m/z (M+H)⁺ одного из метаболитов АВ-СНМІNАСА (358.2125); е) по m/z (M+H)⁺ пропофола (179.1430)

Согласно результатам, полученным при апробации методических рекомендаций в межлабораторном тесте, все лекарственные и наркотические препараты, содержащиеся в биологическом образце, были успешно обнаружены. Обнаружение подтверждено методом ВЭЖХ-МС высокого разрешения. Ложноположительные результаты отсутствуют.

3.2. Обнаружение и идентификация биомаркеров экспозиции органическими соединениями

3.2.1. Обнаружение и идентификация биомаркеров экспозиции ФОР методом газовой хроматографии с тандемным масс-селективным детектированием

Одной из задач аналитической токсикологии является диагностика отравлений разной степени тяжести. Для подтверждения диагноза отравления, в первую очередь необходимо идентифицировать негативный химический фактор методами, позволяющими обнаружить максимальное количество значимых ксенобиотиков, которые, возможно, присутствуют в биологических образцах. Не менее важной задачей является измерение концентраций токсикантов и/или их метаболитов в биопробах в целях оценки полученной дозы [31].

Кроме того, идентификация ксенобиотиков и оценка полученных доз необходима в рамках биоаналитического мониторинга. Преимущество биомониторинга заключается в совокупной оценке абсорбированной дозы токсиканта, поступившего в организм различными путями, что особенно актуально для тех соединений, поступление которых в организм может происходить различными путями. Например, сценарий экспозиции пестицидами может значительно отличаться в различных сферах деятельности человека. Для людей, не связанных с производством и применением пестицидов, наиболее вероятен пероральный путь их поступления в организм с питьевой водой и продуктами. Нередки случаи отравления пестицидами при использовании в быту канистр и других емкостей, в которых ранее находились пестициды. Для лиц, профессиональная деятельность которых связана с производством или применением пестицидов, основными путями поступления пестицидов в организм является кожно-резорбтивный, а также ингаляционный. Зачастую через кожу рук и других незащищенных участков тела в организм поступает более 50% общей дозы [298]. Абсорбция через желудочно-кишечный тракт в производственных условиях обычно менее значима и возникает по причине заглатывания больших частиц, депонированных в верхних дыхательных путях [299,300,301].

Разработка чувствительных, селективных и валидированных аналитических методов — необходимое условие проведения биоаналитического мониторинга. Достижение пределов обнаружения на уровне ppb и ниже позволяет проводить мониторинг не только профессионально обусловленного воздействия пестицидов, но и низкоуровневого хронического воздействия пестицидов, присутствующих в окружающей среде. В РФ отсутствовали методики для оценки низкоуровневого воздействия пестицидов на человека средствами биоаналитического мониторинга. В

США и странах ЕС методики для биоаналитического мониторинга пестицидов в крови, моче, грудном молоке, амниотической жидкости и других биопробах разрабатываются и применяются в целях охраны здоровья населения в рамках крупных государственных программ. В современных методиках низкие пределы обнаружения и надежность определения пестицидов в биопробах достигаются за счет применения масс-спектрометрии высокого разрешения и изотопномеченых стандартов [302]. Наши исследования показали, что требуемые чувствительность и надежность анализа могут быть получены в рамках менее затратных решений.

В данном разделе приведены результаты разработки методического подхода, включающего методику количественного определения ФОП в моче и крови, идентификацию метаболитов в биологических образцах, апробацию разработанного метода в токсикологическом эксперименте на лабораторных животных, а также установление возможности сочетания методов расширенного токсиколого-аналитического скрининга и биоаналитического мониторинга в рамках унифицированных процедур инструментального анализа.

В группу определяемых ФОП включены актуальные пестициды, за исключением высоко-токсичного дихлофоса, который не разрешен для применения в настоящее время, но фактически полностью не исключен из обращения, и, кроме того, является метаболитом лекарственного средства Метрифонат.

Результатом работы является аттестованная методика измерений массовых концентраций фосфорорганических пестицидов в биопробах методом газовой хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (свидетельство об аттестации методики измерений № 222.0320/01.00258/2013), предел обнаружения составляет 1 нг/мл. В токсикологическом эксперименте выявлены метаболиты ФОП и определены периоды детектирования токсикантов в биожидкостях после их перорального поступления в организм.

При попадании в организм пестициды энзиматически преобразуются в оксоны, которые взаимодействуют с холинэстеразой. Оксоны далее могут гидролизироваться до диалкилфосфатов (ДАФ): О,О-диметилфосфат (DMP), О,О-диэтилфосфат. Если же оксон не образуется, тогда конечным продуктом метаболизма может быть диалкилтиофосфат и/или диалкилдитиофосфат: О,О-диметилфосфоротиоат, О,О-диэтилфосфоротиоат, О,О-диметилфосфородитиоат и О,О-диэтилфосфородитиоат [303,304]. Эти метаболиты и/или их глюкурониды выводятся с мочой и могут служить маркерами воздействия ФОП на организм [305]. Определение диалкилфосфатов является единственным способом установления экспозиции человека низкими дозами ФОП в течение длительного времени [306].

В основном метаболиты ФОП можно разделить на две категории: специфичные и неспецифичные. К неспецифичным метаболитам ФОП относятся диметилфосфат,

диметилтиофосфат, диметилдитиофосфат, диэтилфосфат, диэтилтиофосфат и диэтилдитиофосфат. Первые три являются диметилфосфатами, остальные — диэтилфосфаты.

ДАФ — высокополярные, водорастворимые соединения, которые требуют дериватизации для определения их методами газовой хроматографии. Диапазон рКа диалкилфосфатов находится в пределах от 1.25 до 1.62 по данным [307], а так как рН мочи колеблется в диапазоне от 4 до 8, ДАФ находятся преимущественно в ионизированной форме [308].

На практике для определения ДАФ в моче используют следующие подходы: твердофазную экстракцию с последующей дериватизацией пентафторбензилбромидом и ГХ-МС-ИЭ [309], ВЭЖХ-МС/МС анализ ДАФ после жидкость-жидкостной экстракции последовательно диэтиловым эфиром и этилацетатом [310], экстракцию смесью диэтилового эфира и ацетонитрила 1:1 [311], лиофилизацию [312]. Согласно методике, разработанной CDC (Центром по контролю и профилактике заболеваний США), предполагается дериватизация ДАФ 1-хлор-3-йодпропаном после предварительного лиофильного высушивания.

Актуальной задачей является установление возможности обнаружения ДАФ не только в рамках целевого анализа, но и в расширенном токсиколого-аналитическом скрининге, поскольку очень часто в начале исследования вещества, послужившие причиной отравления, неизвестны. Схема скринингового исследования представлена на рисунке 23.



Рисунок 23 — Схема проведения исследования образцов крови и мочи на содержание ксенобиотиков. Схема предполагает совмещение количественного определения ФОП методом ГХ-МС/МС и обнаружение ксенобиотиков методами расширенного токсиколого-аналитического скрининга

В результате работы нами был разработан метод биологического мониторинга ФОП, включающий два этапа:

1. Количественное определение ФОП методом ГХ-МС/МС (по аттестованной методике см. раздел 2.9).
2. Идентификация метаболитов ФОП методами расширенного токсиколого-аналитического скрининга с использованием ГХ-МС-SPME, ГХ-МС экстрактов. Подтверждение

результатов идентификации выполняется методом ВЭЖХ-МС высокого разрешения.

Преимуществом используемого подхода является то, что методы качественного и количественного определения включены в один алгоритм, включающий унифицированный метод подготовки проб. Совместное определение целевых соединений и их метаболитов существенно расширяет возможности трактовки полученных результатов.

Использованный метод токсиколого-аналитического скрининга подробно описан в статье [51].

Токсикологический эксперимент: апробация процедур комплексного химического мониторинга на экспериментальных животных была проведена с целью выявления периода детектирования маркеров токсичных и сильнодействующих соединений, а также установления зависимости между полученной дозой токсиканта и концентрацией его маркеров в биологических образцах.

Метаболиты ФОП являются в ряде случаев более надежными и показательными маркерами в сравнении с нативными формами этих соединений. Поиск и количественное определение метаболитов ксенобиотиков соединений является неотъемлемой частью разработки методов установления причин отравлений.

Для идентифицированных метаболитов определены периоды детектирования. Стоит отметить, что идентификация выполнена методом ГХ-МС в режиме сканирования полного ионного тока, то есть при использовании целевых методов анализа чувствительность, а следовательно, и период детектирования будет значительно выше.

Помимо приведенных в таблице 27 идентифицированных метаболитов, часть соединений, выявленных в крови и моче после затравки, не была идентифицирована. Разработанный метод биологического мониторинга позволяет диагностировать отравление ФОП в период до 6 суток после инцидента.

Результаты обнаружения диалкилфосфатов в моче кроликов после затравки ФОП приведены в отдельной таблице 28.

Как видно из таблицы 28, многие диалкилфосфаты неспецифичны для определенного ФОП, однако их обнаружение и количественное определение позволяет судить о химической нагрузке на организм.

Таблица 27 — Идентифицированные метаболиты ФОП в крови и моче кроликов-самцов Приведены брутто-формулы, определены периоды детектирования, указаны методы обнаружения

ФОП и их метаболиты	Методы обнаружения	Период детектирования
Дихлофос. Исходная форма не обнаруживается в крови более 1 часа.		
2,2-дихлорэтанол $C_2H_4Cl_2O$	1. ГХ-МС с HS-SPME, (m/z 114)	6 часов в крови и моче
Деметилдихлофос $C_3H_5Cl_2O_4P$	1. ГХ-МС (ТМС ¹ -эфир, m/z 110 и 278) 2. ВЭЖХ-МС/МС ² $[M+H]^3 = 222.96796$	1 час в крови
Глюкуроид 2,2-дихлорэтанола $C_8H_{12}Cl_2O_7$	1. ВЭЖХ-МС/МС: $[M+H] = 291.07955$	1 час в крови
Диметоат. Обнаруживается в крови и моче до трёх дней.		
<i>O,O,S</i> -Триметилфосфородитиоат $C_3H_9O_2PS_2$	1. ГХ-МС (ТМС-эфир, m/z 172, 125 и 93) 2. ВЭЖХ-МС/МС: $[M+H]$ 172.98251	24 ч в крови
Диазинон. Обнаруживается в крови и моче до трёх дней.		
2-Изопропил-5-метилпиримидин-4-ол $C_8H_{12}N_2O$	1. ГХ-МС (ТМС-эфир, m/z 172, 209 и 204) 2. ВЭЖХ-МС/МС: $[M+H]$ 153.10225	24 ч в крови 48 ч в моче
Пиримидин-2,4-диол $C_4H_4N_2O_2$	1. ГХ-МС (ТМС-эфир, m/z 241 и 255) 2. ВЭЖХ-МС/МС: $[M+H]$ 113.03477	48 часов в крови, 5 дней в моче
<i>O,O</i> -Диэтилфосфонидиоовая кислота $C_5H_{15}O_3PS$	1. ГХ-МС (ТМС-эфир, m/z 171, 199 и 242) 2. ВЭЖХ-МС/МС: $[M+H]$ 187.05448	6 часов в крови 48 часов в моче
Метил паратион. Обнаруживается в крови до двух и моче до трёх дней.		
4-Нитрофенол $C_6H_5NO_3$	1. ГХ-МС (ТМС-эфир, m/z 196 и 211) 2. ВЭЖХ-МС/МС: $[M+H]$ 140.03456	48 часов в крови 5 дней в моче
Хлорпирифос. Обнаруживается в крови и моче до трёх дней.		
Хлорпирифос оксон $C_9H_{11}Cl_3NO_4P$	1. ГХ-МС (m/z 333 и 291) 2. ВЭЖХ-МС/МС: $[M+H]$ 333.95593	6 часов в моче
3,5,6-трихлор-пиримидин-2-ол $C_5H_2Cl_3NO$	1. ГХ-МС (ТМС-эфир, m/z 254 и 256) 2. ВЭЖХ-МС/МС: $[M+H]$ 197.92800	48 часов в крови 6 дней в моче
Фозалон. Обнаруживается в крови до 5 и моче до 6 дней		

Примечание: ¹ — триметилсилильный эфир; ² — разрешение 60000 на высоте пика 10%; ³ — экспериментально зарегистрированное значение массы

В результате проведения токсиколого-аналитического скрининга не удалось выявить диметилфосфат, диметилтиофосфат и диэтилдифосфат.

Следует отметить, что в литературе не удалось найти упоминаний об определении диалкилфосфатов в подобной процедуре с детектированием в виде ТМС-эфиров. Два обнаруженных диалкилфосфата не зарегистрированы в БД NIST.

Идентификация и количественное определение ФОП в биопробах включены в обобщенный алгоритм, что позволяет уменьшить объем анализируемых проб и сократить общее время исследования образца. Совместное определение целевых соединений и их метаболитов существенно расширяет возможности трактовки полученных результатов.

Впервые описано определение диалкилфосфатов в токсиколого-аналитическом скрининге в виде триметилсилильных эфиров.

Таблица 28 — Результаты определения диалкилфосфатов в моче кроликов-самцов после затравки

Диалкилфосфаты (метаболиты ФОП)	ФОП					
	Дихлофос	Диметоат	Диазинон	Метилпара- тион	Хлорпирифос	Фозалон
Метилфосфат X=Y=O, R`=H, R``=CH ₃ m/z 256 ² (241)	+	+	н/о ¹	+	н/о	н/о
Диэтилтиофосфат X=S, Y=O, R`=H, R``=C ₂ H ₅ m/z 242 (227)	н/о	н/о	+	н/о	+	+
Этилфосфат X=Y=O, R`=H, R``=C ₂ H ₅ m/z 270	н/о	н/о	+	н/о	+	+
Диэтилфосфат X=Y=O, R`=R``=C ₂ H ₅ m/z 226 (155)	н/о	н/о	+	н/о	+	+
Диметилдитиофосфат ³ X=Y=S, R`=R``=CH ₃ m/z 230 (215)	н/о	+	н/о	н/о	н/о	н/о
Метилтиофосфат ³ X=S, Y=O, R`=H, R``=CH ₃ m/z 272 (257)	н/о	+	н/о	+	н/о	н/о

Примечание: ¹ — не образуется при метаболизме в организме; ² — Молекулярные ионы три-метилсилильных эфиров. В скобках приведены характеристичные ионы; ³ — Масс-спектры ионизации электронами не содержатся в базе данных NIST11.

Установлено, что экспозиция дихлофосом может быть обнаружена только при идентификации дихлорэтанола или его глюкуронида. Интактная форма дихлофоса не определяется в крови уже через 1 час [31].

3.2.2. Обнаружение и идентификация биомаркеров экспозиции смесью алифатических углеводов C₆-C₁₀

Среди алифатических углеводов наиболее токсичным является *n*-гексан, который применяется, согласно РРПОХВ, в качестве растворителя в различных отраслях промышленности [313]. Длительный контакт рабочих с *n*-гексаном часто приводит к возникновению профессиональной патологии, в основном нейропатий, заболеваний преимущественно периферических сенсорных и моторных нервов [314,315].

Метаболизм предельных алифатических углеводов изучен достаточно хорошо, в особенности *n*-гексана [316]. Биотрансформация углеводов в организме происходит путем окисления до кетонов и дикетонов преимущественно в печени и легких. На рисунке 24 представлена общая схема метаболизма *n*-гексана. На первой стадии происходит гидрокселирование с образованием гексанола-1 и гексанола-2, затем окисление образовавшихся спиртов до альдегидов и кетонов, соответственно.

Большинство негативных эффектов гексана в основном обусловлено образованием одного метаболита - 2,5-гександиона [317,318,319] который способен образовывать аддукты с белками (рисунок 25). Остальные углеводороды из рассматриваемой смеси C₆-C₁₀ изучены значительно хуже, однако можно заключить, что их метаболизм протекает аналогичным способом.

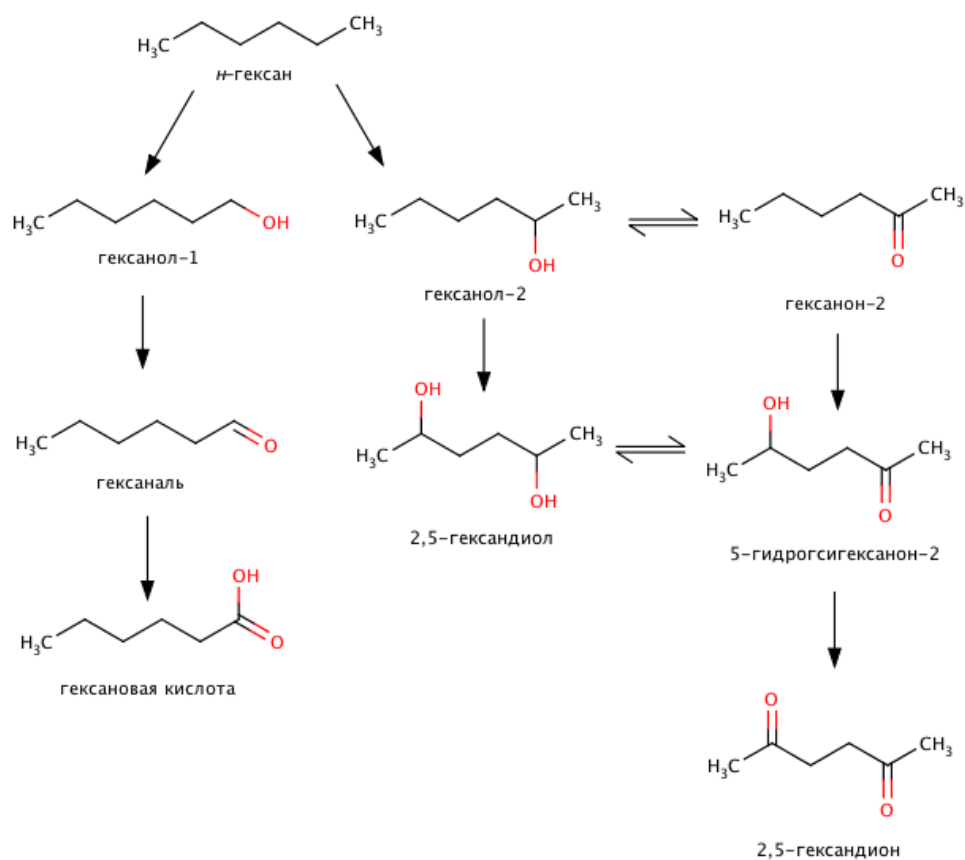


Рисунок 24 — Общая схема метаболизма *n*-гексана [320]

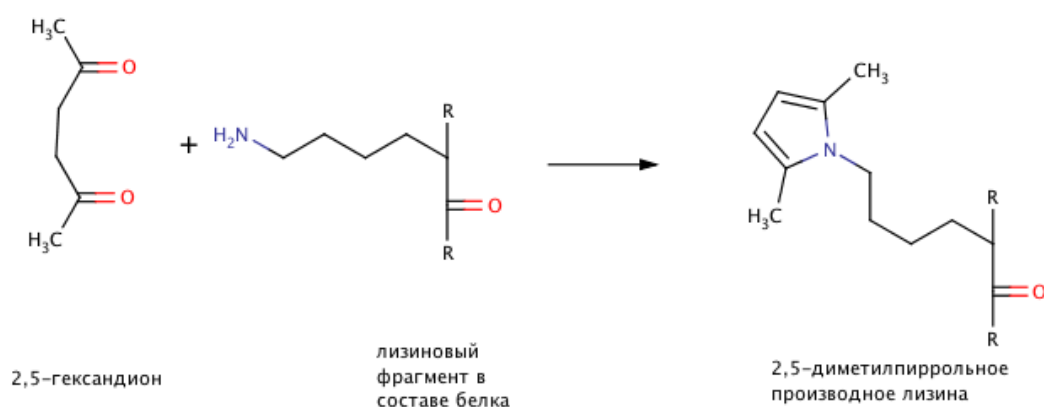


Рисунок 25 — Схема образования замещенных пирролов при реакции 2,5-гександиона с аминогруппами в белке

С точки зрения установления негативного влияния алифатических углеводов наиболее полезным оказывается определение 2,5-алкандионов, 2-алканонов и 2-алканолов. В работе [321]

показано, что при средней концентрации в воздухе рабочей зоны на обувной фабрике в 411 ± 336 мг/м³, максимальная концентрация 2,5-ГД в моче достигала 30 мкг/мл.; 2,5-диметилфуран и 2-гексанол достигали 0.5 и 0.05 части от количества 2,5-ГД. Концентрации остальных метаболитов варьировали от 0.5 до 2.5 мкг/мл. Токсичность метаболитов *n*-гексана, как показано в работе [322] изменяется в следующем порядке: 2,5-гександион > 5-гидроксигексанон-2 > гексанон-2 > *n*-гексан. 2,5-гександион вызывает тестикулярную дисфункцию, обладает нейро- и генотоксичностью, влияет на печень и почки животных и человека [323]. Несмотря на имеющиеся сведения о влиянии УВ на морфофункциональные и клинико-биохимические показатели, механизмы возникновения патологий нуждаются в уточнении.

В работе [324] впервые предпринята попытка протеомного исследования токсического действия 2,5-гександиона. Выявлено уменьшение экспрессии белков, обеспечивающих физическую целостность аксонов, редокс-баланс, фолдинг. В то же время повышается экспрессия белков, отвечающих за энергетический обмен.

Хотя возникновение нейропатии обычно связывают с накоплением нейрофиламентов [325,326], точный механизм возникновения этого процесса неизвестен.

Выдвигается несколько гипотез [327] для объяснения воздействия алифатических углеводов:

1. Ковалентная "сшивка" нейрофиламентов [328,329,330]. В работе [331] показано, что 2,5-гександион вызывает образование ковалентных связей между нейрофиламентами и другими белками *in vivo*. Агрегация и аккумуляция нейрофиламентов в различных типах клеток является одним из признаков токсической полинейропатии.

2. Ингибирование гликолиза с последующим ингибированием транспорта нейрофиламентов [332]. Показано ингибирование глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы и фосфофруктокиназы [330]. Известно, что аксональный транспорт зависит от энергии гликолиза и чувствителен к ингибированию SH-содержащих гликолитических ферментов нейротоксикантами [333]. Была предложена "энергетическая гипотеза" [334] для объяснения дистальной аккумуляции нейрофиламентов при токсической полинейропатии. Нарушение гликолиза в результате ингибирования гликолитических ферментов вызывает накопление промежуточных нейрофиламентов.

3. Повышение уровня аксонального транспорта нейрофиламентов [335];
4. Ингибирование нормального оборота нейрофиламентов [336];
5. Ковалентное связывание метаболитов углеводов с нейрофиламентами с последующим влиянием на фосфорилирование белков и повышение их гидрофобности (в результате образования пирролов) [337,338].

Многие из этих механизмов могут быть общими для разных типов нейропатий. С другой стороны, способность 2,5-дикетонов реагировать с ϵ -аминогруппой лизина была подтверждена в

опытах *in vitro* [330]. В то же время, другие химические соединения, вызывающие нейропатии, не способны к такого рода реакциям, что может свидетельствовать о разных механизмах, приводящих к одним и тем же эффектам.

2,5-алкандионы [327] обладают повышенной нейротоксичностью и вызывают токсическую нейропатию [339], центральную и периферическую дистальную аксопатию [340]. Именно 2,5-алкандионы, или γ -дикетоны способны к образованию замещенных пирролов при реакции с аминокетонами в белках [337] (см. рисунок 25).

В работе [341] показан пример идентификации пиррольных соединений в моче крыс экспонированных 2,5-гександионом, показано образование пиррольных аддуктов и последующее их окисление, что вызывает "сшивку" протеинов в нейрофиламентах. Стоит отметить тот факт, что в этой же работе рассмотрен конкурирующий механизм, а именно сочетание пиррольных производных с сульфгидрильными группами, что приводит к уменьшению их токсичности.

Экспериментальное моделирование хронического воздействия смеси УВ C₆-C₁₀ приведено в разделе 2.5.4 [342]. Методика определения метаболитов в разделе 2.2. Результаты определения метаболитов углеводов представлены в таблице 29.

Исследование биологических образцов позволило выявить метаболиты гексана, гептана и октана. Метаболиты нонана и декана, возможно, из-за крайне низкой их концентрации в смеси — 0.3 % каждый. Все обнаруженные соединения были выявлены в группе с максимальной концентрацией углеводов во вдыхаемом воздухе (160 мг/м³).

Таблица 29 — Идентифицированные метаболиты УВ C₆-C₁₀

УВ и их метаболиты	Методы обнаружения	Образец (концентрация)	Группа
Гексан C ₆ H ₁₄			
Гексанон-2	ГХ-МС ВЭЖХ-МС/МС	Плазма (следы), Мозг (1252 нг/мг), Печень (325 нг/мг)	160 мг/м ³
Гексанол-1	ГХ-МС	Мозг (272 нг/мг)	160 мг/м ³
2,5-гександион	ВЭЖХ-МС/МС	Плазма*	160 мг/м ³
Диметилпирролнорлейцин	ВЭЖХ-МС/МС	Плазма*	160 мг/м ³
Гептан C ₇ H ₁₆			
Гептанон-2	ГХ-МС ВЭЖХ-МС/МС	Плазма (следы), Мозг (17 нг/мг), Печень (40 нг/мг)	160 мг/м ³
Октан C ₈ H ₁₈			
Октанол-1	ГХ-МС	Плазма (4 нг/мл)	160 мг/м ³

Примечание: * — количественное определение не проводилось.

В результате установлено, что непрерывное ингаляционное воздействие смеси предельных углеводов C₆-C₁₀ с концентрацией 160 ± 21 мг/м³ приводит к накоплению гексанона-2 и

гептанона-2 в головном мозге и печени подопытных крыс, гексанола-1 в мозге, октанола-1 в плазме крови. Помимо этого, в плазме крови обнаружен 2,5-гександион, наиболее токсичный метаболит *n*-гексана, а также диметилпирролнорлейцин — селективный и специфичный маркер хронического воздействия *n*-гексана. Концентрации смесей алифатических углеводородов 31 ± 6 мг/м³ и 5 ± 1 мг/м³ при хроническом ингаляционном воздействии не приводят к накоплению метаболитов и являются недействующими [342].

3.2.3. Обнаружение и идентификация биомаркеров экспозиции смесью алифатических углеводородов C₁-C₅

Среди загрязнителей атмосферного воздуха большое место занимают продукты переработки нефти, в частности углеводороды [342]. Одним из источников УВ в воздухе являются нефтеперерабатывающие заводы, другим — отработанные газы двигателей внутреннего сгорания. Так, по данным [343], содержание (в % масс. от общего количества газов) метана составляет 6.2 %, пропана — 1.8 %, пентана — 1.5 %, гексана — 1.3 %, гептана — 1.1 %, изобутана — 2.2% и изопентана — 1.8 %.

Все высоколетучие алифатические углеводороды являются малоопасными соединениями при однократном поступлении в организм. Тем не менее, в хроническом ингаляционном кругло-суточном эксперименте показано, что смесь алифатических углеводородов с числом атомов углерода в цепи от 1 до 5 (метан, этан, пропан, бутан, изобутан, пентан, изопентан), в концентрации 1250 мг/м³ вызывает нарушение функционального состояния ЦНС, дыхательной и сердечно-сосудистой систем, изменения отдельных биохимических показателей крови. Воздействие концентрации УВ 255 мг/м³ приводило к менее выраженным, по сравнению с 1250 мг/м³, изменениям функционального состояния ЦНС. При патоморфологическом исследовании печени и почек при 1250 мг/м³ у отдельных крыс наблюдалась вакуолизация цитоплазмы гепатоцитов и эпителия проксимального отдела канальцев почек. Более низкие концентрации не оказывали влияния на внутренние органы подопытных животных.

Смесь алифатических УВ C₁-C₅ состоит из метана, этана, пропана, изобутана, *n*-бутана, изопентана и *n*-пентана. Самый легкий представитель смеси, низший гомолог класса алифатических углеводородов — метан. В основном, он действует на организм как асфиксant, заменяя воздух и снижая парциальное давление кислорода, вызывая гипоксию [344,345]. Показано, что кролики могут дышать смесью метан/кислород в соотношении 4 к 1 в течение длительного промежутка времени без видимого эффекта [346]. Несмотря на это, в работе [348] указано, что небольшие количества метана превращаются в метанол, затем в диоксид углерода.

Токсикокинетика этана во многом аналогична метану, в диапазоне концентраций 0.5-5000 ppm не выявлено значимых эффектов у крыс. Этан выделяется в неизменном виде с выдыхаемым воздухом [347]. Стоит отметить, что этан в выдыхаемом воздухе является естественным метаболитом и маркером перекисного окисления липидов [348]. Превращения экзогенного этана в этанол не происходит в сколько-нибудь значительной степени, ввиду того, что этан является плохим субстратом для цитохрома P450. Пропан во многих описанных случаях тоже проявляет себя как асфиксant [349]. В отличие от этана и метана, пропан может метаболизироваться ферментами печени до изопропанола и ацетона. Метаболиты были обнаружены в крови, печени, почках и мозгу экспонированных мышей [350]. Отмечено, что пропан менее токсичен чем "старшие" гомологи — бутан и пр. [347].

В хронических исследованиях воздействия смеси пропана, бутана и пентана в концентрации 250 и 80 мг/м³ был отмечен ряд расстройств, затрагивающих систему крови и условно рефлекторную деятельность [351].

n-Бутан может окисляться ферментами печени [352] до бутанола-2, бутанона-2, бутанола-1 [353], 2,3-бутандиола, 3-гидрокси-2-бутанона и 2,3-бутандиона [354]. Изобутан в свою очередь образует *трет*-бутанол. Отмечено, что возможно образование глюкуронидов с бутанолом-2 [347].

n-Пентан хуже растворим в крови, чем гексан и гептан [347]. Пентан хорошо поглощается жировой тканью, а также мозгом, печенью, мышцами, почками, легкими и сердцем. Алифатическое гидроксирование — это основной путь метаболизма пентана. Основной метаболит — 2-пентанол (83-89%), 3-пентанол — минорный метаболит (11-16%). Кетоны и альдегиды не были обнаружены при экспонировании пентаном. Отмечено, что возможно образование глюкуронидов со спиртами. Изопентан, в свою очередь, образует 3-метил-2-бутанол, 2-метил-2-бутанол и 3-метил-2-бутанон [355], 2-метил-1-бутанол и 3-метил-1-бутанол [347].

При исследовании на людях, было показано [356], что пентан выступает в качестве депрессанта центральной нервной системы и может вызывать химический пневмонит [357]. Помимо этого, пентан может вызывать: наркоз, кровоизлияния, анорексию, головокружение, депрессию, спутанность сознания, полинейропатию и остановку дыхания [358]. Вдыхание паров пентана в концентрации 5000 ppm в течение 10 минут не вызывает никаких симптомов, при более длительном воздействии таких доз [356] выявлены изменения в приросте массы тела и потреблении пищи, однако эффект не зависел от дозы. Изменения в гематологическом профиле крови также не носили дозозависимого характера. Значимые изменения в органах или биохимических анализах крови отсутствовали. Нейротоксичность пентана не выявлена. Изопентан проявляет потенциальную репродуктивную токсичность [359]: при экспонировании крыс было выявлено увеличение массы почек и надпочечников, снижение прироста массы тела и потребления пищи, а также

увеличение числа случаев гистологических изменений почек у самцов крыс. С другой стороны, в работе [360] показано, что при экспонировании крыс смесью бутана, изобутана, пентана и изопентана в течение 21-го дня (11800 мг/м³) не было выявлено никаких признаков повреждений почек, обычно связанных с нефропатией, индуцированной углеводородами. В работе [361] получены аналогичные результаты.

Потенциальным свидетельством синергетического действия различных углеводородов является тот факт, что метаболизм *n*-пентана усиливается в пять раз при одновременном действии ацетона, который является метаболитом пропана [362].

По некоторым данным, смесь *n*-алканов способна оказывать нефротоксическое действие на организм, причем, чем выше степень разветвленности алканов, тем большее воздействие на почки он оказывает [363].

Экспериментальное моделирование хронического воздействия смеси УВ С₁-С₅ приведено в разделе 2.5.5 [342]. Методика определения метаболитов - в разделе 2.3. Результаты определения метаболитов углеводородов представлены в таблице 30 и на рисунке 26.

Таблица 30 — Соединения, идентифицированные в плазме крови крыс (n=8)

<i>m/z</i>	Биомаркер экспозиции	Содержание идентифицированных соединений в образцах плазмы крови крыс, нг/мл			
		Контр.	50 мг/м ³	250 мг/м ³	1250 мг/м ³
58	Ацетон	1803 ± 410	2514 ± 522	8187 ± 2010*	9836 ± 2478*
59	<i>трет</i> -Бутанол	-	-	следы**	следы
72	Бутанон-2	-	-	-	следы
56	Бутанол-1	47 ± 10	53 ± 13	68 ± 10	90 ± 22*

Примечание: * — $p < 0.05$; ** — < 10 нг/мл.

Выявлено дозозависимое увеличение концентраций ацетона и бутанола-1 в плазме крови крыс, экспонированных разными количествами углеводородов. Помимо ацетона и бутанола, в крови крыс обнаружены следы *трет*-бутанола (2 и 3 группы) и бутанона-2 (3 группа). Таким образом, в плазме крови крыс обнаружены метаболиты трех основных углеводородов, составляющих 66% от массы всей смеси. Метаболиты пентана и изопентана не выявлены в крови, возможно, из-за крайне низкой их концентрации в смеси — 3 % и 5 %, соответственно. Обнаружить следы неметаболизированных форм углеводородов не удалось.

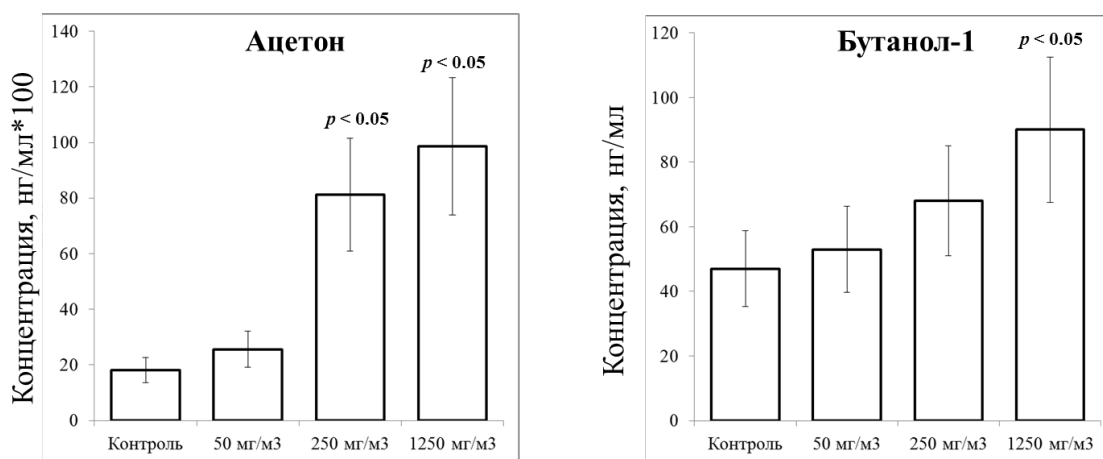


Рисунок 26 — Концентрации ацетона и бутанола-1 в плазме крови крыс, экспонированных различными концентрациями смеси углеводов C_1-C_5

В результате установлено, что непрерывное ингаляционное воздействие смеси предельных углеводов C_1-C_5 с концентрацией $1250 \pm 52 \text{ мг/м}^3$ приводит к достоверному повышению концентрации ацетона и *n*-бутанола в крови подопытных крыс. Воздействие смеси с концентрацией $256 \pm 16 \text{ мг/м}^3$ приводит к достоверному повышению только ацетона. Концентрация смеси алифатических углеводов $50 \pm 6 \text{ мг/м}^3$ при хроническом ингаляционном воздействии не вызывает напряжения механизмов биотрансформации и, следовательно, является недействующей. Ацетон и *n*-бутанол могут служить биомаркерами экспозиции углеводов для населения, проживающего вблизи нефтеперерабатывающих заводов [342].

3.2.4. Обнаружение и идентификация биомаркеров экспозиции гидроксиламином

ГА, поступая в организм через кожу или респираторный тракт [364], может вызывать различные токсические эффекты [365], в частности, нарушение дыхания, анемию, метгемоглобинемию и спленомегалию [366]. Среднесмертельная доза ГА при внутрибрюшинном введении крысам составляет 59 мг/кг. Основной сферой применения ГА, помимо топлива, является синтез капролактама, а также различных фармацевтических препаратов.

Нами разработана методика измерений массовых концентраций гидроксилamina в плазме крови и моче (см. раздел 2.6) [282]. С использованием метода ГХ-МС предел обнаружения составил 30 нг/мл, с использованием ГХ-МС/МС удалось понизить предел количественного определения до 0.1 нг/мл.

Основной токсический эффект ГА связан с образованием метгемоглобина, которое было подтверждено *in vitro* [367,368,369]. Точный механизм этого процесса до конца не ясен, однако известно, что при взаимодействии ГА с гемоглобином образуется метгемоглобин и аммиак [367,370]. Интермедиатами при образовании метгемоглобина являются нитроксильные радикалы $H_2NO\cdot$ [371,372]. Возможно, одним из продуктов реакции является оксид азота I (NO), вызывающий расширение сосудистого русла и образование парамагнитного комплекса ($Hb^{2+} - NO$) [373].

ГА вызывает анемию и увеличение концентрации сульфогемоглобина в крови [374,375], а также спленомегалию и гемолиз [376]. ГА способен ингибировать каталазу [377]. Отмечают [378], что скорость и интенсивность, с которой ГА вызывает метгемоглобинемию, превышает таковые для других метгемоглобинообразующих ксенобиотиков.

В данном разделе описаны результаты установления путей химических превращений ГА после поступления в организм. ГА является реакционноспособным соединением, вступающим в различные реакции, среди которых окислительно-восстановительные, а также реакции образования оксимов (изонитрозосоединений) с альдегидами и кетонами, широко представленными в крови и моче. Они проявляют способность к образованию комплексов с различными металлами. С точки зрения токсикологии оксимы являются малоизученными соединениями, за исключением оксимов, которые используются в качестве реактиваторов холинэстеразы при отравлениях фосфорорганическими соединениями.

Наиболее крупнотоннажный оксим, производимый в мире — это оксим циклогексанона, при подостром [379] (10-300 мг/кг) и остром [380] (до 5 г/кг) действии которого на крыс, авторы наблюдали дозозависимое уменьшение количества эритроцитов, концентрации гемоглобина в сочетании с увеличением концентрации ретикулоцитов, увеличение концентрации метгемоглобина, спленомегалию и гепатомегалию. Авторы предполагают, что циклогексаноноксим вызывает окислительное поражение эритроцитов и, вследствие этого, гемолитическую анемию и увеличение эритропоза, что во многом роднит оксим и исходный ГА. Можно предположить, что малоизученная токсичность оксимов, являющихся метаболитами ГА, во многом схожа с неметаболизированной формой. Токсикокинетика оксимов изучена недостаточно, тем не менее показано, что циклогексаноноксим быстро выводится из крови [381], α -фаза при *в/в* введении длится всего 1.6 мин, β -фаза — 18.2 мин.

Для предварительной оценки возможных путей химических превращений ГА в крови и моче, а также идентификации возможных аддуктов, нами было проведено внесение ГА в биологические образцы *in vitro* (см. экспериментальную часть). Количество ГА, которое было добавлено в мочу и цельную кровь, было избыточным, так как после двухчасового инкубирования в образцах оставался значительный избыток свободного ГА (который был определен методом ГХ-МС в виде триметисилилового эфира после экстракции).

В соответствии с перечнем выявленных *in vitro* возможных метаболитов был проведен поиск их в образцах крови и мочи отобранных у крыс после *в/ж* введения $\frac{1}{2}DL_{50}$ ГА. Структуры обнаруженных метаболитов приведены на рисунке 27, а приблизительная количественная оценка дана в таблицах 31-33.

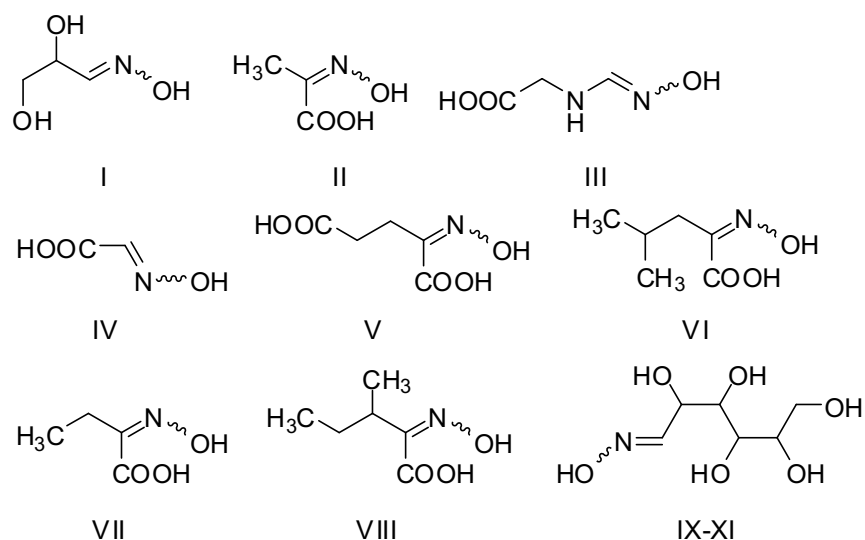


Рисунок 27 — Структурные формулы идентифицированных метаболитов ГА в крови и моче

Таблица 31 — Результаты выявления биомаркеров экспозиции ГА в плазме крови после внутрижелудочного введения в дозе $\frac{1}{2} DL_{50}$

Биомаркер	Концентрация*, нг/мл	
	101.6 мг/кг ($\frac{1}{2} DL_{50}$) в/жс	
	2 ч	24 ч
Гидроксиламин	4321 ± 1080	421 ± 131
I — оксим глицеральдегида	476 ± 286	следы
II — оксим пировиноградной к-ты	259 ± 194	266 ± 173
III — оксим N-формилглицина	106 ± 52**	29 ± 8
IV — оксим глиоксалевой к-ты	46 ± 26	38 ± 28

Примечание: * — Концентрации обнаруженных метаболитов приведены относительно внутренних стандартов; ** — указана сумма E- и Z-изомеров.

Таблица 32 — Результаты выявления биомаркеров экспозиции ГА в моче после внутрижелудочного введения в дозе $\frac{1}{2} DL_{50}$

Биомаркер	Концентрация*, нг/мл	
	101.6 мг/кг ($\frac{1}{2} DL_{50}$) в/жс	
	24 ч	
Гидроксиламин	29400 ± 7056	
I — оксим глицеральдегида	35820 ± 19343	
II — оксим пировиноградной к-ты	97982 ± 85244	
V — оксим 2-кетоглутаровой к-ты	473 ± 121	
VI — оксим 2-кетоизокапроновой к-ты	1466 ± 289	
VII — оксим 2-кетомасляной к-ты	390 ± 98	
VIII — оксим 3-метил-2-кетопентановой к-ты	80 ± 24	
IX-XI — оксимы моносахаридов	>500000**	

Примечание: * — Концентрации обнаруженных метаболитов приведены относительно внутренних стандартов; ** — точное количественное определение затруднительно, однако можно предположить, что суммарное содержание оксимов моносахаридов составляет более 0.5 мг/мл мочи.

В моче, в отличие от крови, выявлены оксимы моносахаридов (соединения VIII-IX). Можно предположить, что значительные количества оксимов моносахаридов, обнаруженные в моче, но не обнаруженные в крови, обусловлены быстрой их экскрецией из кровотока. В пользу этого

предположения говорит тот факт, что такие оксимы могут образовываться при взаимодействии ГА с сахарами крови, согласно результатам эксперимента *in vitro*. В моче приблизительная суммарная концентрация этих оксимов составляет более 0.5 мг/мл мочи. Интересно заметить, что и *in vitro*, и *in vivo* соответствующие аддукты образуются только с альдозами, а не кетозами.

Для выявления возможного участия оксимов во II фазе метаболизма и образовании аддуктов оксимов с глюкуроновой кислотой [382], проводили сравнение концентрации оксимов в образце мочи до и после ферментативного гидролиза с использованием β-глюкуронидазы. Следовательно, можно предположить, что глюкурониды оксимов не образуются.

Для выявления наиболее чувствительного биомаркера экспозиции ГА был проведен скрининг аддуктов ГА в крови и моче крыс, получавших ГА с питьевой водой в течение 30 дней. Результаты скрининга и приблизительная количественная оценка приведена в таблице 33.

Таблица 33 — Результаты выявления биомаркеров экспозиции раствором ГА в питьевой воде

Соединение	Концентрация*, нг/мл					
	Введение с питьевой водой					
	Плазма крови			Моча		
	565 мкг/кг	113.1 мкг/кг	22.6 мкг/кг	565 мкг/кг	113.1 мкг/кг	22.6 мкг/кг
ГА	304 ± 155	12 ± 8	8 ± 4	3555 ± 640	106 ± 30	34 ± 18
I	10 ± 6	-	-	140 ± 89	10 ± 6	-
II	-	-	-	139 ± 74	4 ± 3	Следы

Примечание: * — Концентрации обнаруженных метаболитов приведены относительно внутренних стандартов.

Наиболее чувствительным биомаркером экспозиции ГА оказалась его неметаболизированная форма и пируватоксим (II), обнаруженный в моче крыс, получавших 22.6 мкг/кг ГА в питьевой воде (самая низкая доза). Моча явилась наиболее подходящей матрицей мониторинга низкоуровневого воздействия. Так, в крови оксим глицеральдегида (I) можно обнаружить только в образцах крови группы крыс, получавших высокую дозу ГА. Соединения III-VII не обнаружены в крови и моче крыс, подвергавшихся хроническому воздействию ГА. Полученные результаты говорят о том, что ГА, несмотря на высокую реакционную способность, тем не менее, присутствует в крови и моче даже при низкоуровневом воздействии. Возможно, наличие ГА в крови даже при низкоуровневом воздействии объясняется тем, что (согласно [383]) при утилизации повреждённых эритроцитов происходит высвобождение ГА и обратное поступление его в кровяное русло. Это может быть причиной рецидива клинической картины гидроксиламиновой интоксикации спустя 1–2 недели после острого отравления [383].

Учитывая тот факт, что все обнаруженные метаболиты ГА в крови и моче крыс были нами также обнаружены в образцах биологических жидкостей после внесения ГА *in vitro*, можно пред-

положить, что образование этих оксимов не катализируется ферментами. Это позволяет обосновать предложенный список целевых соединений для биоаналитического мониторинга воздействия ГА на человека.

3.2.5. Обнаружение и идентификация биомаркеров экспозиции ДХГФ

Хладон RL316 — (*E*)-1,4-дихлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутена-2 (далее — ДХГФ) по химической структуре относится к классу смешанных непредельных галогенпроизводных углеводородов. Структурная формула приведена на рисунке 28.

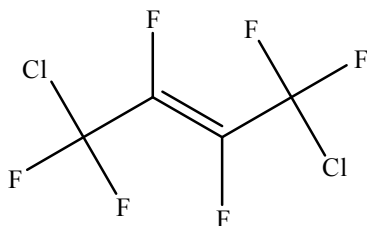


Рисунок 28 — Структурная формула ДХГФ

ДХГФ предназначен для использования в качестве растворителя, теплоносителя, реагента при производстве перфторбутана. В настоящее время известно, что смешанные галогенпроизводные непредельных углеводородов являются высокотоксичными и опасными соединениями. Однако, токсичность ДХГФ не изучена. У ДХГФ известен еще один изомер, 2,3-дихлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбут-2-ен, который попал в сферу внимания токсикологов как примесь в галотане (фторотане) [384]. Описание токсического действия 2,3-ДХГФ включает: поражение респираторного тракта (раздражение легких, пневмония, отек легких), изменения в почечных канальцах, дегенеративные изменения нейронов, хроматолиз, гиперкалемия и гипонатремия, образование геморагических зон в селезенке [385].

Тем не менее, имеющиеся в литературе сведения о токсичности 2,3-ДХГФ трудно отнести к 1,4-ДХГФ, так как многие симптомы, в частности дистрофические изменения в легких, печени и мозге [386,387] обусловлены образованием трифторуксусной кислоты в ходе метаболизма [388,389], а образование трифторуксусной кислоты из 1,4-ДХГФ невозможно, так как в структуре отсутствует трифторметильная группа.

Токсическое действие фторуглеводородов значительно отличается в зависимости от структуры [389], так, фторэтилен не оказывают вообще токсического действия, в то время как перфторизобутилен — крайне токсичен. Замена атомов фтора на хлор значительно повышает токсичность.

Определение метаболитов ДХГФ в плазме крови и моче лабораторных крыс, подвергавшихся ингаляционному воздействию ДХГФ в концентрации 600 мг/м³, выполняли с использованием сочетания газовой и высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Несмотря на то, что метаболизм галогенированных углеводов изучен достаточно хорошо, в литературе содержится крайне мало информации о токсичности высших галогеналкенов с числом атомов углерода более трех. При этом пути их биоактивации могут значительно отличаться в зависимости от структуры и, соответственно, могут отличаться токсическое действие, канцерогенность, мутагенность и пр. Так, например, при переходе от гексахлоробутадиена к перфторпропилену, токсические концентрации (в опытах *in vitro*) падают на два порядка [390].

В ходе выполнения работы нами были исследованы известные пути метаболизма фторхлоралкенов. К основным процессам их превращений в организме относятся: т.н. "восстановительный путь", гидролиз и образование конъюгатов с глутатионом [391]. Известный окислительный путь метаболизма в случае ДХГФ невозможен вследствие отсутствия связей С-Н в молекуле. Восстановительный путь детоксикации и биоактивации начинается с замещения одного или двух галогенов атомами водорода в цитохромах [392]. Образующиеся галогеналкены могут в дальнейшем активироваться за счет образования аддуктов с глутатионом в печени (см. рисунок 32) [393]. Глутатионовые аддукты через несколько последовательных реакций образуют цистеиновые и ацетилцистеиновые аддукты в почках [394]. Многочисленные исследования указывают на то, что нефротоксичность и нефроканцерогенность галогеналкенов вызвана в основном за счет образования крайне реакционноспособных интермедиатов — тиокетенов, при воздействии β-лиаз на цистеиновые аддукты [395]. Тиокетены — крайне электрофильные соединения, они легко вступают в реакции нуклеофильного присоединения. В частности, способны образовывать ковалентные аддукты с протеинами и азотистыми основаниями ДНК, чем и обусловлена их мутагенность и канцерогенность [395].

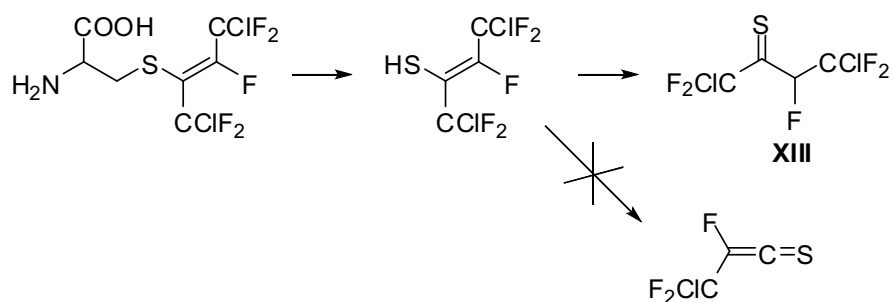


Рисунок 29 — Схема образования тиолов, тиокетенов и тиокетенов из цистеиновых аддуктов

Образование лабильных тиолов, предшественников тиокетенов, было доказано при введении в реакцию *in vitro* специальных ловушек-нуклеофилов [396].



Рисунок 30 — Предполагаемые структурные формулы метаболитов ДХГФ обнаруженных в паровой фазе

Образование тиокетенов возможно при наличии галогена в α -положении к тиольной группе, структура же ДХГФ не обладает такой особенностью, поэтому образование тиокетенов из цистеиновых аддуктов ДХГФ без расщепления достаточно прочной связи С-С невозможно (см. рисунок 29). Однако образование предшественников тиокетенов было нами показано, так нам удалось выявить стабильный тиокетон XIII в моче и плазме крови.

Идентификацию метаболитов проводили тремя различными способами: ГХ-МС паровой фазы, ГХ-МС экстрактов и ВЭЖХ-МС высокого разрешения. В паровой фазе обнаружено два метаболита (см. рисунок 30).

Масс-спектры метаболитов с использованием доступных баз данных идентифицировать не удалось. Предположительные структуры приписаны на основании известных закономерностей фрагментации и интерпретации масс-спектров электронного удара. Метаболит с массой 198 а.е.м., изображенный на рисунке 30 справа (L-II), является продуктом восстановительного замещения атома хлора в CF_2Cl группе. Путь образования метаболита слева (L-I) предположить не удалось, однако, судя по структуре, он является продуктом восстановительного присоединения двух атомов фтора.

В таблице 34 приведены приблизительные концентрации метаболитов L-I и L-II в образцах крови и мочи крыс после экспонирования концентрацией 600 мг/м^3 . Приблизительные концентрации метаболитов определены методом абсолютной градуировки с использованием ДХГФ в качестве внешнего стандарта.

Таблица 34 — Результаты определения концентрации ДХГФ и его метаболитов методом ГХ-МС с твердофазной микроэкстракцией

Соединение	Концентрация соединений после экспонирования ДХГФ в концентрации 600 мг/м^3		
	Плазма крови 0 ч	Плазма крови 24 ч	Моча 24 ч
ДХГФ	30 нг/мл	0	3 нг/мл
Метаболит L-I	1091 нг/мл	86 нг/мл	541 нг/мл
Метаболит L-II	1353 нг/мл	17 нг/мл	253 нг/мл

В ходе эксперимента были отобраны образцы крови сразу после окончания экспонирования (0 ч) и через 24 часа, мочу собирали в течение 24 часов после экспонирования. Стоит отметить,

что потери летучих соединений из мочи предотвращены не были, так как мочу собирали в открытые емкости.

Оценка возможных путей метаболизма ДХГФ на основании известных закономерностей позволила нам предсказать структуры возможных метаболитов. Нами были выявлены продукты гидролиза ДХГФ: V и XIV (рисунок 31).

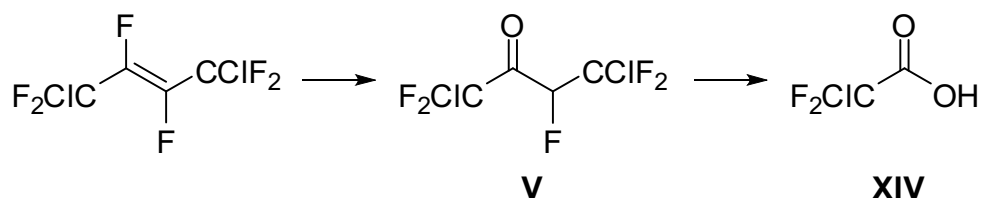


Рисунок 31 — Схема образования кетона и кислоты при гидролизе ДХГФ

Образование аддуктов ДХГФ с глутатионом может проходить по различным путям. Нами выявлено четыре различных направления (рисунок 32): восстановительное присоединение глутатиона ($\text{GS-C}_4\text{HF}_6\text{Cl}_2$), винильное или аллильное замещение фтора ($\text{GS-C}_4\text{F}_5\text{Cl}_2$ два возможных изомера), нуклеофильное замещения фтора или хлора в восстановленной форме ДХГФ ($\text{GS-C}_4\text{H}_2\text{F}_5\text{Cl}_2$ или $\text{GS-C}_4\text{H}_2\text{F}_6\text{Cl}$, соответственно).

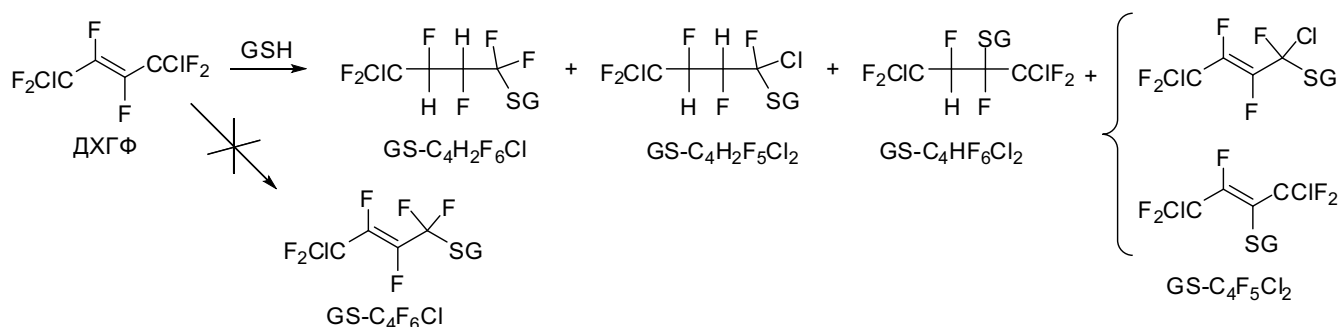


Рисунок 32 — Схема образования аддуктов ДХГФ с глутатионом

Интересно отметить, что в ДХГФ не происходит очевидного замещения атома хлора под действием GS^- в группе CF_2Cl , то есть в невосстановленной форме не происходит аллильное замещение хлора. Необычным является тот факт, что продукт аллильного замещения фтора выявлен в моче крыс (X). Хотя хлор должен легче вступать в реакции аллильного нуклеофильного замещения, некоторые исследования [397,398] показывают, что фтор также является подходящей уходящей группой в реакциях замещения глутатионом под действием глутатион-S-трансферазы.

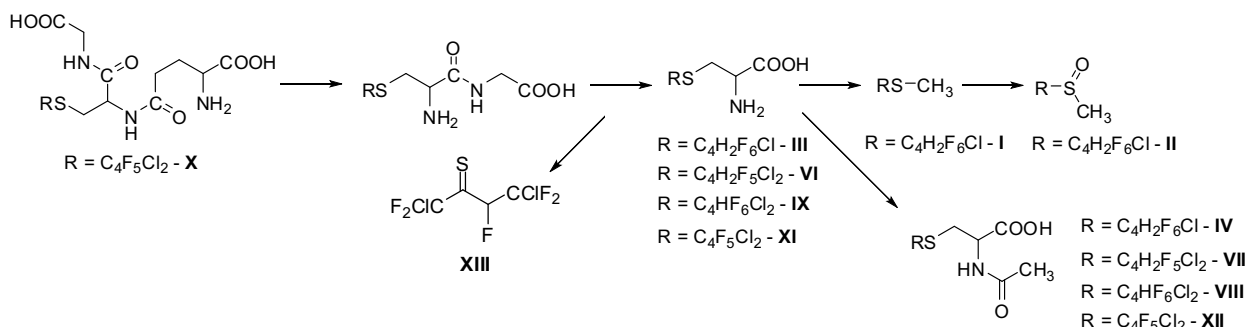


Рисунок 33 — Схема деградации различных аддуктов ДХГФ с глутатионом. Показаны различные обнаруженные метаболиты

Возможным объяснением может быть то, что этот продукт легче вступает в дальнейшие реакции метаболизма и не накапливается в организме.

Ферментативный гидролиз аддуктов ДХГФ с глутатионом, а также некоторые их дальнейшие превращения показаны на рисунке 33. Результаты обнаружения метаболитов в биологических образцах методом ВЭЖХ-МС приведены в таблице 35.

Таблица 35 — Результаты определения концентрации метаболитов методом ВЭЖХ-МС после экспонирования ДХГФ концентрацией 600 мг/м³

Метаболит	Метод ¹	M _{эксп}	M _{теор}	Δ, ppm ²	Образцы ³
I	[M+H] ⁺	246.9771	246.9783	4.8	Все
II	[M-H] ⁻	260.9553	260.9576	8.6	Моча 24 ч
III	[M-H] ⁻	317.9789	317.9790	0.2	Моча 24 ч
IV	[M+H] ⁺	362.0047	362.0052	1.5	Моча 24 ч
V	[M+H] ⁺	230.9420	230.9403	-7.3	Моча 24 ч
VI	[M+H] ⁺	335.9668	335.9651	-5.0	Моча 24 ч
VII	[M+H] ⁺	377.9753	377.9757	1.1	Моча 24 ч, плазма 0 ч
VIII	[M+H] ⁺	395.9657	395.9663	1.6	Все
IX	[M+H] ⁺	353.9557	353.9557	0.0	Моча, плазма 0 ч
X	[M+H] ⁺	520.0126	520.0135	1.8	Моча 24 ч
XI	[M+H] ⁺	333.9492	333.9495	1.0	Моча 24 ч, плазма 0 ч
XII	[M+H] ⁺	375.9595	375.9595	0.0	Моча 24 ч, плазма 0 ч
XIII	[M+H] ⁺	266.9260	266.9237	-8.7	Моча 24 ч, плазма 0 ч

Примечание: ¹ — вид молекулярного иона при ионизации электрораспылением; ² — отклонение экспериментально определенной молекулярной массы от теоретически вычисленной, выраженное в миллионных долях; ³ — биологические образцы, в которых обнаружен данный метаболит.

Наиболее показательными метаболитами являются ацетилстеиновый аддукт VIII и метилсульфид I. Обнаружение метаболитов, образующихся в ходе различных путей образования глутатионовых аддуктов, позволяет нам сделать некоторые выводы, о соотношении различных путей сравнивая концентрации метаболитов. Так, соотношение XII/VIII/VII равно 34 к 17 к 1 в плазме 0 ч, и 11 к 63 к 1 в моче. Следовательно, преобладающим путем образования аддуктов является винильное или аллильное замещения фтора, а также восстановительное присоединение глутатиона. Нуклеофильное замещение галогенов в восстановленной форме ДХГФ являются минорными процессами. Их накопление выявлено в моче, при этом VII выводится из крови в течение 24 часов, а IV в плазме не обнаружен. Концентрация VIII, одного из наиболее показательных метаболитов, в плазме падает в 20 раз за 24 часа.

Цистеиновый аддукт XI — основной. Несмотря на то, что XII основной ацетилстеиновый аддукт, выводится он быстрее, чем VIII и через 24 ч в плазме не обнаруживается.

Единственным глутатионовым аддуктом, который был обнаружен в исходной форме, был аддукт X в моче, который является продуктом винильного или аллильного замещения фтора в ДХГФ.

Для выявления наиболее чувствительных биомаркеров экспозиции ДХГФ было проведено исследование образцов плазмы крови крыс, экспонированных концентрациями ДХГФ на уровне от 4.7 до 84.4 мг/м³. Результаты определения ДХГФ и его летучих метаболитов представлены в таблице 36.

Таблица 36 — Результаты определения концентрации ДХГФ и его метаболитов методом ГХ-МС с твердофазной микроэкстракцией

Соединение	Гр. 1 (84.4 мг/м ³)	Гр. 2 (18.8 мг/м ³)	Гр. 3 (4.7 мг/м ³)
ДХГФ	6 нг/мл	~1 нг/мл	<1 нг/мл*
Метаболит L-I	11 нг/мл	-**	-
Метаболит L-II	-	-	-

Примечания: * — ДХГФ обнаружен в следовых количествах, точную концентрацию оценить затруднительно; ** — не обнаружен.

Таким образом, неметаболизированная форма ДХГФ была обнаружена в плазме крови всех групп животных. Концентрации не превышают следового уровня, однако носят дозозависимый характер. Метаболит L-I был обнаружен только в группе подвергавшейся экспонированию высокой концентрацией ДХГФ.

Образцы плазмы крови крыс были исследованы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией высокого разрешения. Поиск и идентификация метаболитов были выполнены на основании данных, полученных в ходе исследования образцов после острой интоксикации. Результаты приведены в таблице 37.

Таблица 37 — Результаты определения концентрации метаболитов ДХГФ в плазме крови методом ВЭЖХ-МС

Соединение	Гр. 1 (84.4 мг/м ³)	Гр. 2 (18.8 мг/м ³)	Гр. 3 (4.7 мг/м ³)
VI	+*	-**	-
VII	+	-	-
VIII	+	-	-
XI	+	-	-
XIII	+	+	-

Примечания: * — метаболит обнаружен в плазме крови; ** — метаболит не обнаружен.

Таким образом были выявлены цистеиновые и ацетилцистеиновые аддукты ДХГФ в плазме крови крыс группы 1, экспонированных ДХГФ в концентрации 84.4 мг/м³, единственным метаболитом ДХГФ, выявленным в группе 2 (18.8 мг/м³), является тиокетон XIII. Наиболее чувствительным биомаркером экспозиции ДХГФ является его неметаболизированная форма. Тем не менее, скорее всего этот факт связан с использованием чувствительной методики целевого анализа для определения ДХГФ.

Использование сочетания ГХ-МС паровой фазы с твердофазной микроэкстракцией и ВЭЖХ-МС высокого разрешения позволяет выявлять в плазме крови два биомаркера экспозиции ДХГФ концентрациями до 18.8 мг/м³.

Рассмотрим далее возможность обоснования целевого списка биомаркеров экспозиции экстраполированного для биоаналитического мониторинга воздействия ДХГФ на человека. Все обнаруженные метаболиты ДХГФ в крови являются продуктами образования и последующей деградации аддуктов ДХГФ с глутатионом. Реакция присоединения или замещения глутатиона к ДХГФ катализируется глутатион S-трансферазами (GST, КФ 2.5.1.18), которые представляют собой целое семейство ферментов играющих ключевую роль в обезвреживании ксенобиотиков. Образование аддуктов происходит в основном внутри клеток печени и почек [399], так как концентрация глутатиона в плазме крови составляет всего 2-20 мкМ в то время как, концентрация внутриклеточного глутатиона составляет 3-4 мМ [400], причем 85-90 % сосредоточено в цитозоле, а оставшиеся 10-15 % в митохондриях и пероксисомах. После образования, аддукты выводятся из клеток с использованием активного транспорта [401] и затем, под влиянием гамма-глутамилтрансферазы (КФ 2.3.2.2), от аддуктов отщепляется остаток глутаминовой кислоты. Продуктами первой стадии гидролиза являются цистеилглициновые аддукты. Дальнейший гидролиз аддуктов катализируется дипептидазой (КФ 3.4.13.19), что приводит к цистеиновым аддуктам, которые в дальнейшем могут либо ацилироваться под действием специфичных к цистеиновым аддуктам ацетилтрансфераз (КФ 2.3.1.80), либо расщепляться по связи C-S в цистеине под действием β -лиаз (КФ 4.4.1.13) в почках с образованием тиолов или других реакционноспособных соединений [402]. Именно ацетилцистеиновые аддукты зачастую используют в качестве маркеров образования исходных аддуктов ксенобиотиков с глутатионом [400].

Межвидовые различия в активностях GST или ферментов, которые катализируют гидролиз аддуктов с глутатионом могут приводить к различной чувствительности видов к токсическому действию ксенобиотиков. Оценка таких различий необходима для повышения точности экстраполяции при гигиеническом регламентировании, а также для создания физиологически обоснованных фармако- и токсикокинетических моделей. Сравнение активности GST между человеком и крысами проводилось неоднократно, однако есть основания полагать, что межвидовая чувствительность может отличаться по отношению к различным химическим веществам. Например, в работе [403] проведено межвидовое сравнение активности GST по отношению к йодистому метилу: активность GST по образованию аддуктов с CH_3I в печени крыс и человека оказалась сравнимой (40 и 47 нмоль/мин/мг гомогената), а у кроликов значительно меньше (10 нмоль/мин/мг гомогената). В почках разница в активности GST была приблизительно схожей: 15.0, 11.8 и 4.38 нмоль/мин/мг гомогената у крысы, человека и кролика, соответственно [400].

Наиболее близким по структуре к ДХГФ соединением для которого удалось обнаружить результаты межвидового сравнения активности GST это гексахлобутадиен-1,3. Этот полихлорированный углеводород так же содержит в своей структуре четыре атома углерода, связи $\text{C}=\text{C}$ и $\text{C}_{\text{sp}2}$ -

Cl, поэтому можно сделать предположение о близкой субстратной специфичности рассматриваемых ферментов.

В отличие от CH_3I , конъюгация гексахлорбутадиена-1,3 с глутатионом в микросомальной фракции печени крыс была в 5 раз более интенсивной чем у человека [402]. При этом константа связывания была в 1.3 раза выше у крысы. Метаболизм цистеинового аддукта почечными β -лиазами был приблизительно в 23 раза менее интенсивным у человека, чем у крысы. Аналогичным образом отличались активности ацилазы в почках: 7.36 нмоль/мин/мг гомогената у крыс, против 0.1 нмоль/мин/мг гомогената у человека. В то же время, активность ацетилтрансфераз в почках крыс и человека отличалась значительно меньше и составила 144.9 и 40.8 нмоль/мин/мг гомогената, соответственно.

Таким образом, при биоаналитическом мониторинге воздействия ДХГФ на человека стоит в первую очередь в качестве целевых биомаркеров экспозиции рассматривать:

- Цистеиновые аддукты: 1-цистеинил-1,2,3,4,4-пентафтор-1,4-дихлорбутен-2 или его возможный изомер - 2-цистеинил-1,1,3,4,4-пентафтор-1,4-дихлорбутен-2.

- Ацетилцистеиновые аддукты: 1-(*N*-ацетилцистеинил)-1,2,3,4,4-пентафтор-1,4-дихлорбутен-2 или его возможный изомер - 2-(*N*-ацетилцистеинил)-1,1,3,4,4-пентафтор-1,4-дихлорбутен-2, 1-(*N*-ацетилцистеинил)-1,2,3,4,4-пентафтор-1,4-дихлорбутан, 1-(*N*-ацетилцистеинил)-1,1,2,3,4,4-гексафтор-1,4-дихлорбутан.

Так как активность почечных β -лиаз была приблизительно в 23 раза меньше у человека [402], то можно не рассматривать продукты расщепления цистеиновых аддуктов по связи C-S в качестве целевых биомаркеров экспозиции при биоаналитического мониторинга воздействия ДХГФ на человека. К данному классу соединений относятся, обнаруженные в крови крыс - 4-метилсульфил-1-хлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутен-2, 4-метилсульфинил-1-хлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутен-2 и 1,1,3,4,4-пентафтор-1,4-дихлорбутантион-2, который оказался наиболее чувствительным биомаркером экспозиции ДХГФ у крыс.

Механизм образования легколетучих метаболитов ДХГФ, продуктов восстановительного замещения атомов хлора: 1-хлор-1,1,2,3,3,4,4,4-октафторбутан и 1-хлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутен-2 не был установлен, поэтому не удалось сделать предположение о возможности их обнаружения в крови человека после воздействия ДХГФ.

3.3. Разработка высокочувствительных методик количественного определения биомаркеров экспозиции органическими соединениями и вычисление токсикокинетических параметров

В таблице 38 приведен полный перечень соединений, рассматриваемых в данной работе. Показано, что выбранный набор токсикантов охватывает значительные диапазоны физико-химических характеристик: летучесть, кислотность, гидрофобность и пр., а также весь диапазон классов опасности (от чрезвычайно опасных до малоопасных соединений).

Таблица 38 — Полный перечень соединений, рассматриваемых в данной работе

Химический фактор	DL ₅₀ , мг/кг ¹	Биомаркеры экспозиции ²	Методика
Алифатические углеводороды			
Смесь УВ C ₆ -C ₁₀ : гексан, гептан, октан, нонан и декан	Не дост.	ДМПН ³	ВЭЖХ-МС
		Гексанон-2	ГХ-МС
		Гептанон-2	
		Октанол-1	
Смесь УВ C ₁ -C ₅ : метан, этан, пропан, бутан, изобутан, пентан, изопентан	Не дост.	Ацетон	ГХ-МС-SPME
		Бутанол-1	
		<i>трет</i> -Бутанол	
		Бутанон-2	
Чрезвычайно опасные вещества			
Зарин	0.55	Аддукты с AChE и HSA	ВЭЖХ-МС и ГХ-МС
Зоман	0.16		
RVX	0.02		
Иприт	0.70 ⁴	Аддукты с ДНК и глобином	ВЭЖХ- и ГХ-МС
Монофторуксусная кислота	0.22	Монофторуксусная кислота	ГХ-МС
Фосфорорганические пестициды			
Дихлофос	25-80	Дихлорэтанол	ГХ-МС-SPME
Диметоат	28-30	Диметоат	ГХ-МС/МС
Диазинон	250-400	Пиримидиндиол	ГХ-МС
Метилпаратион	6-50	4-Нитрофенол	ГХ-МС
Хлорпирифос	95-270	Хлорпирифос	ГХ-МС/МС
Фозалон	82-205	Фозалон	ГХ-МС/МС
Компоненты ракетного топлива			
Гидроксиламин	203	Гидроксиламин	ГХ-МС/МС
		Пируватоксим	ГХ-МС
Летучие промышленные загрязнители			
ДХГФ	86	ДХГФ	ГХ-МС-SPME
Аллилхлорид	460	Аллилхлорид	
Акрилонитрил	25-186	Акрилонитрил	
Бутилхлорид	2670	Бутилхлорид	
Дисульфид углерода	2780	Дисульфид углерода	
Хлорацетонитрил	220	Хлорацетонитрил	
Гексахлорэтан	4460	Гексахлорэтан	
Нитробензол	780	Нитробензол	
Метакрилонитрил	200	Метакрилонитрил	
Этилметакрилат	14800	Этилметакрилат	
Метилакрилат	300	Метилакрилат	
Пентахлорэтан	920	Пентахлорэтан	
<i>транс</i> -1,4-Дихлор-2-бутен	89	<i>транс</i> -1,4-Дихлор-2-бутен	
Диэтиловый эфир	1215	Диэтиловый эфир	
Метилметакрилат	7872	Метилметакрилат	
2-Нитропропан	720	2-Нитропропан	
Тетрагидрофуран	1650	Тетрагидрофуран	

Примечание: ¹ - крысы, *в/жс*; ² - наиболее чувствительные из известных; ³ - диметилпирролнорлейцин; ⁴ - для человека.

Завершающим этапом разработки комплексной процедуры мониторинга биомаркеров экспозиции является создание высокочувствительных методик их определения. Новым подходом

является апробация методик в токсикологическом эксперименте, в ходе которого устанавливаются токсикокинетические характеристики, периоды возможного обнаружения и минимальные концентрации или дозы, при которых возможно обнаружение токсиканта в образце. Экспериментальная оценка токсикокинетических параметров позволяет не только математически описать кривую зависимости концентрации токсиканта в крови от времени, но и провести приблизительную оценку полученной дозы токсиканта на основании измеренной концентрации биомаркера экспозиции в моче и/или крови. Ретроспективная оценка абсорбированной дозы возможна, если удастся установить характер ее зависимости от кажущейся начальной концентрации.

Наряду с физико-химическими характеристиками и параметрами токсичности в таблице 38 приведены оптимальные методики определения биомаркеров экспозиции.

3.3.1. Разработка хроматомасс-спектрометрической методики определения фосфорорганических соединений в моче и крови

В качестве метода извлечения пестицидов из крови был использован метод жидкость-жидкостной экстракции, так как он позволяет использовать в качестве образцов кровь различного качества: цельную, плазму крови, сыворотку, размороженную, гемолизованную, что особенно актуально при определении причин отравления *post mortem*. Методика количественного анализа разработана при использовании именно цельной крови в качестве матрицы для определения ФОП, однако было показано, что пределы обнаружения в 1 нг/мл достигаются и в других матрицах.

В качестве растворителя для жидкость-жидкостной экстракции был использован ацетонитрил. Значительным преимуществом ацетонитрила является возможность извлечения полярных метаболитов ФОП без дополнительной подготовки проб.

Степени извлечения определяли следующим образом: в 1 мл крови или мочи вносили ФОП и получали модельные растворы с концентрацией 10 мкг/мл. Затем проводили экстракцию ацетонитрилом, согласно процедуре, приведенной в Экспериментальной части, с той разницей, что конечный экстракт не упаривали, а непосредственно анализировали. Полученные площади хроматографических пиков сравнивали с площадями аналитов в модельном растворе ФОП в ацетонитриле с концентрацией 5 мкг/мл.

В результате сравнения экстрагирующей способности различных растворителей, получили следующие коэффициенты извлечения ФОП (см. таблицу 39).

Таблица 39 — Коэффициенты извлечения компонентов модельной смеси пестицидов из цельной крови методом жидкость-жидкостной экстракции при использовании различных растворителей

Экстрагент	Коэффициенты извлечения, %					
	Дихлофос	Диметоат	Диазинон	Метил паратион	Хлорпирифос	Фозалон
Ацетонитрил 10%/Гексан 90%	1	17	18	40	20	54
Гексан 100%	2	18	14	63	17	81
CH ₂ Cl ₂ 30%/Гексан 70%	8	22	3	98	5	13
CH ₂ Cl ₂ 10%/Гексан 90%	15	82	38	94	39	26
CH ₂ Cl ₂ 10%/Ацетон 90%	6	23	68	58	24	24
Ацетонитрил 100%	44	81	67	60	60	79
Ацетон 10%/Гексан 90%	17	83	41	17	46	77
Ацетон 100%	3	59	8	39	10	57
Диэтиловый эфир 100%	14	79	14	51	14	60

Определение степеней извлечения пестицидов из крови показало, что оптимальным растворителем для экстракции пестицидов из цельной крови является ацетонитрил. Степени извлечения ФОП в ацетонитрил из крови и мочи приемлемы и составляют: диметоат 81% (71%), диазинон 67% (64%), метилпаратион 60% (62%), хлорпирифос 60% (61%), фозалон 79% (68%), дихлофос 44% (63%). В скобках приведены степени извлечения аналита из мочи. Пределы обнаружения ФОП в моче и крови составили от 0.1 до 1 нг/мл.

Подбор условий хроматографического разделения: режим разделения на стандартной колонке с неполярной фазой выбран эмпирически, так, чтобы целевые соединения не элюировались одновременно с основными компонентами матрицы.

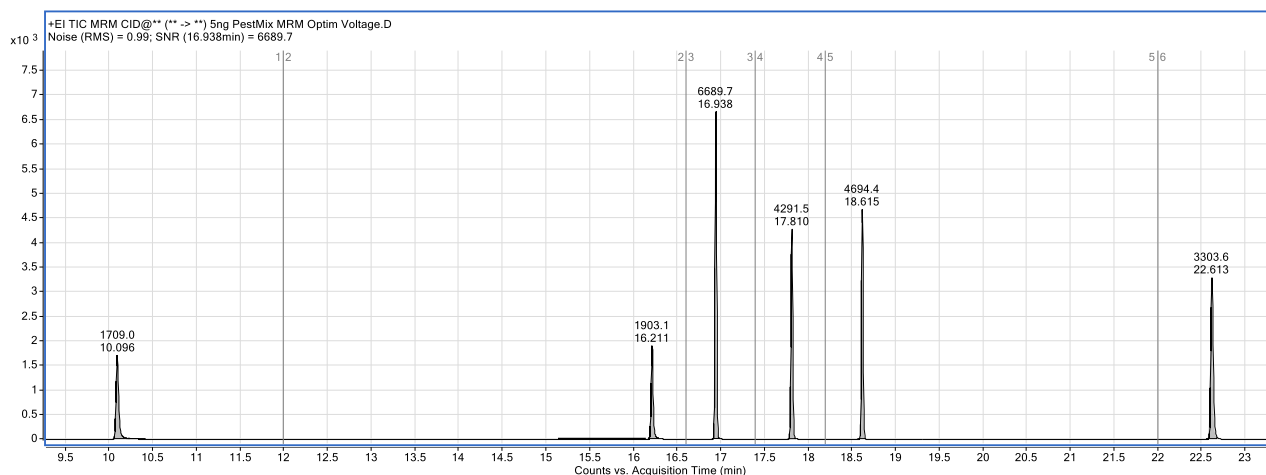


Рисунок 34 — Масс-хроматограмма экстракта из образца цельной крови с внесенными 5 нг каждого компонента, зарегистрированная по оптимальным переходам с оптимальной энергией коллизии

На рисунке 34 приведена масс-хроматограмма экстракта из образца цельной крови с

внесенными 5 нг каждого компонента, зарегистрированная по оптимальным переходам с оптимальной энергией коллизии. Над пиками указаны значения сигнал/шум (S/N).

Подбор условий масс-селективного детектирования: оптимизация условий масс-селективного детектирования включала выявление реакций (режим МРМ) и энергий коллизии, характеризующихся максимальным значением отношения сигнал/шум при анализе биологического образца. Основные МС-МС переходы для целевых ФОП приведены в таблице 40:

Таблица 40 — Основные МРМ-переходы целевых фосфорорганических пестицидов

ФОП	МРМ-переходы, $m/z \rightarrow m/z$
Дихлофос	185 \rightarrow 109, 185 \rightarrow 93, 145 \rightarrow 109, 145 \rightarrow 113, 109 \rightarrow 79, 109 \rightarrow 47
Диметоат	125 \rightarrow 47, 125 \rightarrow 79, 93 \rightarrow 63, 87 \rightarrow 46
Диазинон	304 \rightarrow 179, 199 \rightarrow 93, 199 \rightarrow 135, 179 \rightarrow 122, 179 \rightarrow 137, 179 \rightarrow 164, 137 \rightarrow 54, 137 \rightarrow 84
Метилпаратион	263 \rightarrow 109, 125 \rightarrow 47, 125 \rightarrow 79, 109 \rightarrow 79
Хлорпирифос	314 \rightarrow 190, 314 \rightarrow 240, 314 \rightarrow 258, 314 \rightarrow 286, 197 \rightarrow 169
Фозалон	367 \rightarrow 121, 367 \rightarrow 138, 367 \rightarrow 182, 182 \rightarrow 75, 182 \rightarrow 102, 182 \rightarrow 111

В тандеме ("а" \rightarrow "б") "а" — это массовое число иона-фрагмента в исходном масс-спектре, который пропускает первый квадруполь (Q1), "б" соответствует массовому числу осколка материнского иона, полученного при соударении с молекулами инертного газа в ячейке соударений (дочернего иона). Второй квадруполь пропускает в единицу времени только дочерний ион, таким образом обеспечивается высокая селективность даже в образцах, сильно загрязненных фоновыми компонентами, к которым относятся биологические образцы крови и мочи.

Для повышения чувствительности анализа и снижения пределов обнаружения определяемых веществ необходимо было подобрать оптимальные значения энергий коллизии для регистрации основных МРМ-переходов целевых фосфорорганических пестицидов (см. таблицу 41).

Таблица 41 — Аналитические характеристики целевых соединений. Временные интервалы регистрации и характеристичные реакции (режим МРМ)

№ п/п	Временной интервал, мин	Название соединения	Время удерживания, мин	МРМ для количественного анализа	Энергия коллизии, В ¹
1	8.00 — 13.00	Дихлофос	10.082	109 \Rightarrow 79	5
2	14.00 — 16.60	Диметоат	16.199	87 \Rightarrow 46	15
3	16.85 — 17.40	Диазинон	16.942	137 \Rightarrow 84	15
4	17.40 — 18.20	Паратион метил	17.796	263 \Rightarrow 109	15
5	18.20 — 21.50	Хлорпирифос	18.601	197 \Rightarrow 169	15
6	22.30 — 30.60	Фозалон	22.600	182 \Rightarrow 111	15

Примечание: ¹ — Энергия коллизии (соударений) приведена в вольтах, так как это часть настройки режима работы ячейки соударений в тандемном масс-спектрометре.

Такой подход позволил оптимизировать чувствительность при определении целевых соединений на фоне мешающих компонентов в биологической матрице. Полученные в ходе

оптимизации аналитические характеристики приведены в таблице 41.

Количественное определение ФОП с помощью предложенного метода возможно на уровне 1 нг/мл в биологических образцах. Методика измерений массовых концентраций фосфорорганических пестицидов в биопробах методом газовой хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием прошла метрологическую аттестацию (Свидетельство об аттестации методики измерений № 222.0320/01.00258/2013) и может быть применена в целях биоаналитического мониторинга работников, занятых в сфере производства и применения пестицидов, а также лиц с пониженным уровнем активности холинэстеразы, либо с соответствующими клиническими симптомами.

Таблица 42 — Параметры удерживания, молекулярные массы и брутто-формулы фосфорорганических пестицидов модельной группы

ФОП	Формула	MW	m/z [M+H]	RT, мин
Дихлофос	$C_4H_7Cl_2O_4P$	219.94535	220.95054	4.74
Диметоат	$C_5H_{12}NO_3PS_2$	228.99907	230.00365	13.33
Диазинон	$C_{12}H_{21}N_2O_3PS$	304.10050	305.10334	3.86
Метилпаратион	$C_8H_{10}NO_5PS$	263.00118	264.00900	-
Хлорпирифос	$C_9H_{11}C_{13}NO_3PS$	348.92573	348.92573 350.93335* 351.92661* 352.93005* 353.92352*	0.68
Фозалон	$C_{12}H_{15}ClNO_4PS_2$	366.98631	366.98631	0.90

Примечание: * — m/z [M+H] для качественного анализа.

При разработке методики количественного определения ФОП был разработан проект методики целевого количественного определения пестицидов и их метаболитов в биологических образцах методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием высокого разрешения. Для анализа ФОП приоритетной матрицей является моча, в которой определяют, как сами пестициды, так и продукты их метаболизма. В зарубежных лабораториях для определения ФОП используют наравне ГХ-МС и ВЭЖХ-МС.

В таблице 42 приведены брутто-формулы и точные массы молекулярных и $[M+H]^+$ ионов. Для определения параметров удерживания, точной массы и MRM переходов были приготовлены растворы пестицидов в воде с концентрацией 25 нг/мл по каждому компоненту.

На рисунке 35 приведена масс-хроматограмма смеси пестицидов в воде с концентрацией 25 нг/мл по каждому компоненту. Как видно из рисунка, все хроматографические пики компонентов характеризуется значительной величиной отношения сигнал-шум, за исключением метилпаратиона, определение которого не удалось по неизвестным причинам.

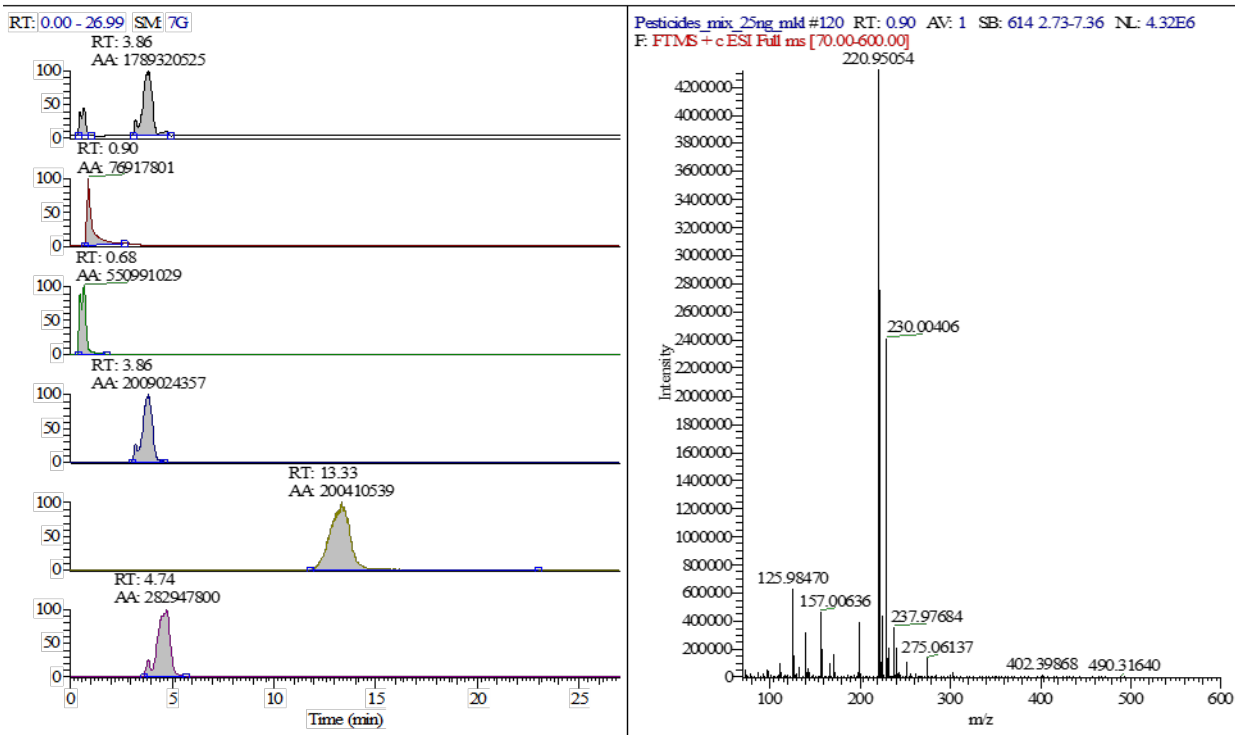


Рисунок 35 — Масс-хроматограмма смеси пестицидов в воде, концентрация 25 нг/мл

Условия хроматографического разделения: хроматографическая колонка C18 Agilent 2.1×50 мм × 1.8 мм. Подвижная фаза: компонент А — 0.1% раствор муравьиной кислоты в де-ионизованной воде и 5мМ формиат аммония; компонент В — 0.1 % раствор муравьиной кислоты в метаноле категории для градиентной ВЭЖХ и 5мМ формиат аммония. Режим хроматографического элюирования — изократический — 70 % В и 30 % А. Скорость потока элюента — 0.250 мл/мин. Температура термостата колонки: 35°C. Температура термостата отделения для проб: 5°C. Объем ввода пробы: 10.0 мкл. Общее время анализа 27 мин.

Условия масс-селективного детектирования: масс-спектрометр LTQOrbitrapVelos с источником ионизации HESI в режиме положительной ионизации. Режим ионизации: ионизация электростатическим распылением при атмосферном давлении. Режим детектирования: мониторинг избранных реакций (SRM): дихлофос: 220.95054 → 127.150; 144.981; диметоат: 230.00365 → 198.964; диазинон: 305.10334 → 169.0788; хлорпирифос: 349.92972 → 114.961; 197.927; фозалон: 367.98927 → 182.0003.

На основании полученных данных была разработана методика определения пестицидов в моче и цельной крови методом ВЭЖХ-МС/МС.

На рисунке 36 представлена принципиальная схема разработанной методики определения компонентов смеси пестицидов в моче.

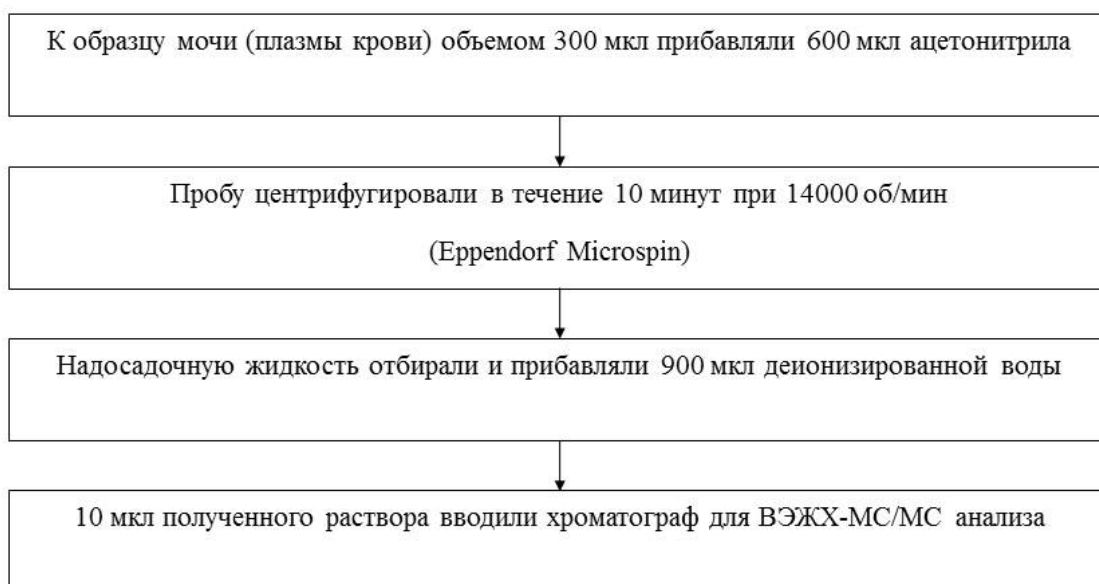


Рисунок 36 — Блок-схема процедуры определения фосфорорганических пестицидов в моче или плазме крови

В результате сравнения двух версий масс-спектрометрических методик было принято решение внести в методические рекомендации [263] именно ГХ-МС/МС методику, так как благодаря стадии концентрирования пределы обнаружения оказываются ниже, чем в режиме ВЭЖХ-МС/МС.

Методика определения ФОП с пределами обнаружения 1 нг/мл в биологических образцах методом газовой хроматографии с тандемным масс-спектрометрическим детектированием прошла метрологическую аттестацию (Свидетельство № 222.0320/01.00258/2013). Показано, что достигнутые пределы обнаружения позволяют определять ФОП в течение 6 дней после отравления дозами, эквивалентными от 1/10 DL_{50} до 1/50 DL_{50} .

3.3.2. Разработка методики определения летучих органических соединений в моче и крови

В данном разделе приведены результаты разработки методики определения летучих соединений в цельной крови и моче, которая охватывает 16 летучих промышленных загрязнителей. В модельную группу летучих органических соединений включены следующие соединения: аллилхлорид, акрилонитрил, бутилхлорид, дисульфид углерода, хлороацетонитрил, гексахлорэтан, нитробензол, метакрилонитрил, этилметакрилат, метилакрилат, пентахлорэтан, *транс*-1,4-дихлор-2-бутен, диэтиловый эфир, метилметакрилат, 2-нитропропан, тетрагидрофуран (см. 2.5.7). Методика прошла метрологическую аттестацию в диапазоне концентраций от 1 до 20 нг/мл (Свидетельство № 222.0319/01.00258/2013 от "08" ноября 2013 г.).

Наименее токсичным соединением модельной смеси является метилметакрилат с DL_{50} 7872 мг/кг, а самым токсичным — аллилхлорид с DL_{50} 22 мг/кг. Если проводить оценку токсичности смеси по аллилхлориду, тогда кроликам вводили не более 1/100 DL_{50} . Период детектирования

аллилхлорида в крови при этом составляет до 6 часов после однократного введения. Конечный вариант методики определения ЛПЗ в биологических образцах приведен в разделе 2.10.

Летучие органические соединения, по определению IUPAC — это органические вещества, имеющие при 293.15 К давление паров, равное 0.01 кПа или более [404]. Так как принадлежность к летучим веществам определяется по давлению паров, то под это определение могут попадать вещества различных классов и с разными химическими свойствами. Одно из самых важных промышленных применений ЛПЗ — их использование как растворителей. В качестве примера можно указать, что в период между 1986 и 1993 годами в Германии было произведено более полумиллиона тонн органических растворителей. Можно выделить 10 наиболее часто применяемых и, соответственно, анализируемых ЛПЗ в смесях промышленных растворителей: ксилолы, толуол, этилацетат, бутилацетат, этилбензол, бутанол, ацетон, этанол, пропанол-2, а также бутанол-2 [405].

Наиболее часто в промышленности в качестве растворителей применяют соединения бензольного ряда (толуол, ксилол, сольвент) и конгенеры хлорметана (хлороформ, дихлорэтан, четыреххлористый углерод, хлористый метил), спирты (метиловый, пропиловый, этиловый и др.) и кислородсодержащие (бутил, этил, метилацетаты, кетоны и альдегиды). Отдельные виды соединений, встречающихся в природе и на производстве (дихлорэтан, четыреххлористый углерод, хлористый метилен), обладают аллергенным действием. Органические растворители проникают в организм через органы дыхания (в виде паров) и кожные покровы. Вещества этой группы оказывают на организм наркотическое и раздражающее действие, вызывают поражение нервной и кровеносной систем и паренхиматозных органов.

Подбор условий пробоподготовки и газохроматографического разделения проводили сначала с внесением смеси ЛПЗ в воду, а затем в образцы цельной крови, гемолизованной крови и мочи человека.

В хроматографическую виалу объемом 4 мл, содержащую 1 мл деионизованной воды (крови, мочи), вносили определенное количество рабочего раствора смеси 524, содержащего 5 (20.0; 50.0; 100.0; 200.0) нг смеси 524.2 и 40 нг смеси дейтерированных веществ в качестве хроматографических стандартов. Пробу термостатировали в течение 6 минут при 40°C, при постоянном перемешивании.

Отбор пробы производили на микроволокно 85um Carboxen/PDMS из равновесного пара в течение 6 минут при постоянном перемешивании пробы и при 40°C. Термодесорбцию уловленных аналитов проводили в горячем инжекторе хроматографа. Для хроматографического разделения использовали полярную капиллярную колонку SPB-1701. Фрагмент масс-хроматограммы модельной смеси, полученный с использованием этой колонки, приведен на рисунке 37.

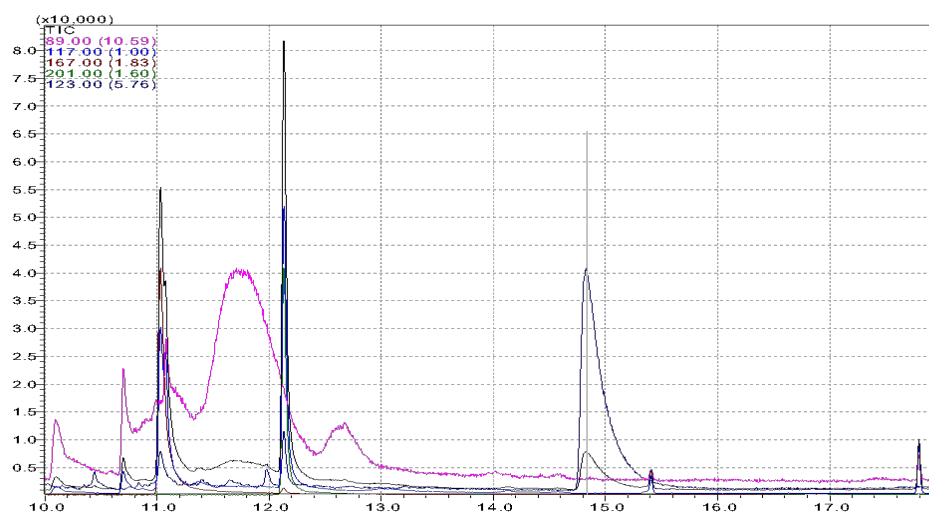


Рисунок 37 — Фрагмент масс-хроматограммы смеси ЛПЗ, концентрация компонентов 100 нг/мкл (с 10.0 по 17.0 мин.)

В качестве внутреннего стандарта опробован нафталин- d_8 , однако, было выявлено, что микроволокно 85 μm Carboxen/PDMS обладает "памятью" по отношению к нафталину, так как в ходе кондиционирования волокна не удавалось получить чистую хроматограмму. В результате нами была использована смесь из трех внутренних стандартов (см. таблицу 43).

Таблица 43 — Параметры хромато-масс-спектрометрического анализа внутренних стандартов

№ п/п	Название соединения	Время удерживания, мин	m/z
1	Пердейтеробензол	2.96	84
2	Ацетон d_6	1.95	46, 64
3	Дейтерохлороформ	2.76	84, 86

Масс-спектрометрическое определение летучих органических соединений выполняли в режиме мониторинга избранных ионов в следующих диапазонах:

- с 0.50-2.10 мин регистрация m/z : 59; 74; 76; 46; 64;
- с 2.10-2.85 мин регистрациям/z: 52; 53; 55; 72; 84; 86; 56;
- с 2.85-3.90 мин регистрациям/z: 67; 84; 54;
- с 3.90-6.50 мин регистрациям/z: 100; 75; 43; 77; 69;
- с 10.0-18.0 мин регистрациям/z: 89; 117; 167; 201; 123; 136.

Для повышения эффективности хроматографического разделения компонентов смеси было принято решение о замене колонки SPB-1701 на DB-624, которая отличается повышенной толщиной пленки неподвижной фазы. Показано, что эффективность разделения в этих условиях значительно выше (см. рисунок 38).

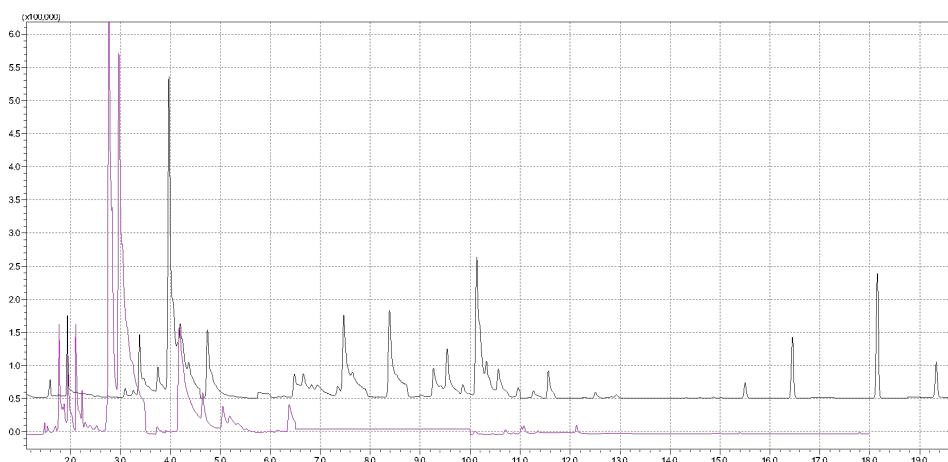


Рисунок 38 — Сравнение масс-хроматограмм паровой фазы над образцом воды с внесением 70 нг модельной смеси. Вверху — при использовании колонки DB-624. Внизу — при использовании колонки SPB-1701

Стоит отметить, что хроматографическое разделение самых легких компонентов модельной смеси при переходе на колонку DB-624 значительно лучше (см. таблицу 44). Так, на колонке SPB-1701, эти три компонента элюируются за 0.19 минуты, а на колонке DB-624 за 0.82 минуты.

Таблица 44 — Газохроматографические времена удерживания и характеристичные ионы компонентов модельной смеси. Приведено сравнение времен удерживания зарегистрированных с использованием колонок SPB-1701 и DB-624.

№ п/п	Название соединения	Время удерживания на колонке SPB 1701, мин	Время удерживания на колонке DB-624, мин	Характеристичные ионы, m/z
1	Этиловый эфир	1.76	3.39	59, 45, 74
2	Дисульфид углерода	1.86	3.99	76
3	Аллилхлорид	1.95	4.21	41, 76
4	Акрилонитрил	2.29	4.75	52, 53
5	Метилакрилат	2.67	6.67	55
6	Тetraгидрофуран	2.71	6.84	42, 72
7	Метакрилонитрил	2.79	7.49	67
8	Бутилхлорид	2.92	7.49	56
9	Метилметакрилат	4.12	9.56	69, 100
10	2-Нитропропан	5.19	10.15	41, 43
11	Хлорацетонитрил	5.85	10.22	48, 75, 77
12	Этилметакрилат	5.95	11.59	69
13	Пентахлорэтан	11.02	15.52	117, 167
14	<i>транс</i> -1,4-Дихлор-2-бутен	11.98	16.47	75, 89, 124
15	Гексахлорэтан	12.13	18.17	117, 201
16	Нитробензол	14.78	19.36	77, 123

Степень извлечения при использовании того или иного микроволокна для определения конкретных органических соединений в значительной степени зависит от качественного и количественного состава анализируемой пробы в целом. Большое значение имеет уровень фонового сигнала в ГХ-МС анализе, который очень высок в случае полярных микроволокон (Carbowax, Polyacrylate). Кроме того, анализируемые вещества конкурируют между собой и с матричными

компонентами в процессе сорбции. Итоговый результат этих процессов заранее непредсказуем и может быть получен лишь в эксперименте с реальными пробами.

В ходе оптимизации методики нами было проведено экспериментальное сравнение различных типов микроволокон с точки зрения эффективности сорбции целевых компонентов из модельной смеси. Вычислить точные значения коэффициентов извлечения анализируемых веществ из матрицы при использовании твердофазной микроэкстракции не представляется возможным, поэтому в таблице 45 приведены площади пиков определяемых компонентов.

Экспериментальное сравнение различных типов микроволокон было выполнено с использованием автоматического инжектора (AOC5000, Shimadzu, Япония).

Блок-схема методики определения целевых компонентов смеси ЛПЗ в биологическом образце приведена на рисунке 16.

В результате была разработана, оптимизирована и подготовлена к аттестации "Методика измерений массовых концентраций летучих экотоксикантов в биологических пробах методом газовой хромато-масс-спектрометрии". Выбраны оптимальные условия подготовки проб, газохроматографического разделения и масс-селективного детектирования.

Таблица 45 — Сравнение различных типов микроволокон для экстракции целевых компонентов из паровой фазы

Название соединения	"Голуб."	"Красн."	ПЭГ	"Сер."	"Желт."	"Бел."	"Роз."
Диэтиловый эфир	452958	17953	1695	166346	1275	1786	28392
Дисульфид углерода	2256564	27551	2665	539337	129	2605	18385
Аллилхлорид	717807	11222	2598	153387	358	743	13798
Акрилонитрил	5822898	62391	188822	2039266	11431	94804	167438
Метилакрилат	4780123	35506	45567	1702115	3878	46442	83363
Метакрилонитрил	1082208	12569	18689	369245	1151	18588	30630
ТГФ	290965	2775	3575	45431	0	3794	19957
Бутилхлорид	3049327	90670	15600	641507	3734	18038	74065
Метилметакрилат	3765829	54501	42154	1519232	6351	44497	158194
2-Нитропропан	3901675	158038	270456.5	1559315	19438	244232	440494
Хлорацетонитрил	2150367	35870	190299	1026926	9329	188292	113293
Этилметакрилат	5361706	127079	72785	3274899	16698	85165	529560
1,4-Дихлор-2-бутен	1887895	64582	76283	1517170	8457	127648	492231
Пентахлорэтан	2415484	273348	142438	2824256	30763	140343	1070284
Гексахлорэтан	651455	219688	95913	3319018	49638	141028	1158940
Нитробензол	9322886	965533	1597526	9639908	81538	2755835	10045033

Методика была апробирована на образцах биологических жидкостей экспериментальных животных, экспонированных смесью летучих промышленных загрязнителей (модельной смесью). Показана эффективность методики для установления факта воздействия летучих промышленных загрязнителей на организм. Кроме того, значительным преимуществом разработанной методики является возможность расширения списка анализируемых летучих соединений без значительных трудовременных затрат, так как сорбция компонентов из паровой фазы на волокно

Carboxen/PDMS является наименее селективной по отношению к химическому классу соединений, а естественным ограничением является только молекулярный вес целевых аналитов. Достигнутые пределы количественного определения составляют не более 1 нг/мл при пределе детектирования 0.2 нг/мл в крови и моче.

3.3.3. Определение токсикокинетических параметров ЛПЗ и ФОП

Разработанные высокочувствительные методики определения ЛПЗ и ФОП в крови и мочи были использованы при экспериментальном моделировании интоксикации с целью определения количественных токсикокинетических параметров целевых соединений. Стоит отметить, что для большинства соединений из групп ЛПЗ и ФОП экспериментальное определение токсикокинетики было проведено впервые.

Таблица 46 — Концентрации ФОП в пробах крови кроликов

Время	Концентрация ксенобиотика, нг/мл				
	Диметоат	Диазинон	Метилпаратион	Хлорпирифос	Фозалон
20 мин	206205	259	997	57	-
1 час	133986	185	695	94	15
3 часа	15025	70	374	82	4
4 часа	3589	64	489	179	19
6 часов	107	25	108	90	13
1 день	следы	8	7	10	7
2 дня	следы	2	следы	6	следы

Таблица 47 — Концентрации ФОП в моче кроликов

Время	Концентрация ксенобиотика, нг/мл				
	Диметоат	Диазинон	Метилпаратион	Хлорпирифос	Фозалон
3 часа	20391	32	132	53	74
1 день	1197	64	188	79	149
2 дня	50	41	51	32	70
3 дня	35	9	34	21	30
6 дней	28	10	32	10	30

Таблица 48 — Концентрации ЛПЗ в пробах крови кроликов

ЛПЗ	Концентрация токсикантов, нг/мл						
	10 мин	30 мин	1 час	2 часа	4 часа	6 часов	1 день
Этиловый эфир	662	496	270	597	495	56	37
Метилакрилат	572	903	709	224	45	4	1.6
Метилметакрилат	-	4	следы	0.9	следы	0.6	0.5
2-Нитропропан	381	517	379	120	25	7	следы
Гексахлорэтан	10	10	6	3	2	следы	-
Нитробензол	510	546	423	198	182	165	10
Дисульфид углерода	150	99	51	27	13	10	1
Аллилхлорид	80	48	25	12	4	3	следы
Акрилонитрил	57	15	1	следы	следы	следы	следы
Метакрилонитрил	2474	1925	903	148	14	5	следы
Бутилхлорид	63	47	22	9	6	6	1
Хлорацетонитрил	97	20	4	следы	следы	следы	следы
Этилметакрилат	1	0.7	0.4	0.2	следы	0.9	0.5
1,4-дихлор-2-бутен	650	236	124	47	37	35	3
Пентахлорэтан	36	26	13	5	5	6	1

Определение концентраций ЛПЗ в крови и моче кроликов производили методом ГХ-МС, в соответствии с методикой количественного анализа (см. раздел 2.10), а количественное определение ФОП в крови и моче производили методом ГХ-МС/МС (см. раздел 2.9). Результаты количественного химического анализа приедены в таблицах 46-49.

Таблица 49 — Концентрация ЛПЗ в пробах мочи кроликов

ЛПЗ	Концентрация токсикантов, нг/мл			
	2 часа	6 часов	1 день	5 дней
Этиловый эфир	1174	3345	129	4
Дисульфид углерода	10	75	9	3
Аллилхлорид	следы	следы	следы	следы
Акрилонитрил	6	3	5	следы
Метилакрилат	2906	199	39	4
Метакрилонитрил	354	6	8	2
ТГФ	381	16	113	-
Бутилхлорид	1	0	0	4
Метилметакрилат	-	-	следы	следы
2-нитропропан	69	92	1	1
Хлорацетонитрил	3	-	-	-
Этилметакрилат	1	5	13	следы
1,4-дихлор-2-бутен	292	4	8	9
Пентахлорэтан	-	-	2	1
Гексахлорэтан	2	5	1	следы
Нитробензол	86	69	НО	-

Установление зависимости от времени концентрации биомаркера экспозиции токсичного химического соединения позволяет провести приблизительную оценку абсорбированной дозы ксенобиотика. Основными токсикокинетическими параметрами являются:

– константа скорости элиминации (обозначается k_a , размерность — $ч^{-1}$, мин⁻¹) — параметр, характеризующий скорость исчезновения (элиминации) ксенобиотика из организма путем экскреции (выделения с мочой, калом, слюной, молоком и др.) и биотрансформации. При двухфазном выведение необходимо учитывать две константы элиминации: k_a и k_b .

– константа скорости абсорбции (всасывания) (обозначается $k_{абс}$, размерность — $ч^{-1}$, мин⁻¹) — параметр, характеризующий скорость поступления ксенобиотика из места введения в системный кровоток при внесосудистом способе введения;

– кажущаяся начальная концентрация ксенобиотика (обозначается C_0 , размерность ммоль/л, мкг/мл, нг/мл) — условный параметр, равный той концентрации, которая получилась бы в плазме крови при условии введения препарата в кровь и мгновенного распределения его по органам и тканям. При линейной кинетике препарата в организме эта величина прямо пропорциональна дозе препарата;

– период полувыведения ($t_{1/2}$, размерность ч, мин) — это время, необходимое для снижения наполовину количества ксенобиотика в организме в процессе элиминации;

– величина максимальной концентрации ($C_{\text{макс}}$ размерность ммоль/л, мкг/мл, нг/мл) — наибольшее из измеренных значений концентрации;

– время установления максимальной концентрации, установленное экспериментально ($t_{\text{макс}}$, размерность ч, мин);

– площадь под фармакокинетической кривой "концентрация–время" (от нуля до последнего момента отбора крови или мочи) (AUC_{0-t});

– среднее время пребывания препарата в организме (MRT_{0-t} , час, мин).

Для вычисления токсикокинетических параметров, ЛПЗ, как и ФОП, были разделены на четыре категории на основании полученных данных об изменении их концентраций в крови во времени.

Скорости абсорбции диметоата, диазинона и метилпаратиона из желудка в системный кровоток, а также аллилхлорида, акрилонитрила, бутилхлорида, дисульфида углерода, хлорацетонитрила, метакрилонитрила, этилметакрилата, пентахлорэтана и *E*-1,4-дихлор-2-бутена из места подкожной инъекции, настолько высоки, что зарегистрировать максимум на токсикокинетической кривой не представляется возможным, поэтому было принято решение при расчетах пренебречь фазой абсорбции, а вычисление токсикокинетических параметров этой группы соединений производить с использованием модели внутривенного введения (формула 1 или 2). Вычисление параметров остальных соединений было проведено с учетом фазы абсорбции по уравнению 3 или 4. Графики зависимости концентраций ксенобиотика от времени при различных формах абсорбции и элиминации приведены на рисунке 39.

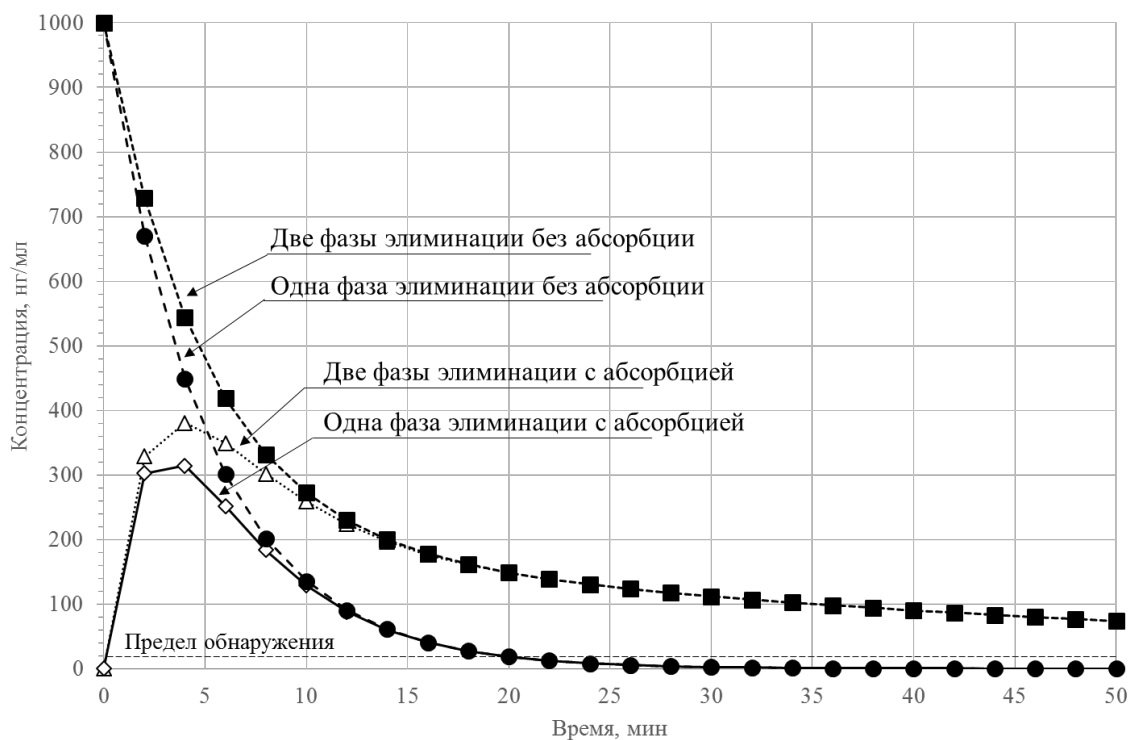


Рисунок 39 — Графики зависимости концентраций ксенобиотика от времени при различных формах абсорбции и элиминации

При моделировании токсикокинетики необходимо учесть тот факт, что часть соединений элиминируется из организма в две фазы, быструю и медленную, поэтому при вычислении токсикокинетических параметров две группы соединений были дополнительно разделены еще на две подгруппы каждая. В результате моделирование токсикокинетики было проведено по одному из четырех уравнений (см. таблицу 50).

Таблица 50 – Различные способы моделирования зависимости концентрации веществ в крови от времени

Модель	Уравнение зависимости концентрации ксенобиотика в крови от времени
Одна фаза элиминации без абсорбции	$C = C_0 \times e^{-k_\alpha t}$ (1)
Две фазы элиминации без абсорбции	$C = C_0 \times (P_f \times e^{-k_\alpha t} + (1 - P_f) \times e^{-k_\beta t})$ (2)
Одна фаза элиминации с абсорбцией	$C = C_0 \times (1 - e^{-k_{абс} t}) \times e^{-k_\alpha t}$ (3)
Две фазы элиминации с абсорбцией	$C = C_0 \times (1 - e^{-k_{абс} t}) \times (P_f \times e^{-k_\alpha t} + (1 - P_f) \times e^{-k_\beta t})$ (4)

Примечание: C – концентрация ксенобиотика в крови в момент времени, нг/мл; C_0 – кажущаяся начальная концентрация ксенобиотика, нг/мл; P_f – доля длительности быстрой фазы (альфа фазы); k_α – константа элиминации в быстрой фазе (альфа фазе) или константа элиминации при однофазном выведении, мин^{-1} ; k_β – константа элиминации в медленной фазе (бета фазе), мин^{-1} ; $k_{абс}$ – константа абсорбции, мин^{-1} .

Токсикокинетические параметры дихлофоса не были вычислены, так как период детектирования при введении дозы 0.1 DL₅₀ оказался слишком мал (около 6 часов). Использование более высокой дозы дихлофоса (0.3 DL₅₀) в сочетании с другими ФОП модельной смеси привело к летальному исходу. Установление факта отравления дихлофосом возможно проводить путем определения его метаболитов в биологических образцах (см. раздел 3.2.1). Вычисленные значения токсикокинетических параметров приведены в таблице 51.

Из приведённых данных видно, что дольше всего в биообразцах кроликов детектируются фозалон и хлорпирифос, средней скоростью выведения обладают метил паратион и диметоат, быстрее всего выводится диазинон.

Сравнение полученных нами токсикокинетических параметров ФОП с литературными данными показало их высокую достоверность. Так, например, период полувыведения диазинона составляет 1.6 часа для быстрой фазы. Полученный нами результат составляет 1.24 часа. Константа элиминации диазинона оценена в 0.0059 мин^{-1} , а наша оценка составляет 0.011 мин^{-1} . Константа элиминации метилпаратиона, согласно литературным данным, составляет 0.0083 мин^{-1} , а наша оценка составила 0.0075 мин^{-1} .

Таблица 51 — Экспериментальные токсикокинетические параметры ЛПЗ и ФОП

Соединение, доза	C_0 , нг/мл	$k_{абс}$, мин ⁻¹	Pf	k_a , мин ⁻¹	k_b , мин ⁻¹	$AUC_{0-\infty}$, нг×мин/ мл	C_{max} , нг/мл
Две фазы элиминации без абсорбции							
<i>E</i> -1,4-Дихлор-2-бутен, 0.22 мг/кг	979	-	0.27	0.0430	0.0040	52591	650
Диазинон, 15 мг/кг	308	-	0.75	0.0110	0.0017	0.5×10^5	243
Дисульфид углерода, 0.22 мг/кг	178	-	0.60	0.0190	0.0036	17326	150
Метакрилонитрил, 0.22 мг/кг	3140	-	0.28	0.0200	0.0056	143850	2474
Метилпаратион, 40 мг/кг	954	-	0.47	0.0075	0.0024	1.8×10^5	836
Пентахлорэтан, 0.22 мг/кг	43	-	0.67	0.0182	0.0026	7021	36
Одна фаза элиминации без абсорбции							
Аллилхлорид, 0.22 мг/кг	98	-	-	0.022	-	7200	80
Акрилонитрил, 0.22 мг/кг	110	-	-	0.066	-	1326	57
Бутилхлорид, 0.22 мг/кг	77	-	-	0.018	-	8677	63
Диметоат, 40 мг/кг	2×10^5	-	-	0.012	-	13×10^6	1.5×10^5
Хлорацетонитрил, 0.22 мг/кг	211	-	-	0.078	-	2129	97
Этилметакрилат, 0.22 мг/кг	1,4	-	-	0.020	-	901	1.2
Две фазы элиминации с абсорбцией							
Диэтиловый эфир, 0.22 мг/кг	1103	0.096	0.74	0.0050	0.0024	200808	662
Метилакрилат, 0.22 мг/кг	1833	0.044	0.37	0.0230	0.0054	92153	903
Метилметакрилат, 0.22 мг/кг	6.3	0.067	0.63	0.0160	0.0054	441	3.9
Нитробензол, 0.22 мг/кг	573	0.260	0.28	0.0054	0.0013	184771	546
Хлорпирифос, 20 мг/кг	92	0.037	0.61	0.0014	0.0009	0.9×10^5	78
Одна фаза элиминации с абсорбцией							
2-Нитропропан, 0.22 мг/кг	864	0.066	-	0.0190	-	53961	517
Гексахлорэтан, 0.22 мг/кг	13	0.150	-	0.0140	-	1070	10
Фозалон, 30 мг/кг	19	0.024	-	0.0011	-	15683	17

Зачастую сопоставить наши экспериментальные данные и литературные затруднительно, так как не всегда удается найти описание эксперимента с использованием того же вида животных, часто используются различные дозы при экспериментальном моделировании интоксикаций.

Периоды детектирования ЛПЗ и ФОП в крови и моче после однократного перорального введения при использовании методики количественного анализа методами ГХ-МС и ГХ-МС/МС приведены в таблице 52. Детектирование проводилось только по определению содержания в анализируемой пробе целевого соединения в нативной форме, без учета содержания метаболитов.

На 6-е сутки после затравки в крови кроликов не обнаружены следы ФОП. После 6 дня в моче обнаруживаются только следы фозалона. На основании результатов количественного определения ЛПЗ в биожидкостях можно заключить, что моча является более показательной матрицей для установления факта воздействия ЛПЗ на организм, большая часть ЛПЗ детектируется в моче в течение 5 дней. В крови самый продолжительный период обнаружения у диэтилового эфира, остальные ЛПЗ можно обнаружить только в течение 24 часов. Стоит отметить, что дозы всех ЛПЗ, введенные экспериментальным животным были одинаковы и составили 0.22 мг/кг.

Метаболиты ЛПЗ в этом эксперименте не определяли, а токсикокинетические параметры и периоды детектирования определены только для целевых соединений в неметаболизированной форме.

Таблица 52 — Периоды детектирования ЛПЗ и ФОП в крови и моче после однократного внутрижелудочного введения при использовании методики количественного анализа

Соединение	Период детектирования, сутки	
	Кровь	Моча
Дихлофос	<1	<1
Диметоат	3	3
Диазинон	3	3
Метил паратион	2	3
Хлорпирифос	3	3
Фозалон	5	>6
Этиловый эфир	5	>5
Дисульфид углерода	2	1
Аллилхлорид	1	1
Акрилонитрил	1	5
Метилакрилат	1	>5
Метакрилонитрил	1	5
ТГФ	1	5
Бутилхлорид	2	>5
Метилметакрилат	1	1
2-нитропропан	1	5
Хлорацетонитрил	1	1
Этилметакрилат	1	5
1,4-дихлор-2-бутен	1	5
Пентахлорэтан	1	5
Гексахлорэтан	1	5
Нитробензол	1	>5

Как было отмечено ранее, экспозиция ФОП обычно выявляется по сравнению активности ацетилхолинэстеразы плазмы крови или эритроцитов. Однако этот метод не обладает достаточной селективностью и чувствительностью для определения низких уровней экспозиции. Кроме того, для этого метода необходимо определение исходного уровня активности фермента у неэкспонированных людей [406], также он не позволяет установить тип ФОП. Между тем, идентификация конкретного соединения из широкого спектра возможных вариантов более востребована химико-токсикологической практикой, чем целевое определение заранее известного соединения.

Рассмотрим далее количественные характеристики воздействия ФОП на организм: при нанесении 100 мг диазинона на кожу добровольцев было показано, что выявить статистически значимое уменьшение активности АСhE (на 14 %) возможно в течение 48 ч в плазме, при этом в эритроцитах вообще не обнаружено ингибирование фермента [407]. Накожное воздействие хлорпирифоса в дозе 5 мг/кг приводила к ингибированию АСhE в плазме крови на 29% даже на

14-й день [408], что согласуется с существенно меньшей IC_{50} хлорпирифоса – 4.3 мкМ по сравнению с диазиноном – 200 мкМ [409]. При этом, авторы [408] отмечают большую флуктуацию данных по ингибированию АСhЕ, так у некоторых добровольцев доза 5 мг/кг не приводила к значимому ингибированию, в то время как у некоторых доза уже в 0.5 мг/кг вызывала снижение активности фермента. В другой публикации [410] отмечено, что 1 мг хлорпирифоса перорально не оказывал влияния на активность АСhЕ у добровольцев.

Величинами IC_{50} АСhЕ плазмы крови человека охарактеризованы только диазинон – 200 мкМ, хлорпирифос – 4.3 мкМ, метилпаратион – 19.2 мкМ и диметоат – 190 мкМ [409]. Для фозалона не удалось обнаружить справочную величину IC_{50} . Таким образом можно ожидать что чувствительность разработанной методики с пределом обнаружения в 1 нг/мл крови будет сопоставима с методом измерения активности холинэстеразы для хлорпирифоса и метилпаратиона, а для диазинона, диметоата и, возможно, фозалона – будет выше. Кроме того, количественное определение биомаркера экспозиции в двух биологических жидкостях не требует сведений об исходных значениях концентраций (или активностей) для конкретного индивида до контакта с токсичным веществом.

Оценка внутренней или абсорбированной дозы веществ возможна с помощью количественного определения биомаркеров экспозиции в биологических пробах (моче, кале, крови и/или ее компонентах, в выдыхаемом воздухе), при этом необходимым условием является известная зависимость концентрации биомаркера от времени, то есть его токсикокинетические параметры, а отбор проб проведен в известные моменты времени [3]. Таким образом, одномерная величина — концентрация ксенобиотика в образце — становится функцией концентрации от времени, что позволяет существенно повысить информативность биоаналитического мониторинга, а также вплотную подойти к обоснованию биологических ПДК, которые представляют собой уровни вредных веществ в организме работающего или уровни биологического ответа наиболее поражаемой системы его организма [411].

Вывод о количестве абсорбированного химического соединения дозы на основании концентрации его биомаркера в крови возможно сделать только при условии линейной зависимости площади под токсикокинетической кривой (AUC) от дозы, то есть в диапазоне при котором $AUC = f(\text{доза})$ – линейная функция.

Нами опробована возможность приблизительной оценки абсорбированной дозы ФОП на основании сравнения значений AUC, вычисленных в различные моменты времени, для известной дозы и для искомой. В качестве исходных данных использованы: вид кинетического уравнения, токсикокинетические параметры, время, прошедшее с момента интоксикации до отбора пробы и концентрация ксенобиотика. Далее вычисленные значения AUC были сравнены со значениями

для известной дозы ФОП. При этом было сделано предположение о линейной зависимости абсорбированной дозы от кажущейся начальной концентрации. Для экспериментального обоснования возможности такого допущения необходимы дальнейшие эксперименты.

Таблица 53 – Уравнения для вычисления кажущейся начальной концентрации (C_0) и площади под кинетической кривой "концентрация–время" (от 0 до бесконечности) ($AUC_{0-\infty}$) в момент времени t

Модель	Уравнение
Одна фаза элиминации без абсорбции	$C_0 = \frac{C}{e^{-k_\alpha t}}$ (5)
	$AUC_{0 \rightarrow \infty} = \frac{C_0}{k_\alpha}$ (6)
Две фазы элиминации без абсорбции	$C_0 = \frac{C}{P_f \times e^{-k_\alpha t} + (1-P_f) \times e^{-k_\beta t}}$ (7)
	$AUC_{0 \rightarrow \infty} = C_0 \left(\frac{P_f}{k_\alpha} + \frac{1-P_f}{k_\beta} \right)$ (8)
Одна фаза элиминации с абсорбцией	$C_0 = \frac{C}{(1-e^{-k_{абс}t}) \times e^{-k_\alpha t}}$ (9)
	$AUC_{0 \rightarrow \infty} = C_0 \frac{2k_\alpha + k_{абс}}{k_\alpha(k_\alpha + k_{абс})}$ (10)
Две фазы элиминации с абсорбцией	$C_0 = \frac{C}{(1-e^{-k_{абс}t}) \times (P_f \times e^{-k_\alpha t} + (1-P_f) \times e^{-k_\beta t})}$ (11)
	$AUC_{0 \rightarrow \infty} = C_0 \left(\frac{P_f}{k_\alpha} + \frac{1-P_f}{k_\beta} - \frac{P_f}{k_{абс} + k_\alpha} - \frac{1-P_f}{k_{абс} + k_\beta} \right)$ (12)

Примечание: C – концентрация ксенобиотика в крови в момент времени, нг/мл; $AUC_{0-\infty}$ – площадь под кинетической кривой "концентрация–время" (от нуля до бесконечности), нг/мл×мин; C_0 – кажущаяся начальная концентрация ксенобиотика, нг/мл; P_f – доля длительности быстрой фазы (альфа фазы); k_α – константа элиминации в быстрой фазе (альфа фазе) или константа элиминации при однофазном выведении, мин⁻¹; k_β – константа элиминации в медленной фазе (бета фазе), мин⁻¹; $k_{абс}$ – константа абсорбции, мин⁻¹.

Формулы для вычисления начальной концентрации или кажущейся начальной концентрации в момент времени приведены в таблице 53 (формулы 5, 7, 9 и 11). Там же приведены формулы, связывающие C_0 и AUC (6, 8, 10 и 12). На основании вычисленных токсикокинетических параметров и экспериментальных данных была проведена оценка введённой дозы ФОП (таблица 54).

Из приведенных данных можно заметить, что отклонение при оценке дозы редко превышает 100% и не зависит от точки отбора пробы крови. Например, при установлении дозы диазинона, вызвавшей отравление, при отборе пробы крови у пострадавшего можно было бы заключить, что реальная доза составляет от 0.06 до 0.17 DL_{50} при отборе различных точек от 30 минут до 24 часов, а в среднем 0.11 DL_{50} (истинная доза в эксперименте 0.1 DL_{50}).

Для увеличения точности оценки введённой дозы необходимо провести оценку линейности токсикокинетических параметров, то есть определить границы дозы, в которых константы элиминации и абсорбции не меняют своих значений.

Таблица 54 — Отклонения в оценках доз ФОП, введённых кроликам по результатам измерений их концентраций в крови через определенные промежутки времени после введения

Время	Оценка абсорбированной дозы ФОП				
	Диметоат (Доза _{ист} = 40 мг/кг)	Диазинон (Доза _{ист} = 15 мг/кг)	Метилпаратион (Доза _{ист} = 40 мг/кг)	Хлорпирифос (Доза _{ист} = 20 мг/кг)	Фозалон (Доза _{ист} = 30 мг/кг)
20 мин	50 мг/кг (+26%)	16 мг/кг (+7%)	46 мг/кг (+16%)	24 мг/кг (+20%)	24 мг/кг (-20%)
30 мин	14 мг/кг (-65%)	15 мг/кг (0%)	25 мг/кг (+38%)	7 мг/кг (-65%)	31 мг/кг (+2%)
1 час	53 мг/кг (+33%)	18 мг/кг (+17%)	40 мг/кг (+1%)	24 мг/кг (+20%)	21 мг/кг (-30%)
2 часа	18 мг/кг (-53%)	9 мг/кг (-40%)	14 мг/кг (-65%)	6 мг/кг (-70%)	8 мг/кг (-75%)
3 часа	24 мг/кг (-38%)	17 мг/кг (+13%)	39 мг/кг (-3%)	22 мг/кг (+10%)	38 мг/кг (+27%)
4 часа	12 мг/кг (-69%)	21 мг/кг (+37%)	68 мг/кг (+70%)	53 мг/кг (+165%)	30 мг/кг (+1%)
6 часов	3 мг/кг (-92%)	13 мг/кг (-11%)	28 мг/кг (-31%)	24 мг/кг (+20%)	45 мг/кг (+50%)
1 день	-	25 мг/кг (+67%)	223 мг/кг (+458%)	14 мг/кг (-30%)	75 мг/кг (+150%)

Примечание: * Отклонение вычисляли следующим образом: (Оценка дозы — Истинная доза)/Истинная доза × 100%.

3.3.4. Экстраполяция токсикокинетических параметров летучих промышленных загрязнителей и фосфорорганических пестицидов

Трансляция количественных токсикокинетических параметров от животных к человеку является важнейшей частью экспериментальной токсикологии и фармакологии [412]. Основные стратегии трансляции, используемые в настоящее время предусматривают учет различий в весе и площади поверхности кожи. Такие вычисления называются межвидовым аллометрическим масштабированием. В качестве более сложной альтернативы аллометрии используют физиологически обоснованные фармакокинетические модели или масштабирование с использованием экспериментов *in vitro*, например, при изучении печеночного клиренса на микросомальных фракциях печени [413].

Необходимый набор токсикокинетических параметров позволяющий воспроизвести зависимость концентрации ксенобиотика в крови включает: константы элиминации и абсорбции, для соединений со значимым периодом абсорбции, а также начальную или кажущуюся начальную концентрацию. В случае успешного масштабирования этих параметров возможно оценить период возможного обнаружения маркера токсиканта в крови с использованием известной методики.

В основе аллометрического масштабирования лежит предположение о том, что анатомические особенности (вес органов и пр.), а также физиологические процессы (почечный клиренс,

гемодинамика) можно масштабировать при учете массы или площади поверхности тела. Экстраполяция производится степенным уравнением с коэффициентами $\frac{2}{3}$ или $\frac{3}{4}$ в степени отражающими внутреннюю дозу.

В отечественной практике в руководстве по доклиническим исследованиям [414] приводится формула для масштабирования периода полувыведения ксенобиотиков которая использует соотношение масс тела экспериментального животного и человека:

$$t_{1/2\text{человек}} = t_{1/2\text{крыса}} \times \frac{\text{Масса тела}_{\text{человек}}^{0.25}}{\text{Масса тела}_{\text{крыса}}} \quad (13)$$

Некоторые видовые различия вносят большой вклад в масштабирование некоторые нет. Например, биодоступность и связывание с белками крови может отличаться у крыс и человека, так как альбумин крыс и человека отличается количеством сайтов связывания. Коэффициенты распределения: например, растворимость фторуглеродных аэрозолей в крови и плазме отличаются в 33 раза между видами. Также затруднено масштабирование для веществ, с низким клиренсом которые выводятся преимущественно с использованием оксидаз смешанных функций.

Согласно, EPA⁵ масштабирование дозы токсиканта от крыс к человеку следует выполнять следующим образом:

$$\text{Доза}_{\text{человек}} = \text{Доза}_{\text{крыса}} \times \frac{\text{Масса тела}_{\text{человек}}^{0.667}}{\text{Масса тела}_{\text{крыса}}} \quad (14)$$

С помощью уравнения (14) можно масштабировать не только дозы, но и альвеолярную вентиляцию, сердечный выброс, почечный клиренс, потребление кислорода и пр. [412]. Степень в степенном уравнении (14), по разным данным, может принимать значения 0.667 или 0.75.

В США для масштабирования доз неканцерогенных соединений используют подход, основанный на т.н. коэффициентах запаса или факторах неопределенности. Коэффициенты запаса обычно составляют 10 [415]. Для канцерогенных соединений используют все ту же степенную функцию: $P = aW^b$. Где $b = \frac{2}{3}$ или $\frac{3}{4}$.

В РФ используют более сложный подход установления ОБУВ по параметрам токсикометрии веществ [416] или с помощью интерполяций и экстраполяций в рядах соединений, близких по химической структуре, физическим и химическим свойствам и характеру биологического действия [417].

Необходимый набор токсикокинетических параметров позволяющий воспроизвести зависимость концентрации ксенобиотика в крови включает: константы элиминации и абсорбции, для

⁵ EPA/100/R11/0001 Final Recommended Use of Body Weight^{3/4} as the Default Method in Derivation of the Oral Reference Dose

соединений со значимым периодом абсорбции, начальную или кажущуюся начальную концентрацию. В случае успешного масштабирования этих параметров возможно оценить период возможного обнаружения маркера токсиканта в крови с использованием известной методики.

Некоторыми исследователями предпринимаются попытки создания более точных моделей масштабирования кинетических параметров [412]. Для этого в качестве тренировочного набора данных обычно используют известные фармакокинетические параметры лекарственных средств, что обусловлено значительно большим объемом доступной информации по их кинетике в организме людей и животных, обычно крыс [418]. С использованием такого подхода в работе [412] определены коэффициенты в следующем уравнении:

$$P_{\text{человек}} = a \times P_{\text{крыса}}^b \quad (15)$$

где P – это время полувыведения или объем распределения.

Для вычисления периода полувыведения ($t_{1/2}$ в часах) по уравнению 15 необходимо использовать следующие коэффициенты: $a = 1.58$ и $b = 0.83$. Коэффициент детерминации для избранного набора ксенобиотиков составляет 0.737 и 0.754 для вычисления объема распределения, соответственно. При использовании данного соотношения следует иметь в виду, что при составлении выборки были использованы крысы различных пород и различного пола.

Одним из принципиальных отличий организма крыс от человека является содержание жира, так в организме человека жира, по отношению к массе тела, в 3-4 раза больше чем у крысы. Поэтому логичным способом повышения точности модели (15) является включение в уравнение логарифма коэффициента распределения в системе октанол/вода ($\log P_{o/w}$) [419]. В итоге уравнение (15) приобрело следующий вид:

$$\log t_{1/2(\text{чел})} = a + b \log t_{1/2(\text{крыс})} + c \log P \quad (16)$$

Коэффициент детерминации в случае использования соотношения (16) для избранной выборки составляет уже 0.8474. Модель показывает наилучшую точность для веществ с очень высоким $\log P$ (более 6.5). Для вычисления периода полувыведения ($t_{1/2}$ в часах) по уравнению 16 необходимо использовать следующие коэффициенты: $a = 0.6180$, $b = 0.9504$, $c = 0.0850$.

При определении периода возможного обнаружения маркера токсиканта с использованием уравнений 1-4 необходимо предварительно провести масштабирование периода полувыведения, который, в данном случае, связан с константой элиминации простым отношением: $t_{1/2} = \ln 2 / k_{\text{эл}}$.

Масштабирование начальной концентрации или кажущейся начальной концентрации (C_0) возможно провести только при условии предварительного масштабирования площади под кинетической кривой "концентрация–время" (от нуля до бесконечности) ($AUC_{0-\infty}$), которая связана с C_0 одним из отношений в таблице 53.

В ряде исследований [418] для масштабирования значения NOAEL были использованы данные о AUC препарата и масштабированный клиренс на человека скорректированный на биодоступность (F):

$$NOAEL = \frac{AUC_{\text{животное}} \times Cl_{\text{человек}}}{F} \quad (17)$$

Использование соотношения (17) возможно только при условии, что биологической активностью обладает только неметаболизированная форма целевого вещества. В работе [420] предложено распространить аллометрическое масштабирование на клиренс, что открывает возможности для масштабирования площади под кривой при равенстве полученных доз.

$$\frac{Cl_{\text{человек}}}{Cl_{\text{животное}}} = \left(\frac{\text{Масса тела}_{\text{человек}}}{\text{Масса тела}_{\text{животное}}} \right)^{0,66} \quad (18)$$

Таким образом, при равенстве доз токсичных соединений для животного и человека можно вывести следующее аллометрическое отношение: $AUC_{\text{человек}} = 1/8 \times AUC_{\text{кролик}}$, при средней массе тела человека 70 кг, а кролика – 3 кг.

В общем виде, порядок действий, предпринимаемых для масштабирования основных токсикокинетических параметров включает:

1. Определение типа кинетического уравнения (внутри- или внесосудистое, одна фаза элиминации или две).
2. Вычисление отношения клиренсов человека и экспериментального животного: 1/8 для кролика, 1/36 для крысы, и, соответственно, отношения площадей под кривыми для одинаковых доз.
3. Масштабирование периода полувыведения для одной или нескольких фаз элиминации.
4. При необходимости масштабирование константы абсорбции.
5. Вычисление периода возможного обнаружения.

В доступной литературе не удалось обнаружить способов масштабирования коэффициента P_f – долевого выражения длительности быстрой фазы в уравнениях 2 и 4. Поэтому нами была проведена оценка зависимости периода возможного обнаружения ксенобиотика в крови, на примере метакрилонитрила, от длительности быстрой фазы элиминации (см. рисунок 40).

В результате показано, что коэффициент P_f в уравнениях начинает оказывать существенное влияние на период возможного обнаружения биомаркера только при значениях, превышающих 0.8, поэтому для соединений с таким соотношением продолжительностей быстрой и медленной фаз элиминации рассматриваемый способ масштабирования плохо применим. В дальнейшем, для масштабирования токсикокинетики соединений с двумя фазами элиминации мы использовали коэффициент P_f без масштабирования.



Рисунок 40 — График зависимости периода возможного обнаружения метилметакрилата в крови от длительности быстрой фазы элиминации

Так как при вычислении токсикокинетических параметров соединений зависимость концентрации, которых в крови от времени лучше описывается моделью внесосудистого однократного введения нужно учитывать константу абсорбции, то необходимо рассмотреть способы ее масштабирования.

При подкожном введении химических соединений всасывание в системный кровоток может происходить двумя путями [421]: через капилляры или лимфатические сосуды. При подкожном введении значительную роль играют различные физиологические факторы: кровоток, место ввода, глубина и объем вводимого вещества. Толщина подкожно-жировой клетчатки у человека отличается в зависимости от части тела. Она содержит значительную часть жировой ткани, а жировая ткань не является гомогенной.

В отличие от людей, у животных покрытых мехом значительно меньше связь между кожей и мускулами. У грызунов соединительная ткань содержит множество слоев, каждый из которых слабо связан между собой. Такая незначительная связь между слоями позволяет вводить подкожно значительно большие объемы жидкостей.

Другим отличием является наличие мясистого пласта под кожей, роль которого во всасывании препаратов не до конца ясна. Учитывая множество пробелов в знании о способах масштабирования абсорбции от животных к человеку, для этого зачастую применяются эмпирические способы.

Для масштабирования константы абсорбции при внутрижелудочном введении авторы [422] рекомендуют использовать следующее соотношение: $k_{абс(чел)} = k_{абс(крол)}/a$, где, $a = 1.344$. Для подкожного введения рекомендуют использовать либо классическое аллометрическое соотношение

от массы тела, и тогда для кроликов коэффициент a примет значение 8 [423]. Мы предлагаем использовать для масштабирования коэффициента абсорбции соотношение кровотока в мышечной ткани кролика и человека, в среднем у кролика кровотоки в 2.4 раза интенсивнее чем у человека.

Как и в случае коэффициента P_f , в доступной литературе не удалось обнаружить способов масштабирования константы абсорбции при подкожном введении низкомолекулярных веществ. Основное внимание исследователей уделено масштабированию абсорбции высокомолекулярных соединений при подкожном введении, например, эритропоэтина [424]. Поэтому нами была проведена оценка зависимости периода возможного обнаружения ксенобиотика в крови, на примере 2-нитропропана, от коэффициента масштабирования константы абсорбции (см. рисунок 41).

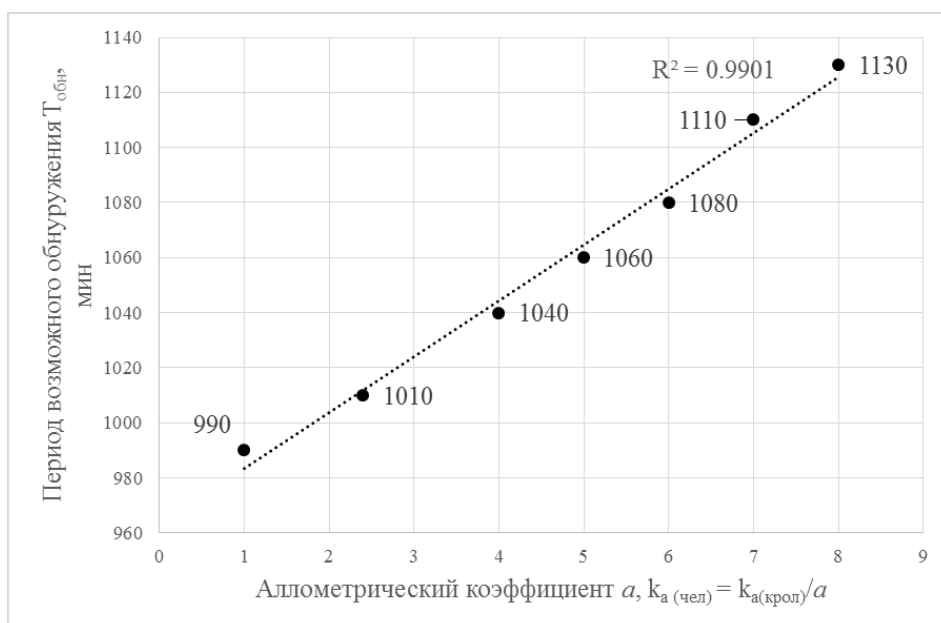


Рисунок 41 — Зависимость периода возможного обнаружения 2-нитропропана в крови человека от аллометрического коэффициента масштабирования константы абсорбции

На рисунке 41 приведена зависимость вычисленного периода возможного обнаружения 2-нитропропана в крови человека при использовании методики с пределом обнаружения 1 нг/мл от константы абсорбции. Аллометрический коэффициент принимает значения от 1 до 8, при этом период возможного обнаружения увеличивается с 16.5 до 18.3 часов. Так как такое изменение можно считать незначительным, в дальнейшем для расчетов мы использовали коэффициент 2.4 при подкожном введении и 1.344 при внутрижелудочном.

Результаты масштабирования токсикокинетических параметров для соединения из групп ФОП и ЛПЗ суммированы в таблице 55. В таблице также приведена оценка периодов возможного обнаружения маркеров токсикантов в крови человека при использовании разработанных методик количественного определения.

Таблица 55 — Масштабированные токсикокинетические параметры соединений из групп ЛПЗ и ФОР, а также вычисленные периоды возможного обнаружения их маркеров в крови человека с использованием разработанных методик

Химическое соединение	logP _{o/w} ¹	Масштабированные токсикокинетические параметры					
		t _{1/2} , ч (α) ²	t _{1/2} , ч (β) ³	C ₀ , нг/мл	K _{абс} , мин ⁻¹	T _{обн} ⁴ (кролик)	T _{обн} ⁴ (человек)
Две фазы элиминации без абсорбции							
E-1,4-Дихлор-2-бутен	2.35 ⁵	1.3	12	303	- ⁸	1 день	12 ч
Диазинон	3.81 [428]	3.4	27.0	204	-	3 дня	9 дней
Дисульфид углерода	1.94 [428]	4.5	14.1	4	-	2 дня	32 ч
Метакрилонитрил	0.68 [425]	2.8	9.3	7	-	1 день	2.2 дня
Метилпаратион	2.86 [428]	7.0	20.8	28	-	2 дня	4.1 день
Пентахлорэтан	3.22 [428]	2.9	18.3	3	-	1 день	9.5 ч
Одна фаза элиминации без абсорбции							
Акрилонитрил	0.25 [428]	0.9	- ⁶	3	-	1 день	1.5 ч
Аллилхлорид	1.93 [426]	5.5	-	3	-	1 день	7 ч
Бутилхлорид	2.39 [427]	16.0	-	2	-	2 дня	19 ч
Диметоат	0.78 [428]	2.6	10.3	1027	-	3 дня	4.3 дня
Хлорацетонитрил	0.95 [428]	0.8	-	4	-	1 день	2 ч
Этилметакрилат	1.94 [428]	6.1	-	<1	-	1 день	- ⁷
Две фазы элиминации с абсорбцией							
Диэтиловый эфир	0.89 [428]	2.3	4.8	37	0.040	5 дней	3.9 дней
Метилакрилат	0.80 [428]	2.1	8.4	102	0.018	2 дня	2.3 дня
Метилметакрилат	1.38 [428]	3.0	8.4	<1	0.028	1 день	-
Нитробензол	1.85 [428]	9.0	16.0	17	0.108	1 день	2.9 дня
Хлорпирифос	4.96 [429]	35.0	45.0	3	0.015	3 дня	4.4 дня
Одна фаза элиминации с абсорбцией							
2-Нитропропан	0.93 [430]	3.4	-	26	0.027	1 день	16 ч
Гексахлорэтан	4.14 [428]	6.0	-	<1	0.063	1 день	-
Фозалон	4.38 [428]	44.0	-	2	0.010	5 дней	18 ч

Примечания: ¹ – логарифм коэффициента распределения в системе октанол/вода; ² – период полувыведения в быстрой фазе; ³ – период полувыведения в медленной фазе; ⁴ – период возможного обнаружения соединения в крови после введения данной дозы с использованием данной методики; ⁵ – Оценка ACD/Labs Percepta Platform - PhysChem Module; ⁶ – медленная фаза выведения отсутствует; ⁷ – невозможно обнаружить факт введения данной дозы с использованием данной методики; ⁸ – вычисление проведено без учета фазы абсорбции.

Предложенный алгоритм масштабирования токсикокинетических параметров возможно применять при условии равенства биодоступности химических соединений для организма животного и человека, а также линейной зависимости площади под токсикокинетической кривой (AUC) при поступлении рассматриваемой дозы.

Масштабированные токсикокинетические параметры позволяют существенно повышать информативность результатов биоаналитического мониторинга, так как наличие информации о зависимости концентрации биомаркера от времени, то есть о его токсикокинетических параметрах, позволяет оценивать внутреннюю дозу веществ и, в результате, позволяет провести корректирование гигиенических нормативов, с учетом соотношения внешней дозы (концентрации в

контактной среде) и внутренней дозы по результатам анализа биологических сред. Полученные результаты являются существенным шагом в разработке методологии обоснования биологических ПДК органических соединений.

3.3.5. Разработка методики определения гидроксилamina в моче и крови

Для последующего обоснования гигиенических нормативов, расследования случаев острого воздействия, мониторинга профессионально обусловленного хронического воздействия ГА на человека, необходимо было разработать чувствительную методику количественного определения ГА в крови и моче [282].

Известные процедуры определения ГА относятся либо к фармацевтическому анализу, либо к контролю объектов окружающей среды. Так, авторы [431] предложили определять ГА в фармацевтической композиции методом ГХ-МС, с предшествующей дериватизацией циклогексаном. Известны примеры определения ГА в фармацевтических средах методом газовой хроматографии путем отбора оксида азота (I) из равновесного пара после окисления ГА непосредственно в газоплотной виае хлоридом железа [432] или гипохлоритом [433]. В работах [434] и [435] рекомендовано использовать ионную хроматографию для определения ГА в полимерах и в отходах фармацевтической промышленности, соответственно. Спектрофотометрический метод определения ГА в фармацевтических препаратах предложен в работе [436]. Вольтамперометрические сенсоры были использованы для определения ГА в сточных водах в работе [437].

Несмотря на обилие известных способов определения ГА в лекарственных препаратах и объектах окружающей среды, работ, описывающих определение ГА в биологических объектах, известно гораздо меньше: в работе [438] предложено использовать реакцию окисления ГА иодатом с последующим детектированием продуктов реакции диазотирования методом спектрофотометрии для определения ГА в воде и моче. Предел обнаружения (1.5 нг/мл) указан только для чистой воды. В работе [440] ГА определяли в микросомах печени с использованием ацетона в качестве дериватирующего агента. Извлечение оксима ацетона из биопробы при этом не проводилось, белковую часть отделяли центрифугированием, и супернатант вводили напрямую в инжектор газового хроматографа. Эта работа основывается на более раннем исследовании [439], в котором дериватизация ГА ацетоном использовалась для его определения методом ГХ-МС или ГХ-ПИД в содержимом кишечника человека. В кишечнике ГА может образовываться при восстановлении нитратов бактериальной флорой. Предел обнаружения ГА в исследуемой биожидкости составил 100 нг/мл. Методик, отвечающих задачам оценки последствий низкоуровневого воздействия ГА на лабораторных животных и человека, до настоящего времени разработано не было.

Гидроксиламин представляет собой высокополярное гидрофильное соединение. Температура кипения 58°C. ГА проявляет основные свойства: $pK_a = 5.95$. Низкая молекулярная масса (33 а.е.м.) препятствует прямому определению ГА методом ВЭЖХ-МС. Для определения методом ГХ-МС необходимо предварительно извлечь ГА из водной среды, что также весьма затруднительно ввиду низкой липофильности ($\log P$ октанол/вода составляет — 0.76). Для извлечения высокополярных соединений из водных сред жидко-жидкостной экстракцией наиболее эффективно высаливание или вымораживание в ацетонитрил. В наших экспериментах установлено, что высаливание ГА в ацетонитрил из водной среды происходит с крайне низкими степенями извлечения $\ll 1\%$. Липофильность ГА может быть повышена путем дериватизации. Описан [440] метод использования ацетона в качестве дериватирующего агента, однако стадия экстракции при этом отсутствовала, а в инжектор хроматографа вводили напрямую аликвоту водной пробы. К анализу мочи и плазмы крови такой подход неприменим.

В ходе разработки методики были опробованы следующие процедуры: одновременное извлечение и дериватизация ГА ацетоном в режиме высаливания, извлечение оксима ацетона методом твердофазной микроэкстракции из паровой фазы, дериватизация бензальдегидом и извлечение в органическую фазу получившегося оксима и, наконец, двойная дериватизация бензальдегидом и *бис*-триметилсилилтрифторацетамидом. Далее более подробно рассмотрены все опробованные способы извлечения и дериватизации ГА для анализа методом ГХ-МС.

В первую очередь было опробовано предположение о возможности одновременной дериватизации и извлечения ГА из водной среды путем обработки ацетоном с последующим отделением органической фазы высаливанием или вымораживанием. Стандарт оксима ацетона готовили внесением ГА в ацетон с последующим инкубированием при 40°C в течение 1 часа.

Для оптимизации хроматографического определения оксима ацетона было проведено сравнение хроматографических колонок. При использовании WCOT-колонки с неподвижной фазой HP-5MS (5% фенильных групп на полидиметилсилоксане) длиной 30 м, ГА элюировался в виде пика неправильной формы с явными признаками сорбционных эффектов и отсутствия инертности газохроматографической системы. Время удерживания составило 2 мин при 40°C.

Высокополярная и длинная (75 м) колонка с неподвижной фазой SP2560 (*бис*-цианопропилсилоксан) позволила повысить время удерживания оксима ацетона до 19 мин в режиме программирования температуры от 40°C (2 мин) до 200°C (5°C/мин). Оптимальной колонкой для определения оксима ацетона оказалась Supelco Nukol (полиэтиленгликоль, модифицированный кислотами). Время удерживания оксима ацетона на ней составляло 6.9 мин.

Экстракционное оксимирование ГА ацетоном проводили следующим образом: в 1 мл воды вносили 25 мкг ГА в виде гидрохлорида, карбонат натрия и пробовали различные объемные соотношения воды и ацетона: 1:4, 1:3, 1:2 и 1:1, то есть, к 1 мл воды прибавляли 4, 3, 2 и 1 мл

ацетона, соответственно. Затем пробу выдерживали в течение 30 минут при 40°C. Увеличение температуры или продолжительности реакции не оказывало влияния на степень извлечения/превращения. Максимальная степень извлечения (60%) достигалась при самом высоком (80%) содержании ацетона в смеси, однако и в этом случае полученный экстракт содержал значительное количество воды, что затрудняло его концентрирование. Использование осушителей, в частности безводного сульфата натрия, значительно снижало степень извлечения оксима ацетона: с 60% до 2-4%.

Упаривание водно-ацетоновой смеси пробовали заменить концентрированием оксима ацетона из паровой фазы на микроволокне. Оптимальным условиям для твердофазной экстракции оксима ацетона из равновесного пара отвечали микроволокно типа Carboxene/PDMS и температура 40°C, однако, и в этих условиях степени извлечения были недостаточными для целей количественного анализа.

Таким образом, несмотря на то, что оксимирование ГА ацетоном легко осуществляется в водной среде, полученное производное не удается эффективно из нее извлечь.

Следующим шагом было получение менее гидрофильного, по сравнению с оксимом ацетона, производного ГА с целью использования менее полярного экстрагента. Известно [441] применение бензальдегида для получения гидразонов при дериватизации несимметричного диметилгидразина для его определения в почве и воде.

При использовании бензальдегида в качестве дериватирующего агента выход образующегося оксима достаточно высок (~90%), но его пик не удается отделить от пика бензойной кислоты, что препятствует определению низких концентраций ГА: пределы его обнаружения методом ГХ-МС в моче и плазме достаточно высоки и составляют порядка 300 нг/мл. На рисунке 42 приведена масс-хроматограмма экстракта из мочи с внесением 1 мкг/мл ГА. Пик с временем удерживания 8.178 — оксим бензальдегида, значительно уширенный пик — бензойная кислота.

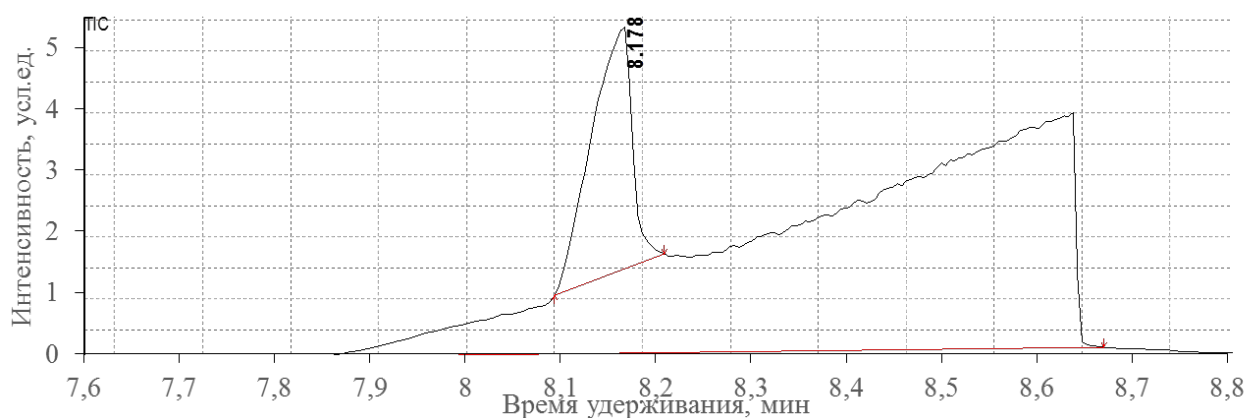


Рисунок 42 — Фрагмент масс-хроматограммы экстракта из мочи с внесением 1 мкг/мл ГА и бензальдегида

В целях оптимизации ГХ-МС анализа было принято решение о введении второй стадии дериватизации — силилирования. В качестве силилирующих агентов были опробованы БСТФА (см. рисунок 43) и МТБСТФА.

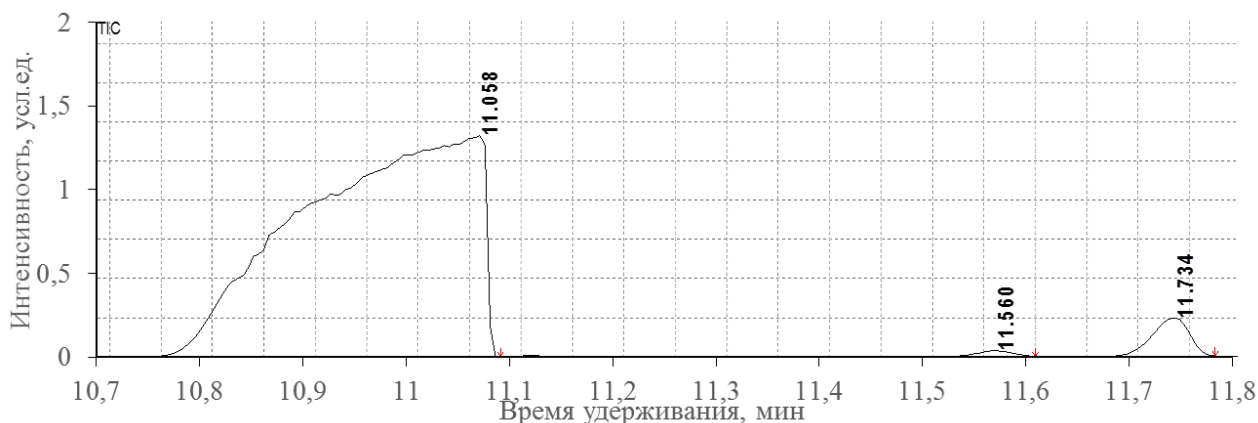


Рисунок 43 — Фрагмент масс-хроматограммы экстракта из мочи, обработанного БСТФА, с внесением 1 мкг/мл ГА и бензальдегида

Схемы образования различных производных ГА приведены на рисунке 44. Время удерживания *Z*-изомера, силилированного оксима бензальдегида, относительно бензойной кислоты, составило 1.045, замена триметилсилильной группы на третбутилдиметилсилильную не изменила относительное время удерживания, которое составило в этом случае 1.041.

Таким образом, ТМС производные предпочтительнее за счет меньшего времени удерживания. Стоит отметить, что силильные производные оксима бензальдегида разделяются в данных условиях на *E*- и *Z*-изомеры. Тем не менее, проигрыш в чувствительности компенсируется тем, что проведение дериватизации повышает молекулярную массу аналита почти в 6 раз.

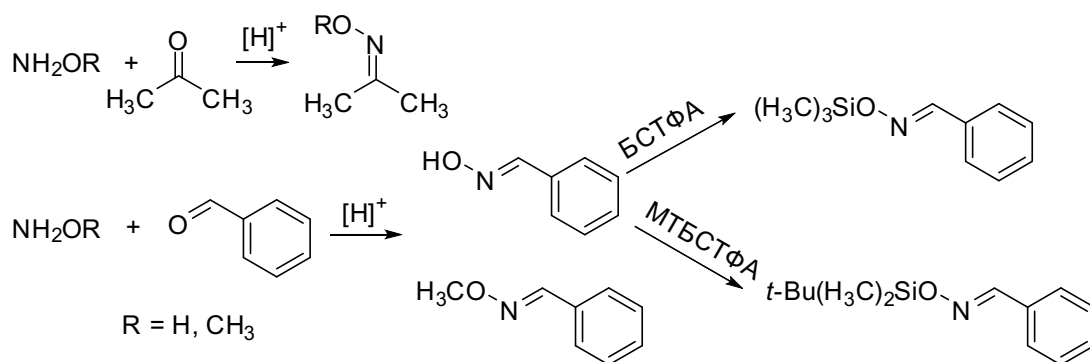


Рисунок 44 — Схема образования различных производных ГА и метоксиамина: с ацетоном, бензальдегидом, а также при силилировании

Предел обнаружения при использовании метода ГХ-МС составил 30 нг/мл плазмы крови или мочи. Для повышения чувствительности было опробовано использование тандемного масс-селективного детектирования. Были выбраны два МРМ-перехода: 193=>89 для количественного анализа и 178=>75 в качестве подтверждающего. Напряжение в ячейке соударений для двух пе-

реходов составило 10 В. Внутренний стандарт детектировали по переходу 135=>77 (20 В). Оптимальное напряжение в ячейке соударений было определено на диапазоне 1-30 В с шагом в 5 В. Использование метода ГХ-МС/МС позволило снизить предел обнаружения до 0.1 нг/мл.

Апробация методики определения ГА на экспериментальных животных была проведена с целью выявления возможностей методики для установления причин отравлений и мониторинга хронического воздействия ГА, а также установления зависимости между полученными дозами токсиканта и его концентрациями в биологических образцах. Масс-хроматограмма экстракта из мочи крыс 1 группы, получавшей 565 мкг/кг ГА в питьевой воде, приведена на рисунке 45. Результаты количественного определения ГА в плазме крови и моче крыс при моделировании различных отравлений ГА приведено в таблице 56.

Таблица 56 — Результаты определения ГА в плазме крови и моче крыс в ходе интоксикации ГА

Серия	Проба (время отбора проб)	Доза ГА	Результат определения ГА, нг/мл
Однократное введение	Плазма (2 ч)	101.6 мг/кг, $\frac{1}{2}DL_{50}$ в/жс	4321 ± 1080
	Плазма (24 ч)		421 ± 131
	Моча (24 ч)		29400 ± 7056
Многократное введение	Плазма 1 группа	565 мкг/кг	304 ± 155
	Моча 1 группа	113.1 мкг/кг	3555 ± 640
	Плазма 2 группа		12 ± 8
	Моча 2 группа	106 ± 30	
	Плазма 3 группа	22.6 мкг/кг	8 ± 4
	Моча 3 группа		34 ± 18

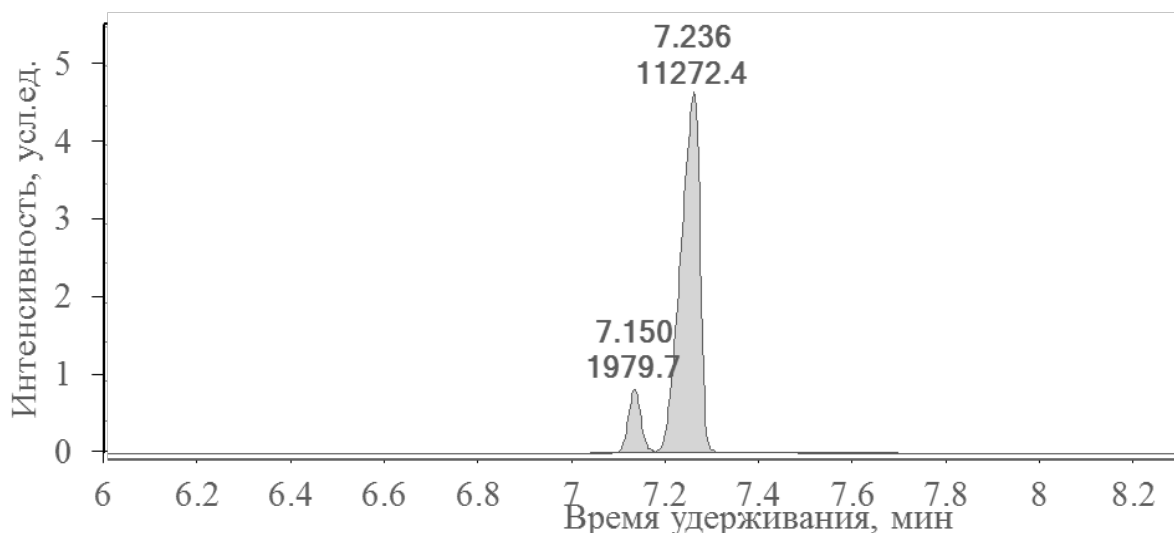


Рисунок 45 — Фрагмент масс-хроматограммы экстракта из мочи крыс, получавших 565 мкг/кг ГА с питьевой водой. Масс-хроматограмма зарегистрирована по ММР-переходу 193→89

В результате, показано, что концентрации ГА в крови и моче зависят от дозы токсиканта и коррелируют между собой. За 24 часа из крови экскреция ГА происходит на 90 %.

Количественное определение гидроксилamina в плазме крови и мочи с использованием впервые предложенной методики возможно на уровне 30 нг/мл, при использовании ГХ-МС с одним квадруполом в режиме мониторинга избранных ионов, и на уровне 0.1 нг/мл, при использовании ГХ-МС с системой трех квадруполов в режиме мониторинга множественных реакций.

Показано, что при использовании ГХ-МС возможно проводить диагностику острых отравлений гидроксилaminом ($1/2DL_{50}$), но для диагностики хронического воздействия ГА на организм (до 22.6 мкг/кг) необходимо использовать более чувствительное тандемное масс-селективное детектирование.

3.3.6. Разработка методики определения ДХГФ в моче и крови

Учитывая высокую летучесть и низкую температуру кипения (62 °С), наиболее очевидным способом подготовки проб для определения ДХГФ методом ГХ-МС, является твердофазная микроэкстракция из паровой фазы. В ходе разработки методики нами были установлены оптимальные условия экстракции и хроматографического анализа.

Твердофазная микроэкстракция из паровой фазы для извлечения ДХГФ позволяет использовать в качестве образцов кровь различного качества: цельную, плазму крови, сыворотку, размороженную и гемолизованную, что особенно актуально при определении причин отравления *postmortem*. Методика количественного анализа разработана при использовании плазмы крови и мочи в качестве матрицы.

Определение наилучшего типа микроволоконна производили с использованием раствора ДХГФ и 2-хлорпропана в качестве внутреннего стандарта, в концентрации 30 нг/мл каждый. В вials для парового анализа вносили по 3 мл дистиллированной воды и обеспечивали постоянное перемешивание и нагрев на магнитной мешалке до 35°С. Каждая серия измерений включала 3 образца. Продолжительность предварительной инкубации и экстракции составила 10 мин. В таблице 57 приведены результаты извлечения ДХГФ микроволоконнами с различными типами покрытий в виде абсолютных значений площадей хроматографических пиков, так как степень извлечения ДХГФ с использованием микроволоконна определить затруднительно.

Таблица 57 — Результаты извлечения ДХГФ микроволоконнами с различными типами покрытий из паровой фазы.

Тип микроволоконна	ДХГФ	2-хлорпропан
85 мкм полиакрилат ("белое")	Не обнаружен	Не обнаружен
60 мкм полиэтиленгликоль ("фиолетовое")	Не обнаружен	Не обнаружен
50/30 мкм дивинилбензол, карбоксен, полидиметилсилоксан ("серое")	3048 ± 610	1488 ± 179
85 мкм карбоксен, полидиметилсилоксан StableFlex ("голубое")	1893 ± 284	1530 ± 260

Таким образом, установлено, что наилучшее извлечение ДХГФ из паровой фазы

достигается при использовании волокна с тройным покрытием из дивинилбензола, карбоксена и полидиметилсилоксана. Наибольшая степень извлечения достигается при температуре экстракции 35 °С и продолжительности экстракции 5 минут (см. таблицы 58-59). Стоит отметить, что извлечение внутреннего стандарта всегда строго коррелирует с извлечением ДХГФ.

Таблица 58 — Результаты определения степеней извлечения ДХГФ при различных температурах

Температура, °С	ДХГФ	2-хлорпропан
25	2032 ± 366	2372 ± 285
35	3048 ± 610	2420 ± 411
45	1693 ± 373	1684 ± 253
55	813 ± 344	1638 ± 295

Таблица 59 — Результаты, полученные при различной продолжительности извлечения ДХГФ

Время экстракции, мин	ДХГФ	2-хлорпропан
5	4589 ± 964	2372 ± 498
10	3438 ± 584	2420 ± 411
20	2650 ± 636	1684 ± 404
30	1951 ± 273	1638 ± 229

В качестве внутреннего стандарта нами был использован 2-хлорпропан. Выбор в его пользу обусловлен его высокой летучестью и близкими параметрами хроматографического удерживания (см. рисунок 46). Температура кипения составляет 35.74 °С.

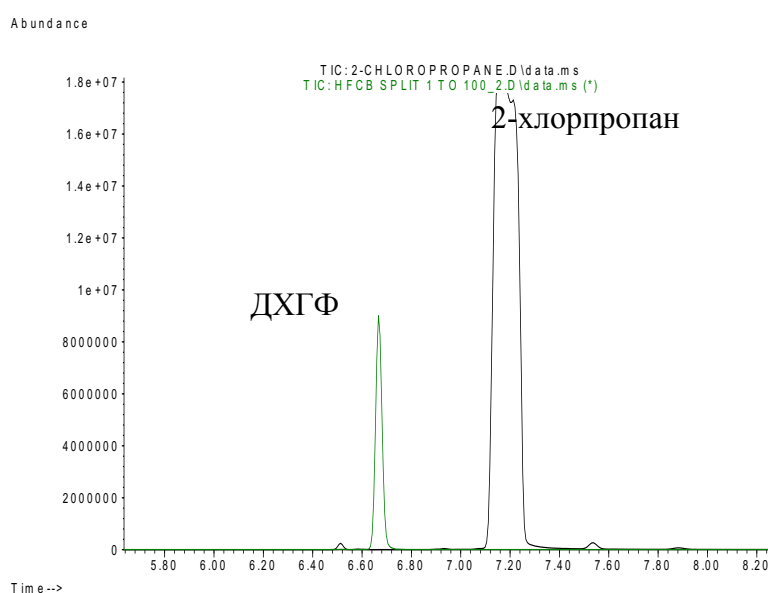


Рисунок 46 — Масс-хроматограммы образца ДХГФ и внутреннего стандарта — 2-хлорпропана

При оптимизации процесса хроматографического разделения компонентов паровой фазы было проведено сравнение трех капиллярных хроматографических колонок: высокополярных SP2560 и Nukol, и газодсорбционной CarboPlot. Показано, что ДХГФ значительно лучше удерживается на SP2560 и CarboPlot чем на Nukol (RT при 40 составляет 6.666, 9.521 и 1.653, соответственно). Выбор был, тем не менее, сделан в пользу SP2560, так как было показано, что с ее помощью можно определять летучие метаболиты ДХГФ.

В результате, для химико-аналитического исследования образцов крови и мочи крыс, подвергавшихся острому ингаляционному воздействию ДХГФ, была разработана методика определения целевого соединения методом газовой хроматомасс-спектрометрии с твердофазной микроэкстракцией из паровой фазы. Достигнутые пределы обнаружения составили 5 нг/мл в крови и моче. Такой предел обнаружения позволяет проводить мониторинг ингаляционного воздействия ДХГФ на уровне 18.8 мг/м^3 . Стоит отметить, что с использованием тандемного масс-селективного детектирования удастся значительно повысить чувствительность метода.

3.4. Разработка метода установления структур позиционных изомеров алкилфенолов

Неионогенные поверхностно-активные вещества класса алкилфенолов широко применяются в промышленности, но обладают свойствами экотоксикантов. Одной из причин интенсивного изучения этих соединений является их токсическое воздействие на эндокринные системы человека и животных [442]. Действие алкилфенолов аналогично действию 17β -эстрадиола, но выражено в меньшей степени [443,444,445,446], причем аффинность к эстрогенным рецепторам зависит от структуры и положения алкильных заместителей в молекуле [447]. Так, алкилфенолы с третичной алкильной группой, как правило, более токсичны по сравнению с вторичными и первичными [448].

В работе [449] показано, что аффинность алкилфенолов к рецепторам сильно зависит от положения заместителей в кольце. В экспериментах с изомерными *трет*-бутилфенолами, наивысшее сродство было выявлено для *n*-замещенных изомеров, тогда как для *o*- и *m*-замещенных бутилфенолов оно в 5 и 7 раз меньше. Большие различия были выявлены между монобутилфенолами, 2,4-ди-*трет*- и 2,4,6-три-*трет*-бутилфенолами. Так, 4-*трет*-бутилфенол показал в 2,5 раза большую активность, чем 2,4-ди-*трет*-бутилфенол, а 2,4,6-три-*трет*-бутилфенол в 26 раз меньшую.

Активность наиболее токсичных C_6 - C_8 *пара*-замещенных *трет*-алкилфенолов примерно в $(1-6) \times 10^3$ раз меньше, чем у эстрадиола, тогда как у более легких C_3 - C_5 замещенных алкилфенолов — уже примерно в 10^5 - 10^7 раз меньше [449].

Примером вариаций токсических свойств структурно-родственных соединений, в зависимости от положения заместителей, может также служить тот факт, что токсичность добавок к авиационному топливу (трикрезилфосфаты) во многом обусловлена наличием именно три-*орто*-крезилфосфата [450]. Степень *орто*-замещения заметно сказывается на персистентности отдельных изомеров гексахлорбифенилов (PCB) [451,452,453]. В частности, количество атомов хлора в *o*-положениях определяет хроническую токсичность PCB для подопытных животных.

Все восемь возможных изомерных бутилфенолов в разных соотношениях присутствуют в реакционных смесях алкилирования фенола различными алифатическими спиртами (см. раздел 2.8) и охарактеризованы масс-спектрами ИЭ. Значения их ИУ известны, что позволяет надежно идентифицировать каждый из изомеров. Следует отметить, что *m*- и *n*-изомеры моноалкилфенолов характеризуются незначительными различиями индексов удерживания, которые, тем не менее, позволяют достаточно надежно выявить присутствие *m*-изомеров в реакционных смесях. Кроме того, как отмечено выше, стандартные масс-спектры ИЭ *m*-алкилфенолов отличаются от спектров *o*- и *n*-изомеров. Сочетание указанных признаков позволяет заключить, что в рассматриваемом нами варианте алкилирования фенола алифатическими спиртами в присутствии $AlCl_3$ *m*-изомеры в сопоставимых с другими изомерами количествах не образуются.

Масс-спектры ИЭ *o*- и *n*-*трет*-бутилфенолов характеризуются присутствием сигналов ионов $[M-CH_3]^+$ с $(m/z)^{100}$ 135, в масс-спектрах *втор*-бутилфенолов сигналы с $(m/z)^{100}$ 121 обусловлены ионами $[M-C_2H_5]^+$. Масс-спектры изобутил и *n*-бутилфенолов содержат одинаковые сигналы с $(m/z)^{100}$ 107 $[M-C_3H_7]^+$, но отличаются соотношениями интенсивностей минорных сигналов, что при отсутствии существенных искажений спектров позволяет различать эти компоненты. Однако отнесение алкилфенолов к *o*- или *n*-изомерам остается проблемой, так как различий в их масс-спектрах обычно выявить не удастся. Авторы [454] указывают на наличие *орто*-эффекта, проявляющегося в появлении минорного сигнала $[M-H_2O]^+$ в масс-спектрах ИЭ *o*-алкилфенолов, который отсутствует в масс-спектрах *n*-изомеров.

Прежде всего, нами были оценены относительные интенсивности сигналов с m/z 133 [M-17] в масс-спектрах ИЭ монобутилфенолов для проверки указанного орто-эффекта (таблица 60). Таким образом, относительные интенсивности слабых сигналов [M-17] иллюстрируют отсутствие какой-либо их зависимости от положения заместителей.

Таблица 60 — Относительные интенсивности сигналов пиков с m/z 133 в масс-спектрах ИЭ изомерных бутилфенолов

Изомерный бутилфенол	m/z 133 [M-17], $I_{отн}$, %
2-(1,1-Диметилэтил)-	1.2
4-(1,1-Диметилэтил)-	1.1
2-(1-Метилпропил)-	0.6
4-(1-Метилпропил)-	0.8
2- <i>n</i> -Бутил-	0.4
4- <i>n</i> -Бутил-	0.3

Рассмотрим возможные отличия масс-спектров ИЭ алкилфенолов от спектров ДИС молекулярных ионов алкилфенолов, образующихся в условиях ИЭ. Основные пути фрагментации при этом сохраняются (таблица 61).

Таблица 61 — Сравнение масс-спектров ИЭ изомерных (1-метилпропил)фенолов со спектрами ДИС их молекулярных ионов в условиях ИЭ

Изомер	Масс-спектр ИЭ [70 эВ, $m/z \geq 40$, $I_{\text{отн}} \geq 2\%$]	Масс-спектр ДИС [5 В, $m/z \geq 40$, $I_{\text{отн}} \geq 1\%$], ион-прекурсор m/z 150
2-(1-Метилпропил)-фенол	151(6) 150(29)M , 135(2), 122(9), 121(100), 115(2), 107(10), 103(13), 93(4), 91(9), 77(11), 65(2)	150(19)M 135(1), 122(1), 121(100), 108(18), 107(9), 103(1), 95(1), 93(1), 91(1), 77(1)
4-(1-Метилпропил)-фенол	151(3) 150(24)M , 135(3), 122(9), 121(100), 120(2), 107(10), 103(8), 93(4), 92(1), 91(9), 77(10), 65(3)	150(25)M 135(1), 133(3), 122(2), 121(100), 108(6), 107(3), 95(1), 93(1), 91(1), 77(1)

За исключением слабого сигнала с m/z 133 [M-17], существенных отличий в масс-спектрах ДИС (ИЭ) изомеров также не наблюдается. Следовательно, необходим поиск таких условий регистрации масс-спектров, при которых изомерные *o*- и *n*-алкилфенолы проявляли бы устойчивые различия в характере фрагментации. Последующая фрагментация ионов [M-1] (m/z 149 для бутилфенолов) также не позволяет надежно отличить региоизомеры алкилфенолов друг от друга. Интересным моментом является характерная фрагментация иона с m/z 149 в спектре 2-(1-метилпропил)фенола, а именно переход $149 \Rightarrow 133$ (энергия соударений 10 В, ион-прекурсор m/z 149, в ячейке соударений гелий и азот). У остальных изомерных бутилфенолов такого процесса не наблюдается. ДИС ионов с m/z 107 (бензильный распад) приводит к абсолютно идентичным результатам у всех изомерных бутилфенолов.

Фрагментация протонированных молекулярных ионов алкилфенолов в ячейке соударений приводит к наиболее значимым результатам. В таблице 62 представлены масс-спектры соударений иона-прекурсора с m/z 151 (энергия соударений 5 В). Отметим, что сигналы ионов-прекурсоров даже при такой небольшой энергии соударений в спектрах отсутствуют, но обнаруживаются сигналы ионов $[M + H - H_2]^+$ с m/z 149. В таблице 62 представлены основные сигналы в масс-спектрах шести из восьми изомерных *o*- и *n*-бутилфенолов (изобутилфенолы в данной реакционной смеси отсутствуют).

Таблица 62 — Масс-спектры ДИС протонированных изомерных бутилфенолов с m/z 151. Энергия соударений 5 В

Изомер	Масс-спектр ДИС [5 В, $m/z \geq 40$, $I_{\text{отн}} \geq 2\%$], ион-прекурсор $[M + H]^+$ с m/z 151
2-(1-Метилпропил)фенол	149(41), 135(10), 122(8), 121(61), 107(52), 105(1), 95(100) , 91(59), 57(36), 41(2)
4-(1-Метилпропил)фенол	133(100) , 131(1), 122(2), 121(1), 105(11), 95(41), 93(1), 91(17), 57(16), 55(1), 41(2)
2-Бутилфенол	149(1), 133(5), 121(32), 108(3), 107(50), 95(100), 91(40), 77(2), 57(88), 41(7)
4-Бутилфенол	133(100) , 108(3), 105(3), 95(67), 91(36), 57(61), 41(6)
2-(1,1-Диметилэтил)фенол	136(5), 135(80), 107(10), 95(16), 91(100) , 81(2), 57(14)
4-(1,1-Диметилэтил)фенол	136(3), 133(100) , 131(1), 105(9), 91(10), 57(8)

ДИС ионов $[M+H]^+$ бутилфенолов приводит как к одинаковым (в том числе $[M + H - C_nH_{2n}]^+ \equiv [PhOH_2]^+ cm/z 95$), так и к разным фрагментным ионам, в зависимости от положения алкильных заместителей. Для ДИС-спектров *o*-изомеров характерны сигналы, аналогичные сигналам фрагментов ионов M^+ (ИЭ), но в ДИС-спектрах 4-бутилфенолов в этих же условиях присутствуют интенсивные сигналы ионов $[M+H-H_2O]^+$. Таким образом, масс-спектры ДИС ионов $[M+H]^+$ изомерных бутилфенолов принципиально отличаются в зависимости от положения заместителей относительно гидроксильной группы. Среди 2-бутилфенолов слабый сигнал с m/z 133 ($I_{отн}$ 5 %) присутствует только в ДИС-спектре *n*-бутилфенола. У остальных изомеров он отсутствует.

Так как причиной вторичной фрагментации ионов в условиях ДИС являются именно их соударения с атомами или молекулами газа, то объяснением наблюдаемых различий в масс-спектрах ДИС ионов $[M+H]^+$ алкилфенолов можно считать различную стерическую доступность фрагмента $[Ar]-OH_2^+$ у разных изомеров. Процесс фрагментации $[M + H]^+ \rightarrow [M + H - H_2O]^+$ отчетливо выражен только при отсутствии заместителей в *o*-положениях к фрагменту $[Ar]-OH_2^+$.

Выявленные эффекты можно объяснить следующим образом: предпочтительным направлением фрагментации ионов $[M+H]^+$ алкилфенолов является элиминирование нейтральной молекулы воды. Однако возможности реализации этого процесса лимитированы стерическими препятствиями подходу молекулы азота. ДИС фрагментация в этом случае происходит аналогично фрагментации непротонированных молекулярных ионов. При увеличении энергии соударений наблюдается снижение их селективности, что приводит к нивелированию различий двух путей фрагментации.

Регистрация ДИС-спектров других алкилфенолов в аналогичных условиях иллюстрирует закономерности фрагментации, аналогичные выявленным для бутилфенолов. Масс-спектры некоторых из них приведены в таблице 63.

Таблица 63 — Масс-спектры ДИС протонированных молекул некоторых изомерных *o*- и *n*-алкилфенолов. Энергия соударений 5 В

Изомер	Масс-спектр ДИС [5 В, $m/z \geq 40$, $I_{отн} \geq 1\%$], N_2+He
ион-прекурсор m/z 165	
2-Пентилфенол	165 (61) $[M+H]$, 147 (4), 135 (1), 123 (3), 121 (22), 109 (1), 108 (5), 107 (39), 95 (53), 91 (13), 71 (100)
4-Пентилфенол	165 (100) $[M+H]$, 147 (85) $[M+H-H_2O]$, 108 (3), 107 (2), 105 (3), 95 (34), 91 (52), 71 (63), 69 (1)
ион-прекурсор m/z 179	
2-Гексилфенол	179 (100) $[M+H]$, 177 (1), 161 (4), 137 (2), 135 (2), 123 (4), 121 (20), 108 (2), 107 (35), 95 (36), 91 (7), 85 (89), 57 (17), 43 (50), 41 (1)
4-Гексилфенол	179 (100) $[M+H]$, 161 (51) $[M+H-H_2O]$, 108 (1), 107 (1), 105 (2), 95 (13), 91 (39), 85 (38), 57 (8), 55 (1), 43 (23)
ион-прекурсор m/z 193	

Изомер	Масс-спектр ДИС [5 В, $m/z \geq 40$, $I_{\text{омн}} \geq 1\%$], N_2+He
2-Гептилфенол	193 (9) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 191 (8), 177 (2), 151 (1), 149 (2), 137 (3), 135 (25), 122 (11), 121 (100) , 109 (1), 108 (1), 107 (66), 105 (4), 99 (8), 95 (61), 93 (1), 91 (5), 77 (1), 57 (85), 43 (1), 41 (1)
4-Гептилфенол	193 (97) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 175 (100) $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]$, 122 (3), 121 (2), 119 (1), 105 (22), 99 (2), 97 (0), 95 (14), 91 (61), 79 (0), 71 (1), 57 (21), 55 (4), 43 (1)
ион-прекурсор m/z 207	
2-Октилфенол	207 (17) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 207 (9), 205 (6), 178 (3), 177 (4), 177 (7), 151 (1), 149 (4), 136 (2), 135 (39), 121 (3), 113 (2), 108 (3), 107 (100) , 105 (2), 95 (27), 91 (7), 77 (1), 71 (34), 57 (22), 43 (2)
4-Октилфенол	207 (95) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 189 (100) $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]$, 178 (1), 160 (2), 151 (1), 123 (1), 119 (3), 113 (3), 109 (1), 105 (11), 95 (5), 91 (71), 85 (1), 71 (8), 69 (5), 57 (5), 43 (4), 42 (2)
ион-прекурсор m/z 221	
Изомер нонилфенола 1*	192 (1), 191 (1), 135 (53), 122 (3), 121 (4), 107 (100) , 106 (1), 91 (13), 85 (3), 71 (18), 57 (11), 43 (3)
Изомер нонилфенола 2	221 (33) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 203 (100) $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]$, 147 (1), 136 (2), 133 (3), 119 (11), 118 (7), 117 (1), 107 (2), 105 (13), 91 (27), 85 (3), 83 (1), 71 (4), 57 (7), 55 (1), 43 (3)

* см. комментарии в тексте

Для сравнения масс-спектров нонилфенолов (образец Sigma) были выбраны два изомера, имеющих одинаковые масс-спектры (установить структуры алкильных заместителей не удалось). В ДИС-спектре минорного изомера № 1 не зарегистрирован сигнал $[\text{M}+\text{H}]^+$ (содержание данного компонента незначительно), но, главное — нет и сигнала ионов $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]$ с m/z 203, который максимален в спектре изомера № 2. Подобный критерий позволяет установить, что содержание 2-нонилфенолов в используемом образце не превышает 0.5 %.

В результате показано, что установление структур позиционных изомеров алкилфенолов возможно с использованием масс-спектров ДИС/ХИ. Выявлено, что, в отличие от масс-спектров ионизации электронами, в масс-спектрах диссоциативной ионизации соударениями протонированных молекулярных ионов *para*-замещенных алкилфенолов $\text{C}_4\text{-C}_9$ присутствуют сигналы характеристических ионов $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, не характерные для масс-спектров ДИС других изомеров [455].

3.5. Совершенствование методики нецелевого метаболического профилирования биологических образцов с использованием газовой хроматомасс-спектрометрии низкого разрешения

Как показано в разделе 1.3, современные методы метаболического профилирования можно принципиально разделить на две группы: целевые и нецелевые. Первые предполагают количественный анализ ограниченного перечня заведомо известных соединений; в этом смысле они соответствуют принципам лабораторно-клинического химического или биохимического анализа.

Вторые предполагают исчерпывающий анализ всех измеряемых метаболитов, в том числе неизвестных, а потому такой анализ по определению не может быть количественным в отношении всех метаболитов.

Основными инструментальными методами метаболического профилирования в настоящее время являются ЯМР, ВЭЖХ-МС и ГХ-МС. Несмотря на то, что ГХ-МС низкого разрешения является общепризнанным золотым стандартом токсиколого-аналитического скрининга, он имеет ряд существенных недостатков для нецелевого метаболического профилирования.

Метод ГХ-МС, по сравнению с прочими, обладает высокой чувствительностью и воспроизводимостью и незаменим при определении слабополярных метаболитов, несмотря на то, что требует проведения дериватизации образцов перед анализом, что значительно снижает пропускную способность. Тем не менее, возможности идентификации метаболитов методом ГХ-МС значительно превосходят любые другие методы, благодаря возможности получения воспроизводимых масс-спектров электронного удара, создания баз данных масс-спектров и хроматографических параметров удерживания. Наиболее упоминаемым в литературе видом ГХ-МС в метаболомике является ГХ-МС с масс-селективным детектированием высокого разрешения (см. раздел 1.3), преимущественно TOF или Q-TOF, для которых разработаны специальные виды программного обеспечения (например, XCMS). Ориентация такого ПО на обработку масс-хроматограмм высокого разрешения затрудняет их использование для обработки масс-хроматограмм низкого разрешения.

Данный раздел посвящен расширению аналитических возможностей метода ГХ-МС низкого разрешения при нецелевом метаболическом профилировании биологических образцов. Для эффективного использования результатов, полученных с использованием рутинного метода квадрупольной ГХ-МС, мы разработали новый подход, заключающийся в использовании оптимизированных баз хроматомасс-спектрометрических характеристик эндогенных соединений и свободно распространяемой системы автоматической идентификации и деконволюции AMDIS (NIST).

При расширенном токсиколого-аналитическом скрининге и при нецелевом метаболическом профилировании возникает одна и та же проблема большого количества определяемых соединений и, соответственно, количества сигналов на масс-хроматограммах, которые могут полностью или частично перекрываться. Такая ситуация приводит к необходимости использования систем автоматической идентификации, которые могли бы выделять из масс-хроматограммы индивидуальные масс-спектры, "очищать" их от фонового шума или, при необходимости, "разделять" спектры перекрывающихся компонентов, а затем проводить сравнение с библиотечными данными. Выделение индивидуальных масс-спектров компонентов, элюирующихся в виде не

полностью разделенных хроматографических пиков, можно выполнить с помощью математической процедуры деконволюции [456].

Системы для автоматизированной обработки хроматомасс-спектрометрических данных предлагает ряд производителей хроматомасс-спектрометрического оборудования:

- GCMSSolution (Shimadzu) позволяет проводить автоматическую идентификацию, но не предусматривает возможность деконволюции; допускается возможность использования индексов удерживания;

- Identification and Deconvolution System (Shimadzu) позволяет проводить деконволюцию масс-хроматограмм;

- MSD ChemStation, Deconvolution and Report System (Agilent) позволяет проводить автоматическую идентификацию и деконволюцию масс-хроматограммы, использует только времена удерживания, но с возможностью подключения функции RTL (Retention Time Locking) для идентификации по абсолютным временам удерживания;

- MassHunter (Agilent) используется только на приборах с тандемным масс-детектором или МС высокого разрешения, использует только времена удерживания.

Из программных продуктов, созданных не производителями приборов, стоит отметить:

- Automated MassSpectral Deconvolution and Identification System (NIST, США) позволяет использовать при идентификации индексы удерживания или времена удерживания;

- ACDLabs (версия 10.0 и выше) позволяет проводить автоматическую идентификацию и деконволюцию масс-хроматограммы, использует только времена удерживания в собственной базе данных.

Одним из основных условий эффективного использования систем автоматической идентификации является наличие обширных баз масс-спектров и/или параметров удерживания.

Большинство авторов современных работ по токсикологическому скринингу приводят в качестве параметров удерживания аналитов их времена удерживания или, в крайнем случае, относительные времена удерживания [457,458]. Такая ситуация во многом объясняется тем, что с унификацией используемых газохроматографических колонок и, соответственно, неподвижных фаз, становится возможным точно воспроизвести условия, приведенные в оригинальных работах. Использование подобного подхода при нецелевом скрининге, в котором определяются тысячи соединений, обречено на преимущественное использование масс-спектрометрической информации и пренебрежение к газохроматографической. Между тем, нередко возникают ситуации, когда при отсутствии стандартов целевых веществ, единственным методом идентификации является интерпретация именно параметров удерживания. К таким ситуациям относятся: использование масс-спектрометра в режиме химической ионизации, где единственным аналитическим параметром

является молекулярная масса, и использование тандемной масс-спектрометрии, для которой библиотеки спектров активации соударением в настоящее время весьма ограничены, и зачастую получены для нелетучих веществ с использованием жидкостных ВЭЖХ-МС/МС приборов (например, LC-IT/TOF) [456].

В отличие от абсолютных характеристик удерживания, значения ИУ не зависят от геометрических параметров хроматографических колонок, природы и скорости газа-носителя, содержания неподвижной фазы на носителе (насадочные колонки) или толщины ее пленки (капиллярные колонки). Влияние химической природы неподвижной фазы на ИУ, естественно, сохраняется, так что без ее указания такие инварианты использовать нельзя. Однако если сопоставить между собой значения ИУ, определенные с соблюдением всех перечисленных выше условий (оценка межлабораторной воспроизводимости), то легко выявить, что они достаточно близки, но не идентичны друг другу.

Для обеспечения единства выполнения различных процедур поиска биомаркеров экспозиции и эффекта нами было принято решение использовать ПО АМДИС и для обработки результатов метаболического профилирования. АМДИС позволяет обрабатывать файлы, полученные на приборах разных производителей.

Стоит отметить, что "деконволюция" это не выделение чистого масс-спектра путем вычитания фонового спектра из спектра в максимуме пика, а комплексная процедура. В качестве основы для алгоритма деконволюции, авторами [264] был выбран метод модельного пика [459,460]. В первоначальном варианте метод плохо подходил для "выделения" спектров слабых сигналов, что очень важно для анализа следовых количеств веществ. Общий анализ данных включает четыре последовательных стадии:

- анализ шума;
- выделение пиков компонентов;
- деконволюция спектров;
- идентификация компонента.

На первой стадии выделяют фоновый сигнал для дальнейшего использования в анализе шумов и установлении предела чувствительности. На второй устанавливают, какие именно пики относятся к реальным компонентам. На третьей стадии выделяют "очищенные" масс-спектры из индивидуальных ионных хроматограмм с вычитанием спектров близких компонентов, если это требуется. На последней стадии вычисляют фактор совпадения (match factor) для выделенного и библиотечного спектров. Далее факторы совпадения используют для составления так называемого "хит-листа".

При выдаче ответа по результатам идентификации аналита программное обеспечение способно, если требуется, вычислять и использовать линейные индексы удерживания. Подобное дополнительное сравнение приводит, как отмечено в [461], к уменьшению числа ложноположительных ответов.

В работе использовали газовые хроматомасс-спектрометры с одним квадрупольным масс-анализатором: Shimadzu QP2010plus или Agilent 5975 (см. эксп. часть), и общепринятую процедуру подготовки проб с последовательным метоксимированием и силилированием. В качестве внутреннего стандарта использовали смесь 3-фторбензойной, 4-диметиламиномасляной и пальмитиновой- d_{31} кислот. Для вычисления газохроматографических индексов удерживания была использована стандартная смесь *n*-алканов (Supelco C₆-C₄₄).

Известны примеры использования ПО АМДИС при подготовке данных для метаболического профилирования [242]. Однако такой подход к предварительной обработке данных, заключающийся в детектировании пиков на каждой масс-хроматограмме с последующим соотношением пиков между масс-хроматограммами встречает некоторые трудности, описанные в разделе 1.3.1. Надежное детектирование пиков и их сравнение между хроматограммами имеет решающее значение для выявления изменений концентраций метаболитов между различными образцами, а также для точного количественного определения метаболитов при необходимости. Соотнесение пиков на различных хроматограммах между собой в первую очередь затруднено из-за дрейфа времен удерживания, который может возникать из-за изменений температуры, давления и подвижной фазы (состава и скоростей потока), изменения в стационарной фазе на колонке (насыщение/деградация), или изменения матричного эффекта образца (из-за изменений в составе образца, например, растворителя и соли) [251].

Источники погрешности при определении времен удерживания при использовании ГХ-МС включают: старение колонки, изменения температуры и изменения в стационарной фазе. Дрейф времен удерживания может быть устранен с помощью хроматографического выравнивания профиля до пика обнаружения (профиль или выравнивание хроматограммы) и сравнения результатов детектирования пиков после обнаружения. Автоматическая коррекция времени удерживания особенно важна при нецелевом метаболическом профилировании из-за большого количества и сложности данных.

Многие исследователи (см., например, [151]) предлагают проводить предварительную "фильтрацию" хроматографических пиков по следующим критериям: а) СКО площади пика должно быть меньше 30% в пулированных образцах QC; б) хроматографические пики должны присутствовать в $\geq 70\%$ образцов QC.

Такой подход применен при исследовании гепатотоксикантов: парацетамола [462] и CCl_4 [463]. Авторы [162] для уменьшения инструментальной погрешности предлагают анализировать каждый образец дважды и усреднять полученные результаты.

Мы считаем, что использование заранее подготовленной и оптимизированной базы данных метаболитов конкретного биологического образца (плазма крови, моча, головной мозг, печень), подготовленного к анализу по заранее стандартизированной процедуре, позволяет заранее отфильтровать компоненты метаболических профилей с низкой воспроизводимостью. Кроме того, использование небольших баз хроматоспектральных данных позволяет повысить надежность идентификации, исключить влияние дрейфа времен удерживания и, в результате, повысить статистическую мощность всего эксперимента без увеличения размера выборки, то есть, используя меньшее количество лабораторных животных.

3.5.1. Создание оптимизированных баз данных

Рассмотрим подробнее методику создания и оптимизации соответствующих баз данных. Для создания перечня метаболитов в плазме крови крыс, включенных в базу данных (БД), была проведена предварительная фильтрация и оптимизация. Результаты оптимизации представлены на рисунке 47.

Оптимизация включала в себя следующие стадии:

1. Предварительную деконволюцию масс-хроматограмм и "разметку" хроматографических пиков.
2. Первый этап оптимизации: исключение пиков по отношению сигнал/шум, площади и пр.
3. Применение созданной БД к 10 масс-хроматограммам, полученным при анализе одной той же аликвоты образца (погрешность ГХ-МС анализа).
4. Применение созданной БД к 10 масс-хроматограммам, полученным при анализе различных аликвот одного образца (погрешность подготовки проб).

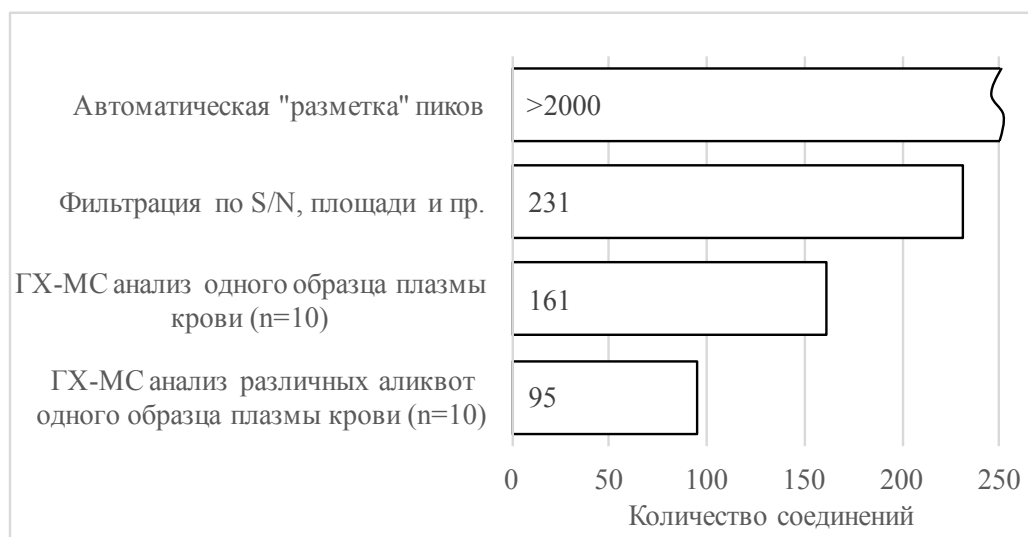


Рисунок 47 — Результаты фильтрации и оптимизации перечня метаболитов в плазме крови крыс, включенных в базу данных

В итоговую версию базы данных вошли следующие классы соединений: аминокислоты, карбоновые кислоты (моно-, ди-, три-, гидрокси- и кето-), фосфаты, азотсодержащие соединения, N-производные глицина, азотсодержащие кислоты, дисахариды, стеролы, моносахариды, полиатомные спирты и альдоновые кислоты.

Использование разработанной базы данных позволяет значительно упростить метаболическое профилирование с использованием квадрупольной ГХ-МС, которая, в свою очередь, уменьшает стоимость исследования. Свободно распространяемое ПО AMDIS позволяет интерпретировать масс-хроматограммы, зарегистрированные на приборах различных производителей. Предлагаемый подход позволяет заранее провести идентификацию компонентов, составляющих метаболический профиль и провести отнесение хроматографических пиков.

3.5.2. Идентификация и отнесение пиков

Наиболее "проблемными" классами метаболитов в плазме крови с точки зрения их идентификации являются моносахариды, сахарные кислоты и полиатомные спирты, так как эти категории включают большое количество стереоизомеров.

Инозитолы или гексагидроксициклогексаны, шестиатомные сахарные спирты, имеют девять возможных изомеров, среди которых основной биогенный — *мио*-инозитол, а *цилло*-, *эпи*-, *нео*-, *хиро*-, *муко*-инозитол присутствуют в организме в малых количествах [464]. Индексами удерживания в БД НИСТ охарактеризованы только *мио*-инозитол 2122 ± 2 ед. инд., *мезо*-инозитол — 2154, *хиро*-инозитол 2011, 2022, *цилло*-инозитол — 2090. Два изомера охарактеризованы ИУ, но не отнесены к конкретным стереоизомерам — 2000 и 1872 ед. инд.

Типичный масс-спектр инозитола приведен на рисунке 48. Разные изомеры отличаются только соотношением интенсивностей, поэтому их надежная безэталонная идентификация возможна только с привлечением газохроматографических индексов удерживания.

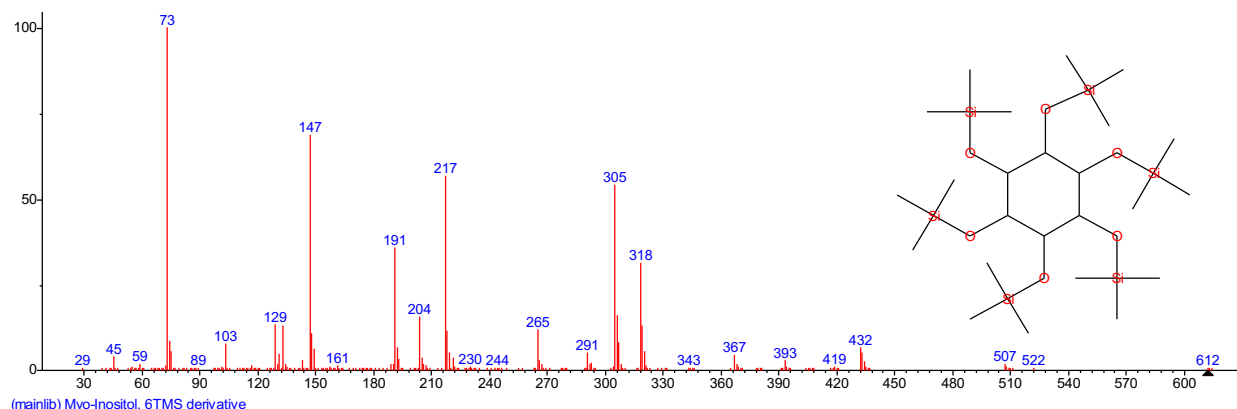


Рисунок 48 — Масс-спектр ионизации электронами *мио*-инозитола

Результаты идентификации инозитолов приведены в таблице 69 в объединенном виде с другими полиатомными спиртами: 2,3-бутандиолом, глицерином и пр.

Среди изомеров инозитола обнаружены хиро-, сцилло- и мио-инозитол. Согласно литературным данным, эти изомеры присутствуют в крови в следующих концентрациях: *мио*-инозитол 23 ± 8 мкМ [465], *сцилло*-инозитол 0.026 (0.0026-0.321) мкМ [466], а для *хиро*-инозитола не удалось обнаружить справочных данных по его содержанию в крови.

Полиолы — это продукты восстановления сахаров. Большая часть полиолов обычно не рассматривается, и наиболее изученными являются глицерин, мио-инозитол и сорбит, которые играют важную роль в физиологии [467,468]. Другие полиолы изучены менее полно [469].

Однако, многие из них имеют диагностическую значимость, например, соотношение концентраций *мио*- и *хиро*-инозитолов является маркером инсулинорезистентности [470,471].

Точно отнести пик полиатомного спирта с четырьмя атомами углерода в цепи не удалось, так трейтол и его стереоизомер, эритритол, имеют справочные индексы удерживания, отличающиеся в среднем на 3 ед.инд. Однако разница в ИУ 1,5-ангидроглюцитола позволяет надежно отличить его от 1,4-ангидроманнитола. Обнаруженный 3-дезоксипентитол идентифицирован с точностью до химического класса, так как класс 3-дезоксипентитолов крайне скудно охарактеризован газохроматографическими ИУ.

Качественный и количественный анализ сложных смесей углеводов является методической проблемой [472]. При использовании метода ГХ-МС многие сахара имеют близкие времена удерживания и масс-спектры без характеристичных особенностей. Двухстадийная дериватизация приводит к парным пикам *син*- и *анти*-форм метоксимов. Для идентификации метоксимов моно- и дисахаридов, в работе [473] был даже использован метод главных компонент.

Анализ смесей восстанавливающих сахаров сильно затруднен их структурной схожестью и наличием более пяти изомеров каждого моносахарида: α - и β -пиранозиды, α - и β -фуранозиды и открытая цепная форма [474,475]. Восемь гексоз могут образовывать более 40 таких изомеров, каждый из которых виден как отдельный пик на масс-хроматограмме. Применение одностадийного силилирования приведет к массиву перекрывающихся пиков, делающих невозможным точное их отнесение [476].

Достоверно отличить компоненты друг от друга, используя только масс-спектры, возможно только с точностью до химического класса: пиранозиды от фуранозидов, гексозы от пентоз, циклические от линейных форм (см. рисунки 49 и 50).

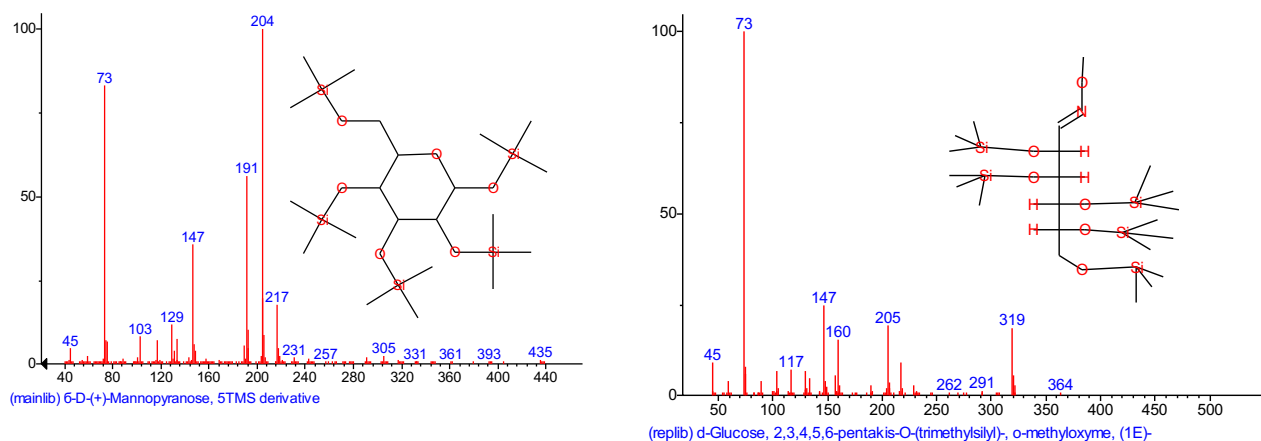


Рисунок 49 — Масс-спектры ионизации электронами триметилсилильного эфира пиранозы, образованной из гексозы (слева) и триметилсилильного эфира метилоксима цепной формы глюкозы (справа)

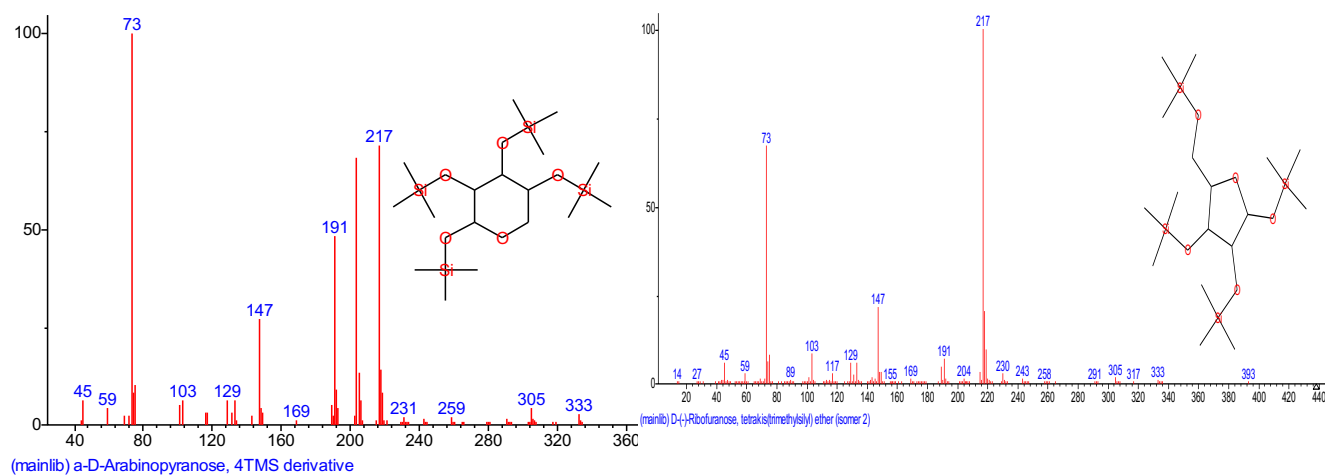


Рисунок 50 — Масс-спектр ионизации электронами триметилсилильного пиранозы, образованной из пентозы (слева) и триметилсилильного эфира фуранозы, образованной из пентозы (справа)

Оксимирование карбонильных групп затрудняет возможность образования пираноз и фураноз, что значительно упрощает масс-хроматограмму, повышает чувствительность и уменьшает

количество изомеров и пиков [477], в то же время образующиеся оксимы существуют в двух формах: *син*- (*E*) и *анти*- (*Z*).

Оксимирование всегда проводится в качестве первой стадии дериватизации. Дополнительным преимуществом стадии оксимирования является защита α -кетокислот от декарбоксилирования [478]. Для определения сахаров используют различные оксимирующие агенты: гидроксилламин [479], метоксиламин [475], этоксиламин [227] и бензоксиламин [475] и пр.

Тем не менее, возможность образования циклических форм моносахаридов в подготовленной пробе зависит от степени конверсии моносахаридов в оксимы. Для выбора оптимальной процедуры оксимирования нами было проведено определение соотношения циклических и линейных форм моносахаридов при различных температурах оксимирования. На рисунке 51 приведены фрагменты масс-хроматограмм образцов, полученных путем метоксимирования при 70°C в течение часа и при комнатной температуре в течение 16 часов.

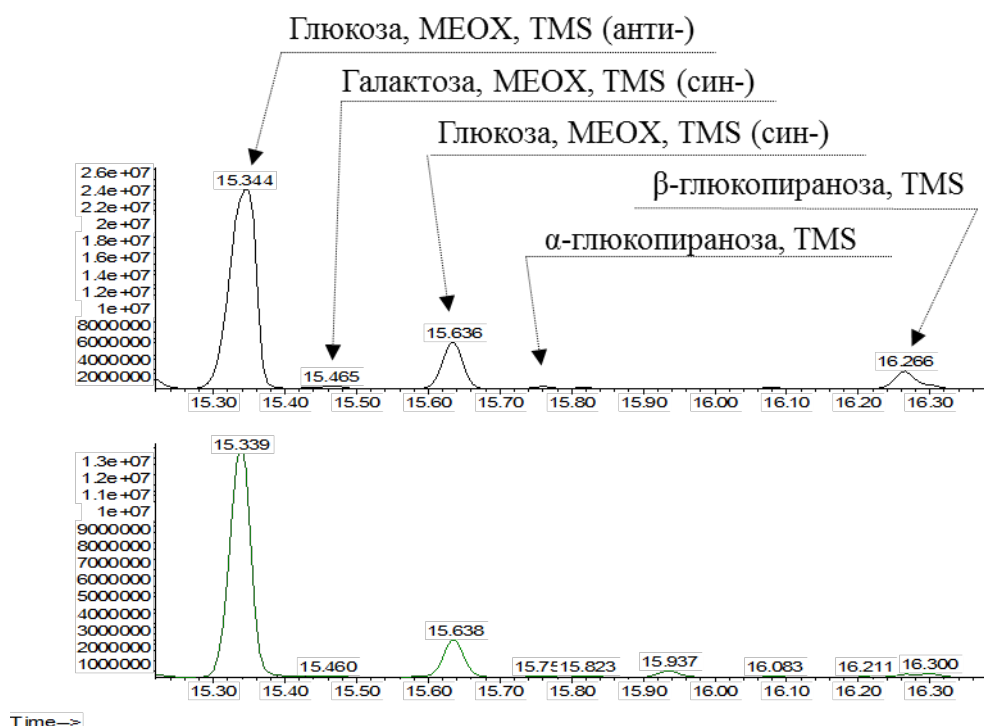


Рисунок 51 — Фрагменты масс-хроматограмм, зарегистрированных по полному ионному току с хроматографическими пиками моносахаридов. Образцы получены путем метоксимирования при 70°C в течение часа (вверху) и при комнатной температуре в течение 16 часов (внизу)

Определение соотношения проводили путем сравнения площадей метоксима глюкозы (сумма *син*- и *анти*-формы) и суммы площадей α - и β -глюкопираноз, результат сравнения приведен в таблице 64.

В результате можно рекомендовать проведение первой стадии дериватизации при комнатной температуре в течение 16 часов позволяет снизить долю циклической формы моносахаридов в 4.5 раза.

Таблица 64 — Соотношение площадей хроматографических пиков производных цепной формы глюкозы и двух глюкопиранозидов, полученных при различных условиях метоксимирования

Аналит	Условия проведения метоксимирования	
	25°C, 16ч	70°C, 1 ч
Глюкоза (син+анти)	25.1×10 ⁶ усл.ед.	60.3×10 ⁶ усл.ед.
α- и β-глюкопиранозы	0.5×10 ⁶ усл.ед.	5.4×10 ⁶ усл.ед.
Доля циклической формы	1.8 %	8.2%

При использовании температурной программы для метаболического профилирования (см. раздел 2.4.1), ИУ моносахаридов и полиатомных спиртов оказались занижены, по сравнению со справочными, на 15-20 ед. инд., поэтому был проведен дополнительный эксперимент по определению ИУ в другом режиме хроматографирования: от 80°C (1 мин) до 180°C со скоростью 20°C/мин, затем до 300 со скоростью 5 °C/мин. Такой метод делает невозможным определение других компонентов метаболического профиля, однако измерение индексов удерживания углеводов можно выполнить точнее. В таблицах 78-82 приведены именно уточненные ИУ. Однако в оптимизированной базе данных были оставлены ИУ с погрешностями, так как предполагается использовать обычный режим хроматографирования.

При сопоставлении различных справочных данных из библиотеки индексов удерживания NIST/EPA/NIH, можно сделать следующий вывод: ИУ циклических форм больше, чем цепных (метилоксимов) приблизительно на 40-50 ед. инд, в то время как ИУ фураноз меньше пираноз приблизительно на 40-50 ед. инд. α- и β-пиранозы отличаются на ~5 ед.инд. в пользу β-изомера. Син-изомер метилоксима линейной формы обладает ИУ большим на 5 ед. инд. по сравнению анти-изомером. Эти сведения были использованы нами для отнесения пиков компонентов, составляющих метаболический профиль плазмы крови (см. таблицу 68).

3.5.3. Количественный анализ

Рассмотрим следующий аспект предварительной обработки хроматоспектральных данных: нормализацию. Нормализация может быть выполнена либо с использованием одного или нескольких внутренних стандартов, добавляемых до стадии экстракции или с использованием внешних стандартов, либо при использовании статистических моделей.

Учитывая ориентирование разрабатываемых подходов на унификацию и создание единой химико-аналитической платформы для поиска всех типов биомаркеров, нами было принято решение использовать метод внутренних стандартов.

Внутренний стандарт необходим:

- для контроля правильности проведения процедуры пробоподготовки (площадь пика внутреннего стандарта должна быть не меньше установленной пороговой величины);
- для контроля правильности работы хромато-масс-спектрометрической системы (отклонения величин относительных интенсивностей сигналов ионов в масс-спектре и

абсолютной величины индекса удерживания от реперных величин не должны превышать установленных значений);

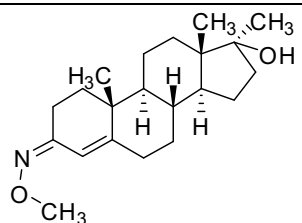
- для проведения количественных и полуколичественных оценок содержания определяемых компонентов в анализируемых биопробах.

Внутренние стандарты должны отвечать следующим требованиям:

- заведомо абиогенные;
- хорошо извлекаются из любых видов биопроб;
- обладают отличными хроматографическими свойствами (правильная форма хроматографического пика);
- отсутствуют эффекты памяти в хроматографической системе;
- исключается их образование или расхождение при хранении проб.

Таблица 65 — Перечень соединений, предварительно отобранных в качестве внутренних стандартов

Соединение	Структурная формула	Вр. уд-я, мин	<i>m/z</i>
Циклогексанол		11.571	129, 157
Бутиламин		13.149	128, 174 , 202
Глицин-d ₅		13.231	104 , 147
4-(диметиламино)масляная кислота		13.844	58, 114, 142
3-фторбензойная кислота		14.955	197 , 153, 123
4- <i>tert</i> -бутилфенол		16.794	207 , 222
Трибутилфосфат		20.382	99 , 155, 211
Пальмитиновая кислота-d ₃₁		24.231	344

Соединение	Структурная формула	Вр. уд-я, мин	<i>m/z</i>
17 α -метилтестостерон		36.117	313, 403 , 143

Примечание: жирным шрифтом выделены характеристичные ионы в масс-спектрах ионизации электронами, использованные для количественного анализа.

В таблице 65 приведен перечень соединений, предварительно отобранных в качестве внутренних стандартов. Структурные формулы приведены для конечной формы аналита.

Для оценки возможности использования внутренних стандартов и выбора оптимального стандарта была приготовлена смесь внутренних стандартов в метаноле. Исходные и конечные концентрации приведены в таблице 66. Стоит отметить, что столбец "кол-во на колонку" показывает количество соединения при подготовке пробы к анализу согласно разделу 2.4.1: внесение 10 мкл смеси стандартов в 400 мкл плазмы крови, упаривание, метоксимирование, упаривание, силилирование 50 мкл БСТФА, ввод 1 мкл в инжектор газового хроматографа.

Аналитические характеристики потенциальных внутренних стандартов были предварительно оценены при использовании исходного метанольного раствора.

Таблица 66 — Концентрация внутренних стандартов в смеси

Соединение	Конечная конц-я, мг/мл	Кол-во на колонку, нг
<i>n</i> -Бутиламин	0.35	70
Трибутилфосфат	0.35	70
3-Фторбензойная кислота	0.35	70
4-Диметиламиномасляная кислота	0.20	40
Малоновая кислота d ₄	0.40	80
4- <i>трет</i> -Бутилфенол	0.06	12
Нафталин-d ₈	0.35	70
Пальмитиновая кислота d ₃₁	0.15	30
Камфора	0.25	50
Ментол	0.30	60
Метилтестостерон	0.35	70
Новокаин	0.25	50
Циклогексанол	0.06	12
Глицин d ₅	0.35	70
3-Амино-3-бромфенилпропионовая кислота	0.30	60
Циклогексанон	0.35	70

Воспроизводимость количественного определения внутренних стандартов оценивали следующим образом: объединенный образец плазмы крови от нескольких крыс разделяли на 10 аликвот, каждую из которых готовили к анализу аналогично вышеприведенному способу. Серию анализов группы образцов повторяли трижды. Таким образом была оценена стабильность подготовленных образцов при хранении в автоматическом дозаторе при комнатной температуре в течение 18 часов. В результате было выявлено, что все без исключения потенциальные внутренние

стандарты нестабильны. Из этого можно заключить, что время анализа серии образцов не должно превышать 6 часов.

По результатам оценки стабильности и воспроизводимости была отобрана первая группа соединений. В таблице 66 не приведены формулы соединений, не прошедших первый этап отбора и не показавших достаточную стабильность в образце в ходе подготовки к анализу: малоновая кислота d_4 , циклогексанон, новокаин, ментол, камфора, нафталин- d_8 .

В таблице 67 приведены коэффициенты извлечения потенциальных внутренних стандартов из плазмы крови. Коэффициенты вычисляли сравнением площадей хроматографических пиков после извлечения из плазмы крови с площадями пиков, извлечённых из метанольного раствора.

Таблица 67 — Коэффициенты извлечения внутренних стандартов из плазмы крови

Соединение	$K_{\text{извл.}}$, %
Циклогексанол	45 ± 29
Бутиламин	0.8
Глицин- d_5	69 ± 16
4-(диметиламино)масляная кислота	62 ± 9
3-фторбензойная кислота	62 ± 8
4- <i>трет</i> -бутилфенол	39 ± 8
Трибутилфосфат	81 ± 41
Пальмитиновая кислота- d_{31}	83 ± 8
17 α -метилтестостерон (сумма двух изомеров)	46 ± 4

Оптимальный внутренний стандарт или смесь стандартов выбирали следующим образом: в 10 аликвот плазмы крови вносили по 10 мкл смеси внутренних стандартов (см. таблицу 67). Используя оптимизированную базу данных, определяли абсолютные значения площадей хроматографических пиков компонентов в каждом образце. Затем вычисляли относительные площади путем деления на площади хроматографических пиков одного из стандартов. Внутренний стандарт, который приводил к наименьшему СКО, считали оптимальным.

Оптимальным внутренним стандартом, который позволяет минимизировать СКО большинства аналитов при нецелевом метаболическом профилировании, оказалась смесь 3-фторбензойной, 4-диметиламиномасляной и пальмитиновой- d_{31} кислот.

В таблицах 68-72 приведены относительные стандартные отклонения площадей хроматографических пиков в контрольных образцах (см. эксп. часть) различной природы: кровь, моча, головной мозг и печень. В таблицах приведены измеренные ИУ, стандартные отклонения относительных площадей, оптимальные внутренние стандарты для каждого соединения, а также оценка статистической мощности (см. раздел 3.5.4) при числе животных в каждой группе по 6 и по 8.

Таблица 68 — Перечень соединений, определяемых в плазме крови при нецелевом метаболическом профилировании методом ГХ-МС

Химический класс	Название	ИУ, ед. инд	ISTD	S _r , %	1-β, %*	
					n=8	n=6
1	2	3	4	5	6	7
Аминокислоты	Аланин	1141	ДМАБ	60	34	26
	Лейцин	1183	ДМАБ	77	20	16
	2-аминомасляная к-та	1176	ДМАБ	14	99	99
	Валин	1222	ДМАБ	6	99	99
	Норлейцин	1279	ДМАБ	5	99	99
	Изолейцин	1303	ДМАБ	36	69	55
	Пролин	1311	ДМАБ	16	99	99
	Глицин	1320	ДМАБ	22	98	92
	Серин	1367	ДМАБ	24	96	89
	Треонин	1394	ДМАБ	8	99	99
	Пироглутаминовая к-та	1510	ДМАБ	34	75	61
	Аспарагиновая к-та	1527	ДМАБ	24	68	57
	Метионин	1531	ДМАБ	63	31	23
	Аспарагин	1606	ДМАБ	17	99	99
	Глутаминовая к-та	1626	ДМАБ	39	63	49
	Тирозин	1909	ДМАБ	54	40	30
	Триптофан	2238	ДМАБ	27	94	77
Фенилаланин	1646	ДМАБ	42	57	44	
Гидроксикарбоновые кислоты	Молочная к-та	1061	ФБ	18	99	99
	2-гидроксимасляная к-та	1130	ФБ	13	99	99
	3-гидроксимасляная к-та	1162	ФБ	9	99	99
	2-гидроксиизовалериановая к-та	1169	ФБ	14	99	99
	3-гидроксиизовалеривановая к-та	1213	ФБ	16	99	99
Кетокислоты	2-кетоизокапроновая к-та	1217	ФБ	13	99	99
	Ацетоуксусная к-та	1300	ФБ	11	99	99
	Пировиноградная к-та	1048	ФБ	37	68	54
Дикарбоновые кислоты	Метилантарная к-та	1330	ФБ	89	14	12
	Щавелевая к-та	1105	ФБ	24	84	61
	Малоновая к-та	1206	ФБ	8	99	99
	Янтарная к-та	1317	ФБ	21	99	97
	Адипиновая к-та	1506	ФБ	24	61	48
	Глутаровая к-та	1404	ФБ	74	22	18
	Фумаровая к-та	1346	ФБ	26	93	83
	Яблочная к-та	1493	ФБ	24	96	87
Трикарбоновые к-ты	Лимонная к-та	1836	ФБ	20	98	96
Монокарбоновые кислоты	Изовалериановая к-та	924	ПК	65	29	22
	Гексановая к-та	1071	ПК	38	65	52
	Стеариновая к-та	2234	ПК	23	98	89
	Арахидоновая к-та	2383	ПК	53	41	31
	Гептадекановая к-та	2138	ПК	45	52	40
	Додекановая к-та	1653	ПК	15	99	99
	Пальмитолеиновая к-та	2029	ПК	12	99	99
	Тетрадекановая к-та	1850	ПК	26	98	81

Химический класс	Название	ИУ, ед. инд	ISTD	S _r , %	1-β, %*	
					n=8	n=6
1	2	3	4	5	6	7
	Z,Z-Октадека-9,12-диеновая к-та	2210	ПК	6	99	99
	цис-октадец-9-еновая к-та	2213	ПК	9	99	99
	транс-октадец-9-еновая к-та	2219	ПК	12	99	99
	Пальмитиновая к-та	2045	ПК	16	99	99
Фосфаты	Фосфорная к-та	1286	ПК	25	99	99
	Пирофосфорная к-та	1632	ПК	24	99	89
	Глицерол-3-фосфат	1776	ПК	18	99	99
Азотсодержащие соединения	Мочевина	1246	ДМАБ	25	95	85
	Креатинин	1577	ДМАБ	33	78	63
N-производные глицина	N-ацетилглицин	1290	ФБ	46	52	40
	N-формилглицин	1383	ФБ	47	49	38
Азотсодержащие кислоты	Никотиновая к-та	1335	ДМАБ	71	24	19
			ДМАБ	11	3	10
	Пипеколиновая к-та	1343		7		
	Индолпропионовая к-та	2110	ДМАБ	96	10	8
	Индолмолочная к-та	2205	ДМАБ	19	99	98
Дисахариды	Сукроза	2726	ФБ	55	39	29
Стероиды	Холестерол	3335	ПК	10	99	99

Примечание: внутренние стандарты обозначены след. образом: ДМАБ — 4-диметиламинобензойная кислота; ФБ — 3-фторбензойная кислота; ПК — пальмитиновая кислота d₃₁. * — см. комментарии в тексте.

Воспроизводимость относительных площадей оценивали при использовании наилучшего внутреннего стандарта. Дейтерированные внутренние стандарты плохо себя зарекомендовали по следующим причинам: малоновая кислота-d₂ стремится к обмену атомов дейтерия на протий вследствие их высокой кислотности, глицин-d₂ не обменивает дейтоны, однако из-за наличия всего двух дейтонов в молекуле хроматографически не отделим от недейтерированного глицина, поэтому выделение пика методом деконволюции крайне затруднено. Пальмитиновая кислота-d₃₁, в свою очередь, полностью разделена с недейтерированной кислотой, поэтому ее отнесение происходит с высокой надежностью.

В таблице 69 приведены результаты оценки воспроизводимости определения некоторых отдельных классов соединений, не включенных в таблицу 68: моносахариды, альдоновые кислоты и полиатомные спирты. Выделение их в отдельную таблицу связано с затруднениями, возникающими при их отнесении и идентификации.

Таблица 69 — Дополнительный перечень соединений, определяемых в плазме крови при нецелевом метаболическом профилировании методом ГХ-МС

Химический класс	Соединение	Форма (изомер)	ИУ, ед. инд	Справ. ИУ, ед. инд.	Вн. станд.	S _r , %	1-β, %*	
							n=8	n=6
Моносахариды	Рибоза	Рибоза (син+анти)	1679	1680±11 ¹	ПК	31	82	67

Химический класс	Соединение	Форма (изомер)	ИУ, ед. инд.	Справ. ИУ, ед. инд.	Вн. станд.	s _r , %	1-β, %*		
							n=8	n=6	
Химический класс	α-рибофураноза	α-рибофураноза	1653	1677 ²	ПК	32	79	64	
		Галактоза	Галактоза (анти)	1909	1892±6	ПК	16	84	71
	Галактоза (син)		1932	1892±23	ПК	-	-	-	
	α-галактопираноза		1915	1877±26	ПК	-	-	-	
	Глюкоза	Глюкоза (анти)	1924	1901±32	ПК	180	8	7	
		Глюкоза (син)	1947	1894±11	ПК	118	11	9	
		α-глюкопираноза	1953	1902±31	ПК	19	99	99	
		β-глюкопираноза	1995	1944±23	ПК	64	30	23	
	Фруктоза	Фруктоза (анти)	1845	1875	ПК	-	-	-	
	Полиатомные спирты	2,3-бутандиол		1026	1040±12	ПК	-	-	-
		Глицерин		1279	1292±7	ПК	-	-	-
		Треитол (эритритол)		1516	1507±20	ПК	20	98	97
		Арабитол		1739	1740±27* ³	ПК	31	82	67
Неидентиф 3-дезоксипенти-тол		1828	- ⁴	ПК	-	-	-		
1,5-Ангидроглюцитол		1876	1881	ПК	16	99	99		
Галактитол		1966	1956±34*	ПК	37	69	55		
Маннитол		1974	1969±23*	ПК	58	35	27		
<i>Хиро</i> -инозитол		2001	2017±8	ПК	-	-	-		
<i>Сцилло</i> -инозитол		2087	2090	ПК	-	-	-		
<i>Мио</i> -инозитол		2125	2136±12*	ПК	38	65	52		
Альдоновые кислоты	Глицериновая к-та		1337	1342±5	ФБ	17	99	99	
	Гликолевая к-та		1075	1076±4	ФБ	16	99	99	
	4-деоксиэритроновая к-та		1363	1362±3	ФБ	16	99	99	
	3-дезокситетроновая к-та		1416	1429±3	ФБ	40	61	48	
	2-дезокситетроновая к-та		1435	1448±6	ФБ	27	95	78	
	Треоновая к-та		1535	1523	ФБ	17	99	99	
	Эритроновая к-та		1570	1571±7	ФБ	24	99	89	
	2-деоксирибоновая к-та		1666	1682	ФБ	27	95	79	
	Рибоновая к-та		1803	1799	ФБ	50	46	35	
Глюконовая к-та		2040	2026±25	ФБ	21	99	96		
Неидентифицированные	<i>m/z</i> 361		1980	-	-	-	-	-	
	<i>m/z</i> 361		1997	-	-	-	-	-	
	<i>m/z</i> 205		1894	-	-	-	-	-	
	<i>m/z</i> 205		1904	-	-	-	-	-	

Примечание: ¹ — здесь и далее значения справочных ИУ приведены в виде среднее ± СКО; ² — единственное значение; ³ * — подтверждено стандартом; ⁴ — идентифицирован с точностью до класса.

При вычислении справочного ИУ не были учтены ИУ соединений в базе данных NIST, которые нельзя отнести к конкретному изомеру: *син*- или *анти*-, *альфа*- или *бета*-.

Таблица 70 — Перечень соединений, определяемых в моче при нецелевом метаболическом профилировании методом ГХ-МС

Химический класс	Название	ИУ, ед. инд	ISTD	s _r , %	1-β, %*	
					n=8	n=6
1	2	3	4	5	6	7
Аминокислоты	Аланин	1141	ДМАБ	70	25	20
	Валин	1222	ДМАБ	18	99	99
	Норлейцин	1279	ДМАБ	20	99	96
	Изолейцин	1303	ДМАБ	42	58	45
	Пролин	1311	ДМАБ	12	99	99
	Глицин	1320	ДМАБ	29	89	73
	Серин	1367	ДМАБ	30	86	70
	Треонин	1394	ДМАБ	13	99	99
	Аспарагиновая к-та	1527	ДМАБ	28	92	76
	Метионин	1531	ДМАБ	91	13	12
	Глутаминовая к-та	1626	ДМАБ	41	60	47
	Тирозин	1909	ДМАБ	78	20	16
	Триптофан	2238	ДМАБ	35	72	58
	Фенилаланин	1646	ДМАБ	53	41	32
	3-аминоизомасляная к-та	1231	ДМАБ	40	61	48
N,N-диметилглицин	981	ДМАБ	28	92	76	
Гидроксикарбоновые кислоты	Молочная к-та	1061	ФБ	28	92	76
	2-гидроксимасляная к-та	1130	ФБ	15	99	99
	3-гидроксимасляная к-та	1162	ФБ	9	99	99
	2-гидроксиизовалериановая к-та	1169	ФБ	16	99	99
	3-гидроксиизовалеривановая к-та	1213	ФБ	23	98	91
	2-метил-3-гидроксимасляная к-та	1288	ФБ	27	95	79
	5-гидроксигексановая к-та	1356	ФБ	14	99	99
	Гомованилиновая к-та	1769	ФБ	25	95	85
	4-гидроксиминдальная к-та	1783	ФБ	14	99	99
	Аскорбиновая к-та	1902	ФБ	25	95	85
	Кофейная к-та	2159	ФБ	32	80	65
Кетокислоты	2-кетоизокапроновая к-та	1217	ФБ	17	99	99
	Ацетоуксусная к-та	1300	ФБ	16	99	99
	Пировиноградная к-та	1048	ФБ	51	44	34
	3-метил-2-кетовалериановая к-та	1258	ФБ	23	97	91
	2-кетоглутаровая к-та	1572	ФБ	27	95	79
Дикарбоновые кислоты	Метилянтарная к-та	1330	ФБ	130	4	2
	Щавелевая к-та	1105	ФБ	36	70	56
	Малоновая к-та	1206	ФБ	12	99	99
	Янтарная к-та	1317	ФБ	22	98	92
	Адипиновая к-та	1506	ФБ	25	95	85
	Глутаровая к-та	1404	ФБ	100	9	9
	Фумаровая к-та	1346	ФБ	39	63	50

Химический класс	Название	ИУ, ед. инд	ISTD	s _r , %	1-β, %*	
					n=8	n=6
1	2	3	4	5	6	7
	3-метилглутаконовая к-та	1436	ФБ	45	53	41
	Субериновая к-та	1579	ФБ	51	44	34
	Яблочная к-та	1493	ФБ	30	86	70
Трикарбоновые кислоты	Лимонная к-та	1836	ФБ	24	96	88
	Метиляблочная к-та	1478	ФБ	21	98	96
	Аконитовая к-та	1748	ФБ	20	99	98
Монокарбоновые кислоты	Изовалериановая к-та	924	ПК	65	29	22
	Гексановая к-та	1071	ПК	38	66	52
	Стеариновая к-та	2234	ПК	23	97	91
	Арахидоновая к-та	2383	ПК	53	41	32
	Гептадекановая к-та	2138	ПК	45	53	41
	Додекановая к-та	1653	ПК	15	99	84
	Пальмитолеиновая к-та	2029	ПК	12	99	99
	Тетрадекановая к-та	1850	ПК	26	98	82
	Z,Z-Октадека-9,12-диеновая к-та	2210	ПК	10	99	99
	<i>цис</i> -октадец-9-еновая к-та	2213	ПК	12	99	99
	<i>транс</i> -октадец-9-еновая к-та	2219	ПК	12	99	99
	Пальмитиновая к-та	2045	ПК	16	99	99
	Фосфаты	Фосфорная к-та	1286	ПК	25	99
Пирофосфорная к-та		1632	ПК	24	96	88
Глицерол-3-фосфат		1776	ПК	18	99	99
Азотсодержащие соединения	Мочевина	1246	ДМАБ	25	99	85
	Креатинин	1577	ДМАБ	33	77	62
	Урацил	1346	ДМАБ	34	75	60
	Тимин	1403	ДМАБ	27	95	79
	Дигидротимин	1493	ДМАБ	31	83	67
	Цитозин	1534	ДМАБ	19	99	97
	5-гидроксииндол	1709	ДМАБ	29	89	73
N-производные глицина	N-ацетилглицин	1290	ФБ	63	31	24
	N-формилглицин	1383	ФБ	56	38	29
	N-изовалерионилглицин	1491	ФБ	66	28	22
	Гиппуровая к-та	1845	ФБ	93	12	11
	4-гидроксигиппуровая к-та	2246	ФБ	0	-	-
Азотсодержащие кислоты	Никотиновая к-та	1335	ДМАБ	38	66	52
	Пипеколиновая к-та	1343	ДМАБ	177	8	7
	Индолпропионовая к-та	2110	ДМАБ	82	17	15
	Индолмолочная к-та	2205	ДМАБ	25	99	85
	3-уреидопропионовая к-та	1663	ДМАБ	92	12	11
	Мочевая к-та	2146	ДМАБ	96	11	10
Моносахариды	Рибоза (2 изомера)	1679	ПК	25	99	85
	Галактоза (анти)	1909	ПК	18	99	98
Альдоновые кислоты	Глюконовая к-та	2040	ФБ	19	99	97
	Галактаровая к-та	1870	ФБ	35	72	58
	Эритроновая к-та	1570	ФБ	41	60	47
	2-дезокситетроновая к-та	1435	ФБ	28	92	76

Химический класс	Название	ИУ, ед. инд	ISTD	s _r , %	1-β, %*	
					n=8	n=6
1	2	3	4	5	6	7
	4-дезоксиритроновая к-та	1363	ФБ	22	99	94
	Глицериновая к-та	1337	ФБ	25	99	85
Полиатомные спирты	Мио-инозитол	2125	ПК	59	35	27
	Галактитол	1966	ПК	55	39	30
	Маннитол	1974	ПК	71	24	19
	Арабитол	1739	ПК	52	43	33
	1,5-Ангидроглюцитол	1876	ПК	20	99	98

Из таблицы 70, помимо неидентифицированных в заключительную версию оптимизированной базы данных, не вошли: фруктоза, галактоза (*син-*) и α-галактопираноза.

Глюкоза, основной моносахарид крови, требует специальной подготовки крови, включающей ингибирование ферментов эритроцитов. Кроме того, перегруженный пик цепной формы глюкозы имеет крайне низкую воспроизводимость.

Благодаря стадии метоксимирования можно пренебречь циклическими формами моносахаридов и не учитывать их при дальнейшей обработке данных.

Таблица 71 — Перечень соединений, определяемых в гомогенате головного мозга при нецелевом метаболическом профилировании методом ГХ-МС

Химический класс	Название	ИУ, ед. инд	ISTD	s _r , %	1-β, %*	
					n=8	n=6
1	2	3	4	5	6	7
Аминокислоты	Аланин	1141	ДМАБ	54	40	31
	Валин	1222	ДМАБ	5	99	99
	Изолейцин	1303	ДМАБ	34	75	60
	Пролин	1311	ДМАБ	13	99	99
	Глицин	1320	ДМАБ	21	98	95
	Серин	1367	ДМАБ	22	98	92
	Треонин	1394	ДМАБ	6	99	99
	Аспарагиновая к-та	1527	ДМАБ	29	89	73
	Глутаминовая к-та	1626	ДМАБ	33	77	62
	Тирозин	1909	ДМАБ	55	39	30
	Триптофан	2238	ДМАБ	20	99	96
	Фенилаланин	1646	ДМАБ	42	58	45
	3-аминоизомасляная к-та	1231	ДМАБ	23	97	91
	2-аминомасляная к-та	#Н/ Д	ДМАБ	39	63	50
4-аминомасляная к-та	#Н/ Д	ДМАБ	16	99	99	
Гидроксикарбоновые кислоты	Молочная к-та	1061	ФБ	17	99	99
	3-гидроксимасляная к-та	1162	ФБ	8	99	99
Кетокислоты	Пировиноградная к-та	1048	ФБ	32	80	65
Дикарбоновые кислоты	Метилянтарная к-та	1330	ФБ	69	26	20
	Щавелевая к-та	1105	ФБ	15	99	99

Химический класс	Название	ИУ, ед. инд	ISTD	s _r , %	1-β, %*	
					n=8	n=6
1	2	3	4	5	6	7
	Малоновая к-та	1206	ФБ	8	99	99
	Янтарная к-та	1317	ФБ	20	99	96
	Адипиновая к-та	1506	ФБ	20	99	96
	Глутаровая к-та	1404	ФБ	54	40	31
	Фумаровая к-та	1346	ФБ	18	99	98
	Яблочная к-та	1493	ФБ	19	99	97
Трикарбоновые к-ты	Лимонная к-та	1836	ФБ	15	99	99
Монокарбоновые кислоты	Изовалериановая к-та	924	ПК	62	32	24
	Гексановая к-та	1071	ПК	22	98	92
	Стеариновая к-та	2234	ПК	28	92	76
	Арахидоновая к-та	2383	ПК	35	72	58
	Гептадекановая к-та	2138	ПК	33	77	62
	Додекановая к-та	1653	ПК	11	99	99
	Пальмитолеиновая к-та	2029	ПК	8	99	99
	Тетрадекановая к-та	1850	ПК	11	99	99
	Z,Z-Октадека-9,12-диеновая к-та	2210	ПК	6	99	99
	<i>цис</i> -октадец-9-еновая к-та	2213	ПК	6	99	99
	<i>транс</i> -октадец-9-еновая к-та	2219	ПК	11	99	99
	Пальмитиновая к-та	2045	ПК	14	99	99
	Бегеновая к-та	2651	ПК	14	99	99
Арахидиновая к-та	2469	ПК	14	99	99	
Фосфаты	Фосфорная к-та	1286	ПК	19	99	97
	Пирофосфорная к-та	1632	ПК	24	96	88
	Глицерол-3-фосфат	1776	ПК	21	99	96
Азотсодержащие соединения	Мочевина	1246	ДМАБ	16	99	99
	Креатинин	1577	ДМАБ	18	99	98
	Урацил	1346	ДМАБ	26	98	82
	Цитозин	1534	ДМАБ	19	99	97
N-производные глицина	N-ацетилглицин	1290	ФБ	54	40	31
	N-формилглицин	1383	ФБ	41	60	47
Азотсодержащие кислоты	Никотиновая к-та	1335	ДМАБ	59	35	27
Стероиды	Холестерол	3335	ПК	10	99	99
	25-гидроксихолестерол	3519	ПК	16	99	99
Липиды	Моноглицерид пальмитиновой кислоты	2631	ПК	31	83	67
	Моноглицерид стеариновой кислоты	2828	ПК	16	99	99
Моносахариды	Глюкоза (2 изомера)	-	ПК	23	97	91
	Рибоза (2 изомера)	-	ПК	28	92	76
	Галактоза (анти)	1909	ПК	16	99	99
Альдоновые кислоты	Глюконовая к-та	2040	ФБ	20	99	96
	Эритроновая к-та	1570	ФБ	18	99	98

Химический класс	Название	ИУ, ед. инд	ISTD	s _r , %	1-β, %*	
					n=8	n=6
1	2	3	4	5	6	7
	Глицериновая к-та	1337	ФБ	12	99	99
Полиатомные спирты	<i>Мио</i> -инозитол	2125	ПК	17	99	99
	<i>Сцилло</i> -инозитол	2087	ПК	-	-	-
	Галактитол	1966	ПК	27	95	79
	Маннитол	1974	ПК	46	51	39
	Арабитол	1739	ПК	32	80	65
	1,5-Ангидроглюцитол	1876	ПК	18	99	98

Таблица 72 — Перечень соединений, определяемых в гомогенате печени при нецелевом метаболическом профилировании методом ГХ-МС

Химический класс	Название	ИУ, ед. инд	ISTD	s _r , %	1-β, %*	
					n=8	n=6
1	2	3	4	5	6	7
Аминокислоты	Аланин	1141	ДМАБ	53	41	32
	Глицин	1320	ДМАБ	11	99	99
	Аспарагиновая к-та	1527	ДМАБ	20	99	96
	Глутаминовая к-та	1626	ДМАБ	33	77	62
	Фенилаланин	1646	ДМАБ	37	68	54
Гидроксикарбоновые кислоты	Молочная к-та	1061	ФБ	14	99	99
	3-гидроксимасляная к-та	1162	ФБ	6	99	99
	2-гидроксимасляная к-та	1130	ФБ	12	99	99
Кетокислоты	Пировиноградная к-та	1048	ФБ	29	89	73
	Ацетоуксусная к-та	1300	ФБ	8	99	99
Дикарбоновые кислоты	Метилянтарная к-та	1330	ФБ	38	66	52
	Щавелевая к-та	1105	ФБ	19	99	97
	Малоновая к-та	1206	ФБ	8	99	99
	Янтарная к-та	1317	ФБ	11	99	99
	Фумаровая к-та	1346	ФБ	26	98	82
	Яблочная к-та	1493	ФБ	18	99	98
Трикарбоновые кислоты	Лимонная к-та	1836	ФБ	10	99	99
Монокарбоновые кислоты	Изовалериановая к-та	924	ПК	38	66	52
	Гексановая к-та	1071	ПК	29	89	73
	Стеариновая к-та	2234	ПК	24	96	88
	Арахидоновая к-та	2383	ПК	42	58	45
	Гептадекановая к-та	2138	ПК	40	61	48
	Додекановая к-та	1653	ПК	12	99	99
	Пальмитолеиновая к-та	2029	ПК	7	99	99
	Тетрадекановая к-та	1850	ПК	15	99	99
	<i>Z,Z</i> -Октадека-9,12-диеновая к-та	2210	ПК	5	99	99

Химический класс	Название	ИУ, ед. инд	ISTD	S _r , %	1-β, %*	
					n=8	n=6
1	2	3	4	5	6	7
	<i>цис</i> -октадец-9-еновая к-та	2213	ПК	8	99	99
	<i>транс</i> -октадец-9-еновая к-та	2219	ПК	11	99	99
	Пальмитиновая к-та	2045	ПК	12	99	99
	Бегеновая к-та	2651	ПК	19	99	97
	Арахидоновая к-та	2469	ПК	17	99	99
Фосфаты	Фосфорная к-та	1286	ПК	23	97	91
	Пирофосфорная к-та	1632	ПК	25	99	85
	Глицерол-3-фосфат	1776	ПК	12	99	99
Азотсодержащие соединения	Мочевина	1246	ДМАБ	26	98	82
	Креатинин	1577	ДМАБ	33	77	62
	Урацил	1346	ДМАБ	51	44	34
	Цитозин	1534	ДМАБ	13	99	99
N-производные глицина	N-ацетилглицин	1290	ФБ	42	58	45
	N-формилглицин	1383	ФБ	37	68	54
Азотсодержащие кислоты	Никотиновая к-та	1335	ДМАБ	70	25	20
	Пипеколиновая к-та	1343	ДМАБ	74	22	18
	Индолмолочная к-та	2205	ДМАБ	14	99	99
Стероиды	Холестерол	3335	ПК	9	99	99
Глюкозамины*	N-ацетилглюкозамин	2162	ФБ	53	41	32
Моносахариды	Глюкоза (2 изомера)	-	ПК	20	99	96
	Рибоза (2 изомера)	-	ПК	26	98	82
	Галактоза (анти)	1909	ПК	12	99	99
Сахарные кислоты	Глюконовая к-та	2040	ФБ	18	99	98
	Эритроновая к-та	1570	ФБ	19	99	97
	Глицериновая к-та	1337	ФБ	13	99	99
Полиатомные спирты	<i>Мио</i> -инозитол	2125	ПК	33	77	62
	Треитол (эритритол)	1516	ПК	13	99	99
	<i>Силло</i> -инозитол	2087	ПК	-	-	-
	Галактитол	1966	ПК	20	99	96
	Маннитол	1974	ПК	53	41	32
	Арабитол	1739	ПК	21	99	96
	1,5-Ангидроглюцитол	1876	ПК	10	99	99
Дисахариды	Сукроза	2726	ФБ	51	44	34

* — В печени обнаружен N-ацетилглюкозамин, концентрация которого является маркером множественного склероза [480].

В результате выполненной работы составлены перечни соединений, включенных в соответствующие электронные базы хроматомасс-спектрометрических данных. Такие оптимизированные базы данных позволяют существенно расширить аналитические возможности газовой хроматомасс-спектрометрии низкого разрешения и проводить метаболическое профилирование образцов не только образцов плазмы крови, но и мочи, гомогенатов печени и головного мозга крыс.

3.5.4. Обоснование размеров экспериментальных групп при нецелевом метаболическом профилировании

Важный аспект дизайна токсикологического исследования — определение количества животных (или добровольцев) в группах [481]. Размер группы или выборки тесно связан с понятием статистической мощности и, соответственно, с вероятностью ошибок II рода [482]. Размер выборки зависит от различных факторов, таких как: минимальный ожидаемый эффект, вариация измерений, желаемая статистическая мощность, уровень значимости и тип статистического теста [483,484]. Недостаточный размер выборки может привести к высокой вероятности ложноотрицательных результатов, в противоположность этому, излишний размер выборки может привести к нерациональному использованию экспериментальных животных [485].

В ходе выполнения настоящего исследования нами была оценена статистическая мощность нецелевого метаболического профилирования различных видов биологических образцов. Мощность эксперимента вычислена с помощью ПО GPOWER 3.1. Результаты оценки для двух групп животных (контрольной и экспериментальной) по 6 и 8 шт. приведены в таблицах 68-72. За ожидаемые изменения концентрации биомаркеров принимали изменения в 1.5 раза, минимальное значение p принимали = 0.05 для критерия Манна-Уитни для двухстороннего распределения. Количество животных в группах определено с учетом реально достижимого размера экспериментальных групп лабораторных животных. Минимальной достаточной мощностью для исключения ошибок II рода считали 80%. Мощность 80% позволяет судить об отсутствии влияния химического фактора на метаболические профили.

Рассмотрим подробнее результаты, полученные при прогнозировании статистической мощности определения различных соединений, составляющих метаболические профили при исследовании образцов различной природы.

Гомогенат печени

Концентрации дисахаридов, во всех образцах, в которых они были обнаружены, можно охарактеризовать недостаточной воспроизводимостью для исключения ложноотрицательных результатов. Из полиатомных спиртов в печени — маннитол и *сцилло*-инозитол. Из азотсодержащих соединений — N-ацетилглюкозамин, пипеколиновая кислота, все N-производные глицина, креатинин и урацил. Из жирных кислот — арахидоновая кислота и изовалериановая, из дикарбоновых — метилянтарная, из аминокислот — только аланин.

Головной мозг

Аналогично экстракту из гомогената печени, в гомогенате мозга из полиатомных спиртов плохо воспроизводятся площади хроматографических пиков маннитола и *сцилло*-инозитола. Моноглицерид пальмитиновой кислоты имеет 1- β более 80% только при $n=8$, никотиновая

кислота, а также все N-производные глицина даже при $n=8$ характеризуются недостаточной мощностью. Из жирных кислот — арахидоновая и гептадекановая, из дикарбоновых — глутаровая. Среди изомеров аминотетракарбоновой кислоты, характерных для образца головного мозга, только 2-аминотетракарбоновую кислоту можно охарактеризовать недостаточной статистической мощностью. Из аминокислот — глутаминовую и аланин.

Моча

В моче недостаточной воспроизводимостью можно охарактеризовать почти все полиатомные спирты, в частности *мио*-инозитол, галактитол, маннитол и арабитол, а также многие альдоновые кислоты, в частности галактаровую и эритроновую. В моче, в целом, воспроизводимость различных компонентов профиля хуже, чем в других типах образцов. Также почти все азотсодержащие кислоты: пипеколиновая кислота, индолпропионовая кислота, 3-уреидопропионовая кислота и мочевиновая кислота. Только хроматографический пик индолмолочной кислоты имеет воспроизводимую, достаточную для статистической мощности 99 и 85% при $n = 8$ и 6, соответственно.

Производных глицина в моче больше чем в других образцах, однако, их можно охарактеризовать низкой воспроизводимостью: N-изовалериоилглицин, гиппуровая кислота, 4-гидроксиhipпуровая кислота и N-ацетилглицин, N-формилглицин. Среди азотсодержащих соединений: креатинин и урацил. Среди жирных кислот, как и во всех других типах образцов: арахидоновая, гептадекановая и изовалериановая кислоты. Среди дикарбоновых: 3-метилглутаконовая, глутаровая и метилянтарная. Имеющая важное диагностическое значение пировиноградная кислота тоже характеризуется низкой воспроизводимостью. 3-аминоизовалериановая кислота, а также ожидаемо низкие концентрации аминокислот в моче приводят к низкой воспроизводимости тирозина, триптофана, фенилаланина, метионина, глутаминовой кислоты, аланина и изолейцина.

Плазма крови

При метаболическом профилировании образцов плазмы крови недостаточной воспроизводимостью можно охарактеризовать хроматографические пики альдоновых кислот: рибоновой и 3-дезокситетраоновой. А также почти всех полиатомных спиртов: маннитола, *хиро*-инозитола, *сцилло*-инозитола, *мио*-инозитола и галактитола. При определении галактозы и рибозы вероятность ошибки II рода меньше 20% при $n=8$, а при определении глюкозы и фруктозы — более 20%. Все азотсодержащие кислоты, за исключением индолмолочной и все N-производные глицина также имеют недостаточную воспроизводимую. Из жирных кислот: арахидоновая и гептадекановая. Из дикарбоновых: адипиновая, глутаровая и метилянтарная, щавелевая только при $n=8$. Из аминокислот — фенилаланин, тирозин, метионин, лейцин и аланин.

Проведенная оценка мощности позволяет выявить перечень соединений, для которых возможна ошибка II рода при выявлении статистически значимых изменений концентраций потенциальных метаболических биомаркеров эффекта.

3.6. Обнаружение и идентификация биомаркеров эффекта органических соединений

3.6.1. Изменения профилей жирных кислот плазмы крови при интоксикации фосфоорганическими отравляющими соединениями

Мы проследили динамику тридцати жирных кислот (ЖК) с длиной цепи от C₁₁ до C₂₄ в плазме крови при острой интоксикации крыс различными ФОС [274]. На рисунке 52 проиллюстрированы различия в профилях свободных ЖК плазмы крови при введении зарина, зомана, RVX и терапевтической дозы карбоксима и атропина.

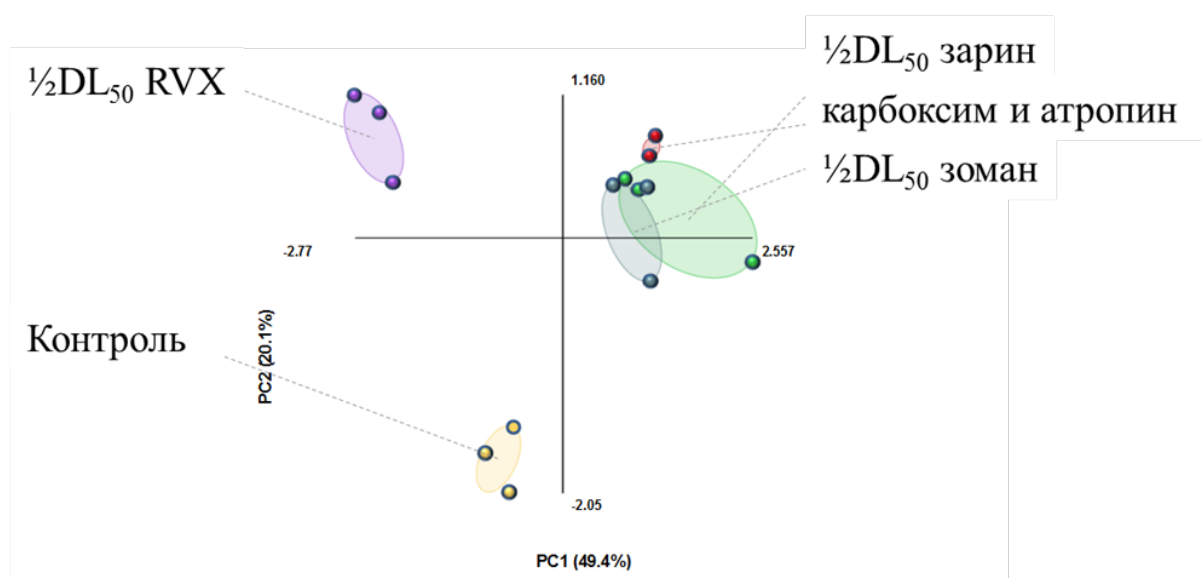


Рисунок 52 - Различия в метаболических профилях экспериментальных животных при введении зарина, зомана и RVX, а также карбоксима и атропина

Было выявлено статистически значимое увеличение суммарных концентраций свободных и этерифицированных форм ЖК в плазме крови через неделю после введения RVX (рисунок 53).

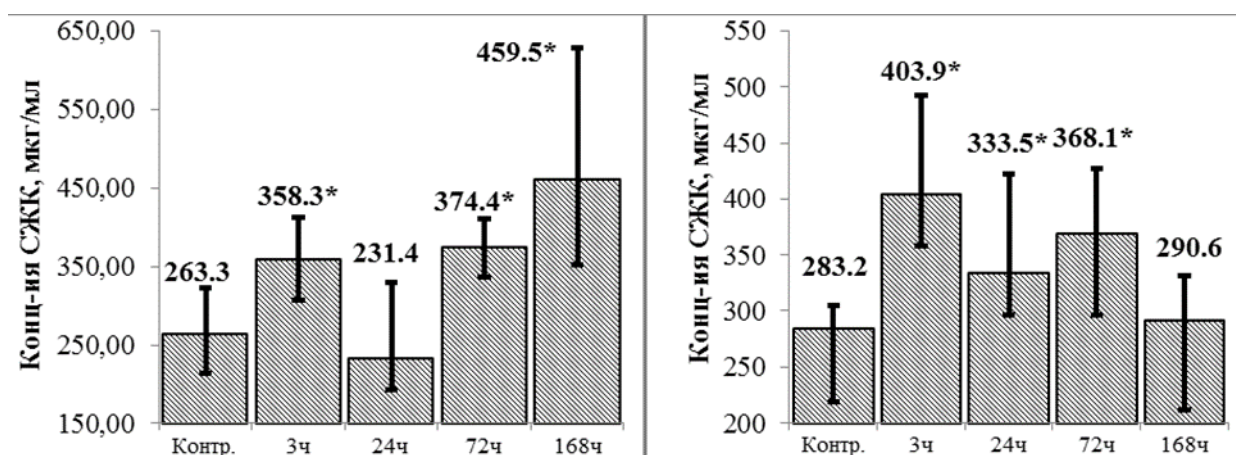


Рисунок 53 — Изменение суммарного содержания свободных жирных кислот после введения RVX без антидота (слева) и с карбоксимом (справа)

Введение карбоксима после RVX позволяет нормализовать концентрации жирных кислот в плазме крови, однако данный антидот не оказывает влияния на повышение содержания полиненасыщенных ЖК. На рисунке 54 приведен график иллюстрирующий изменения отношений концентраций ненасыщенных и насыщенных жирных кислот после введения RVX, через неделю после введения отношение выше более чем на 30% по сравнению с контрольной группой.

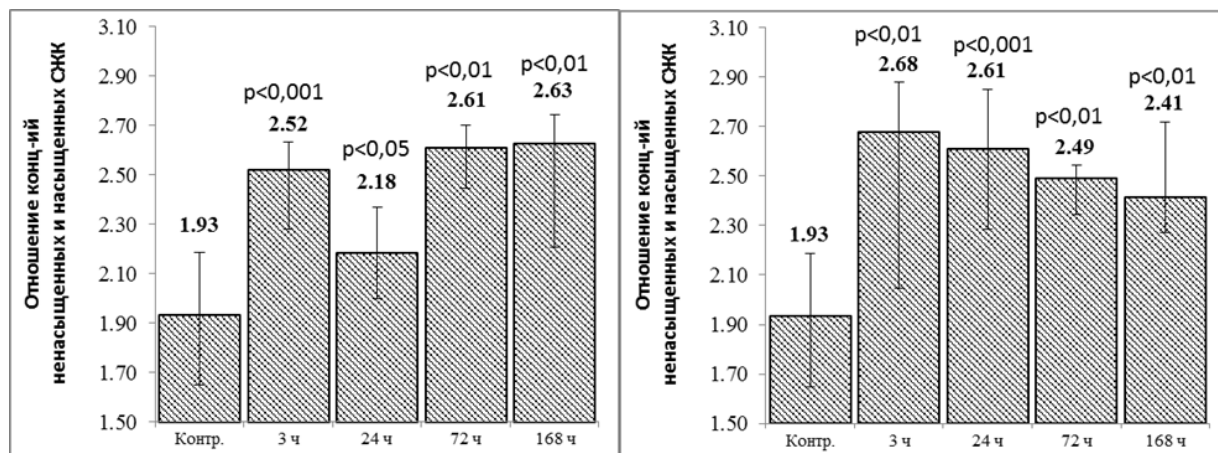


Рисунок 54 – Изменение содержания ненасыщенных кислот по отношению к общей концентрации СЖК после введения RVX без антидота (слева) и с карбоксимом (справа)

При этом терапия карбоксимом не влияет на увеличение доли ненасыщенных кислот по крайней мере в течение 7 дней. Таким образом, отношения концентраций ненасыщенных и насыщенных СЖК являются чувствительным биомаркером эффекта RVX даже в условиях антидотной терапии.

3.6.2. Изменения метаболических профилей головного мозга и печени крыс при хронической интоксикации алифатическими углеводородами C₆-C₁₀

В данном разделе приведены результаты исследования хронического ингаляционного воздействия низких концентраций алифатических углеводородов на профили свободных и этерифицированных жирных кислот, а также метаболические профили низкомолекулярных соединений головного мозга и печени крыс.

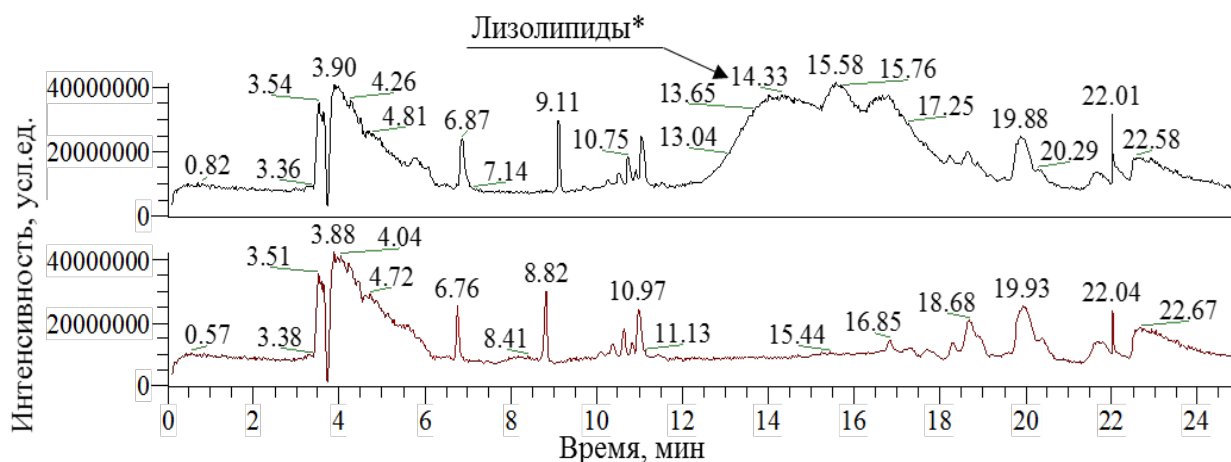


Рисунок 55 — Масс-хроматограммы экстрактов из гомогенатов головного мозга крыс, полученные методом ВЭЖХ-МС с регистрацией отрицательно заряженных ионов. Вверху хроматограмма образца, полученного из группы экспонированной высокой дозой УВ, внизу — контрольной группы

На рисунке 55 приведены масс-хроматограммы экстрактов из гомогенатов головного мозга крыс, полученные методом ВЭЖХ-МС в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов [486]. Хроматографический пик на рисунке 61 в области времен удерживания от 12 до 18 мин в основном обусловлен повышением содержания ЛФЭ(18:0), ЛФЭ(20:0), ЛФХ(20:5), Цер(20:1/d18:2) и Цер(18:0/d18:1) в экстрактах из образцов головного мозга крыс, экспонированных высокой дозой УВ.

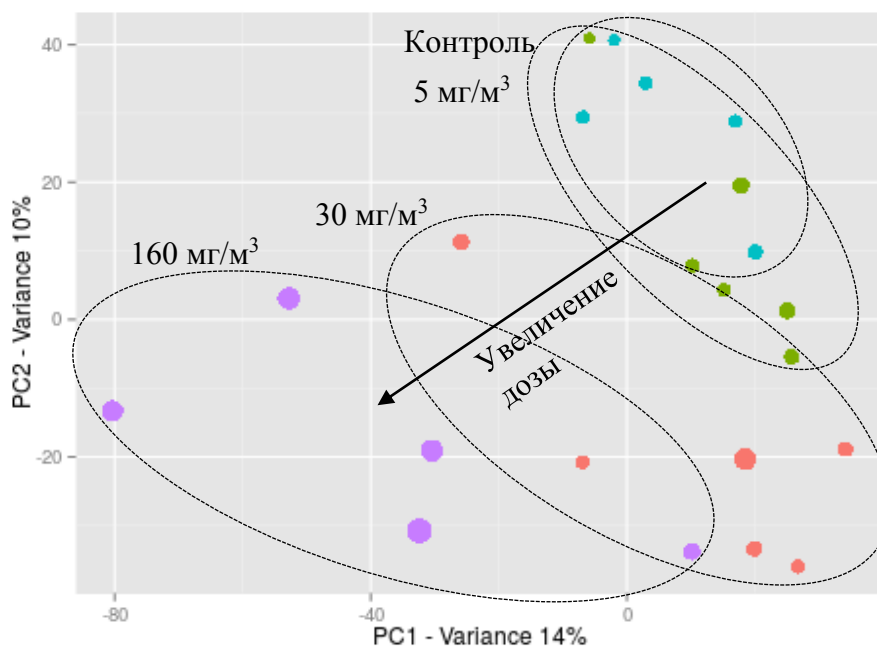


Рисунок 56 — График "счетов" старших главных компонент, построенный методом PLS-DA по результатам метаболического профилирования методом ВЭЖХ-МС

На рисунке 56 приведен результат PLS-DA анализа данных, полученных при метаболическом профилировании образцов гомогенатов головного мозга крыс четырех групп методом ВЭЖХ-МС. Каждая точка представляет собой один метаболический профиль в координатах главных компонент. Овалами выделены метаболические профили одной группы животных. Выявлены дозозависимые изменения метаболических профилей у животных, экспонированных различными дозами УВ.

Валидация построенной PLS-DA модели с помощью перестановочного теста ($n = 20$) показала, что достоверно отличить от контрольной можно только группу животных, экспонированных концентрацией 160 мг/м^3 . В таблице 73 приведены результаты выявления биомаркеров эффекта различных концентраций УВ C_6 - C_{10} . В таблице приведены отношения площадей хроматографических пиков на масс-хроматограммах образцов крыс различных групп, а также использованные инструментальные методы.

При регистрации положительно заряженных ионов методом ВЭЖХ-МС гомогенатов головного мозга крыс выявлена аналогичная картина дозозависимого изменения метаболического профиля.

Нецелевое профилирование образцов гомогенатов головного мозга методом ВЭЖХ позволило выявить значительное увеличение концентрации монозамещенных фосфолипидов. Выявлено увеличение концентрации монозамещенных фосфатидилхолинов и фосфатидилэтаноламинов, также уменьшение концентрации сфингомиелина 16:1. Методом ГХ-МС во всех группах выявлено дозозависимое уменьшение концентрации глицерол-3-фосфата.

Таблица 73 — Результаты выявления биомаркеров эффекта смеси УВ С₆-С₁₀

S _i /S _{контр} ¹			Соединение	Метод
160 мг/м ³	30 мг/м ³	5 мг/м ³		
Головной мозг				
+535.3**	- ²	-	ЛФХ(18:1) ³	HPLC ESI+
+92.0**	+2.4	-	ЛФЭ(20:0)	HPLC ESI-
-91.6**	-	-	СМ(16:0)	HPLC ESI+
-61.0**	-36.8**	-3.1	ФЭ(38:6)	HPLC ESI+
+50.1**	-	-	ЛФХ(18:2)	HPLC ESI+
+39.6**	+16.5	-	ФЭ(38:4)	HPLC ESI+
+25.4**	-	-	ЛФХ(20:5)	HPLC ESI+
+11.4**	-	-	ЛФЭ(18:0)	HPLC ESI-
+10.5	-	-	Цер(20:1/d18:2)	HPLC ESI-
+10.4**	-	-	ЛФХ(18:0)	HPLC ESI+
-5.7**	-2.0*	-1.4	Глицерол-3-фосфат	GC EI+
+3.1	+2.8	-	2-гидроксикаприловая кислота	HPLC ESI-
+2.5	+2.3	-	Субериновая кислота	HPLC ESI-
+1.5	-	-	ФИ(36:2)	HPLC ESI-
+1.5	-	-	Цер(18:0/d18:1)	HPLC ESI-
+1.3	+1.2	-	Тимин	HPLC ESI+
+1.3	-	-	ФИ(34:2)	HPLC ESI-
Печень				
+11.0	+5.0	+2.1	Фумаровая кислота	GC EI+
+9.6	-	-	Инозитол	GC EI+
+1.2	+1.1	-	9-HODE	HPLC ESI-

Примечание: ¹ — Отношение площадей хроматографических пиков в *i*-ой и контрольной группах. Для иллюстрации добавлен знак: "+" — концентрация в группе выше, чем в контрольной в *X* раз, "-" — концентрация в первой группе меньше. * — значение $p < 0.01$; ** — значение $p < 0.001$. ² — статистически значимые изменения отсутствуют. ³ — общепринятое краткое обозначение липидов: ФЭ — фосфатидилэтаноламины, ЛФЭ — лизофосфатидилэтаноламины, ЛФХ — лизофосфатидилхолины, ФИ — фосфатидилинозитолы, СМ — сфингомиелины, Цер — церамиды. В скобках указаны количество атомов углерода в ацильных остатках и количество двойных связей C=C.

В гомогенатах печени в группе экспонированной концентрацией 160 мг/м³ методом ГХ-МС выявлено увеличение концентрации свободного инозитола и накопление фумаровой кислоты.

Выявлены некоторые признаки перекисного окисления липидов, в частности, присутствие гидроксиоктадекадиеновой кислоты (9-HODE).

Для количественной оценки изменений профилей липидов в образцах гомогенатов, в них были определены СЖК и ЭЖК. Разработанная методика измерения концентраций ЭЖК позволяет определять суммарное содержание ЖК, входящих в виде ацильных функциональных групп в различные липиды, в частности эфиры холестерина, триглицериды и фосфолипиды [487].

В таблицах 74 и 75 приведены результаты измерений концентраций СЖК и ЭЖК в образцах головного мозга и печени крыс при хроническом ингаляционном воздействии различных доз УВ.

Таблица 74 — Результаты измерений концентраций СЖК и ЭЖК в печени крыс при хроническом ингаляционном воздействии различных доз УВ

Группа	Суммарная концентрация СЖК, мкг/мг образца	Суммарная концентрация ЭЖК, мкг/мг образца	PUFA/SFA (СЖК)	PUFA/SFA (ЭЖК)
Контроль	1.05 (0.5; 1.8)	74.4 (63.3; 83.3)	0.51 (0.48; 0.53)	0.43 (0.41; 0.45)
160 мг/м ³	0.37* (0.3; 0.4)	72.2 (46.2; 100.0)	0.46 (0.34; 0.57)	0.38* (0.36; 0.40)
30 мг/м ³	1.11 (1.1; 1.2)	59.5 (46.7; 66.0)	0.64 (0.60; 0.70)	0.42 (0.37; 0.46)
5 мг/м ³	1.10 (0.7; 1.7)	79.4 (65.3; 100.6)	0.66 (0.57; 0.75)	0.42 (0.39; 0.45)

Примечание: * — достоверные различия по сравнению с контрольной группой ($p < 0.05$).

Таблица 75 — Результаты измерений концентраций СЖК и ЭЖК в головном мозге крыс при хроническом ингаляционном воздействии различных доз УВ

Группа	Суммарная концентрация СЖК, мкг/мг образца	Суммарная концентрация ЭЖК, мкг/мг образца	PUFA/SFA (СЖК)	PUFA/SFA (ЭЖК)
Контроль	4.6 (4.2; 4.9)	170.5 (103.8; 207.4)	0.47 (0.44; 0.51)	0.33 (0.27; 0.37)
160 мг/м ³	4.6 (2.9; 6.6)	95.8* (44.0; 141.5)	0.46 (0.43; 0.48)	0.38 (0.36; 0.40)
30 мг/м ³	3.2 (2.1; 5.5)	136.5 (88.8; 184.5)	0.46 (0.43; 0.49)	0.34 (0.32; 0.35)
5 мг/м ³	5.0 (4.6; 5.7)	153.5 (75.2; 210.6)	0.48 (0.46; 0.50)	0.35 (0.32; 0.36)

Примечание: * — достоверные различия по сравнению с контрольной группой ($p < 0.05$).

Помимо суммарных концентраций ЭЖК и СЖК, приведены относительные величины массовых долей полиненасыщенных жирных кислот в общем содержании свободных или этерифицированных ЖК. Результаты представлены как медиана (5%; 95% перцентиль).

Так как содержание глицерофосфохолина (ГФХ) и глицерофосфоэтаноламина (ГФЭ) в головном мозге и плазме крови значимо не различаются при экспонировании различными концентрациями УВ, можно вычислить относительное содержание ЛФХ и ЛФЭ при отнесении их концентраций к концентрации ГФХ и ГФЭ, соответственно (см. таблицы 76 и 77).

В экстрактах из гомогенатов головного мозга крыс обнаружено статистически значимое снижение концентраций этерифицированных жирных кислот [487] при воздействии концентрации УВ 160 мг/м³.

Нами установлено, что повышение концентрации ЛФХ в мозге сопровождается статистически значимым уменьшением концентрации глицерол-3-фосфата (таблица 77) и не сопровождается изменениями концентраций глицерофосфохолина, глицерофосфоэтаноламина, холина, ацетилхолина или лизофосфатидиновой кислоты.

Таблица 76 — Концентрации лизофосфатидилхолинов, отнесенные к концентрации глицерофосфохолина в головном мозге и плазме крови крыс при хроническом ингаляционном воздействии различных доз УВ

Группа	Головной мозг		
	ЛФХ(18:1)/ГФХ**	ЛФХ(18:2)/ГФХ	ЛФХ(18:0)/ГФХ
Контроль	0.2 (0.1; 0.3)	0.15 (0.06; 0.18)	5.7 (4.0; 7.4)
160 мг/м ³	111.4* (2.2; 441.5)	3.65* (0.11; 10.25)	90.4* (4.6; 235.2)
30 мг/м ³	0.4 (0.1; 0.7)	0.14(0.01; 0.26)	9.5 (3.4; 19.5)
5 мг/м ³	0.6 (0.2; 0.8)	0.12(0.02; 0.29)	8.7(3.7; 15.3)
	Плазма крови		
Контроль	2.3 (1.7; 3.3)	16.4 (12.5; 20.4)	1.2 (0.9; 1.5)
160 мг/м ³	8.1* (4.2; 11.9)	64.4* (44.3; 100.9)	3.4* (2.4; 4.5)
30 мг/м ³	4.7 (1.6; 9.4)	45.3 (7.2; 71.8)	1.6 (0.9; 3.1)
5 мг/м ³	3.4 (2.7; 4.3)	33.8 (13.6; 41.5)	1.6 (0.3; 2.8)

Примечание: * — достоверные различия по сравнению с контрольной группой ($p < 0.05$); ** — отношение площадей хроматографических пиков.

В группу липидов головного мозга входят фосфоглицериды, холестерин, сфингомиелины, цереброзиды, ганглиозиды и многие другие. В сером веществе головного мозга фосфоглицериды составляют более 60% от всех липидов, а в белом веществе — около 40%. Напротив, в белом веществе содержание холестерина, сфингомиелинов и особенно цереброзидов больше, чем в сером веществе.

Таблица 77 — Концентрации лизофосфатидилэтаноламинов, отнесенные к концентрации глицерофосфоэтаноламина в головном мозге и плазме крови крыс при хроническом ингаляционном воздействии различных доз УВ

Группа	Головной мозг	
	ЛФЭ(18:0)/ГФЭ	ЛФЭ(20:0)/ГФЭ
Контроль	14.3 (8.4; 18.3)	2.7 (2.0; 3.9)
160 мг/м ³	335.6* (128.2; 511.8)	341.0* (121.0; 526.7)
30 мг/м ³	12.7 (7.7; 16.6)	10.2* (6.0; 20.1)
5 мг/м ³	16.6(12.4; 21.6)	3.4(2.0; 5.8)
	Плазма крови	
Контроль	24.1 (15.4; 30.4)	65.9 (8.6; 133.0)
160 мг/м ³	288.1* (240.7; 339.2)	218.9* (211.6; 231.4)
30 мг/м ³	19.1 (12.2; 24.0)	61.3 (8.0; 123.7)
5 мг/м ³	27.3 (17.4; 34.4)	74.3 (9.7; 150.0)

Примечание: * — достоверные различия по сравнению с контрольной группой ($p < 0.05$).

Существует небольшое число работ, в которых описано воздействие УВ на состав липидов мозга, в частности в работе [488] показано, что нейропатия, вызванная воздействием 2,5-гександиона и 2,5-гександиола, приводит к изменению состава липидов мозга и седалищного нерва крыс. Выявлено уменьшение веса мозга по сравнению с контрольной группой (на 20%), селезенки и тимуса, а также ингибирование биосинтеза стерола 2,5-гександионом [489]. Нарушения метаболизма холестерина могут приводить к изменению текучести мембран нервов, изменять влияние АТФаз и потенциально приводить к различным проявлениям нейротоксичности [490], однако корреляция между ингибированием стерологенеза и развитием периферической нейропатии не установлена.

Нами выявлено уменьшение относительной концентрации ненасыщенных жирных кислот в печени, что является индикатором вязкости клеточных мембран [491]. В качестве маркера текучести мембран мы использовали отношение концентраций ПНЖК в общем пуле ЖК, при этом уменьшение числа ПНЖК отражает уменьшение текучести клеточных мембран [492] и, соответственно, увеличение их проницаемости для воды и других малых гидрофильных молекул. Также известно о влиянии ПНЖК на активность транспортеров в клетках печени [493].

Текущность мембран зависит от липидного состава и температуры окружающей среды. С увеличением содержания ненасыщенных жирных кислот текучесть возрастает, так как наличие двойных связей способствует нарушению полукристаллической мембранной структуры. Известно, что активные формы кислорода (АФК), например, пероксид водорода, способны уменьшать текучесть мембран и увеличивать их проницаемость в опытах *in vitro* [494]. Оксидативный стресс и увеличение концентрации АФК приводит к уменьшению текучести мембран, что, вероятно, является одним из поражающих факторов АФК [495]. УВ не способны сами по себе образовывать свободные радикалы, однако могут быть вовлечены в механизм возникновения оксидативного стресса опосредованно. Так, показано, что экспонирование гексаном (см. [496,497]) приводит к избыточному образованию пероксида водорода и малонодиальдегида.

Возможное уменьшение текучести клеточных мембран в печени может вносить вклад в потерю целостности мембран [498]: в ходе морфологических исследований тканей печени в группе подвергавшейся экспонированию УВ с концентрацией 160 мг/м³ выявлена вакуолизация гепатоцитов.

Можно предположить, что выявленное изменение содержания ПНЖК в печени способствует процессам перекисного окисления липидов. Воздействие АФК на ПНЖК и состав ЖК вызывает изменения в мембранах клеток [499]. Косвенным подтверждением гипотезы об окислении липидов в печени может служить некоторое повышение уровней 9-HODE в экстрактах.

Выявленное статистически значимое уменьшение СЖК в печени не удалось объяснить привлечением литературных примеров, так как различные гепатотоксичные соединения обычно вызывают увеличение, а не уменьшение концентраций СЖК в печени, например, ацетаминофен [500] и CCl_4 [501]. С другой стороны, при этом, исследователи выявляли изменения классических маркеров гепатотоксичности — АСТ и АЛТ, уровень которых значимо не изменился в ходе нашего эксперимента. Следовательно, можно предположить, что выявленное уменьшение концентрации СЖК не связано с гепатотоксическим воздействием углеводов.

Наиболее впечатляющим результатом, полученным в ходе исследования хронического влияния низких концентраций УВ на метаболические профили крыс, является выявленное значительное повышение концентрации лизофосфолипидов в экстракте из головного мозга. Данный эффект в основном обусловлен значительным возрастанием концентраций одного лизофосфатидилэтаноламина ЛФЭ(20:0) и четырех лизофосфатидилхолинов: ЛФХ(18:0), ЛФХ(18:1), ЛФХ(18:2) и ЛФХ(20:5). Необходимо отметить, что определение ди- и триглицеридов использованными методами невозможно. Изменений в фосфатидилхолинах, фосфатидилсеринах и эфирах холестерина не выявлено, а в фосфатидилэтаноламинах изменения разнонаправлены.

Повышение концентрации лизофосфолипидов должно приводить к уменьшению количества ацильных групп в липидах (концентрация ЭЖК). Так как использованный метод ВЭЖХ-МС не количественный, можно предположить, что реальное уменьшение содержания жирнокислотных остатков в экстракте из гомогената головного мозга соответствует двукратному уменьшению, выявленному при количественной оценке концентрации ЭЖК.

Изменение содержания различных липидов могут быть связаны с патологическими процессами в мозге [502]. Фосфолипиды — это основные липиды клеточных мембран, и изменения в их метаболизме в нервной системе могут наблюдаться при различных воздействиях, например, при хроническом воздействии этанола [503]. Фосфолипиды клеточных мембран участвуют в клеточных ответах на различные внешние стимулы. ФХ — один из основных фосфолипидов мембран эукариотических клеток, он составляет приблизительно 11% от общей сухой массы липидов головного мозга крыс, ФЭ — 17%, СМ — 3%, ФС — 7%, ФИ — 1% и плазмалогены — 14% [504]. Обнаруженные нами лизофосфатидилхолины представляют собой продукт частичного гидролиза ФХ. Дальнейший гидролиз приводит к образованию глицерофосфохолина и глицерол-3-фосфата. Принципиальная схема синтеза и распада ФХ приведена на рисунке 57.

Высокое содержание лизофосфолипидов может являться маркером деструкции клеточных мембран, что является характерной особенностью нейродегенерации при острых или хронических неврологических заболеваниях [505]. При болезни Альцгеймера происходит увеличение соотношения уровня ЛФХ к уровню глицерофосфохолина, из которого образуется ЛФХ под действием внутриклеточной фосфолипазы А2, внеклеточных лецитинхолестеролацилтрансферазы

и/или фосфолипазы A1 [506,507]. Аутоаксин (внеклеточная фосфолипаза/эктонуклеотидпирофосфатаза/фосфодиэстераза-2) превращает лизофосфатидилхолин в лизофосфатиновую кислоту [507].

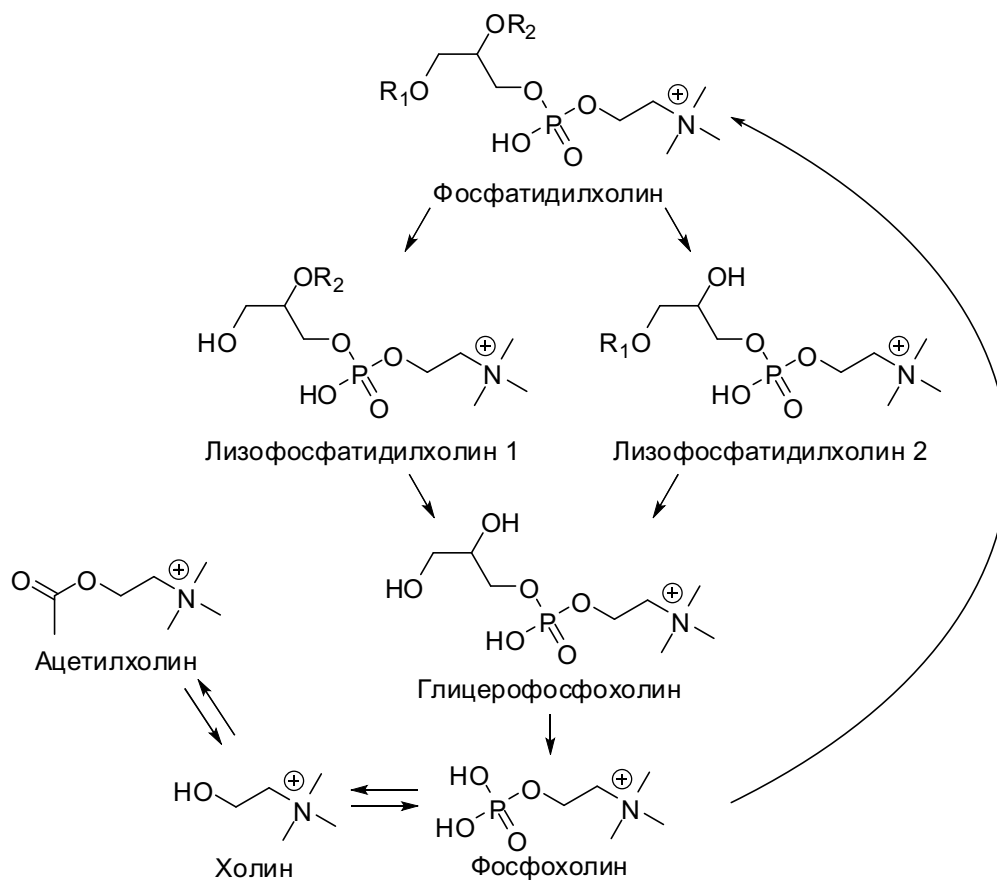


Рисунок 57 — Биосинтез и распад ФХ. ФХ распадается на СЖК и ЛФХ, который, в свою очередь, может образовывать СЖК и ГФХ. Затем он гидролизуется либо до холина, либо до фосфохолина. R₁ и R₂ — ацильные группы

Эти данные свидетельствуют, с одной стороны, о сходстве выявленных изменений с теми, что описаны при болезни Альцгеймера, с другой стороны, позволяют предположить снижение активности аутокарина в качестве фактора, обуславливающего повышенный уровень ЛФХ. Желчные кислоты могут выступать неконкурентными ингибиторами аутокарина [508]. Поскольку одним из продуктов активности аутокарина является пирофосфат, особый интерес представляет более глубокое исследование возможных причин выявленного нами повышения концентрации пирофосфата и коэффициента гидроксирования желчи в крови животных, экспонированных УВ [12].

Известны два типа процессов деструкции мембран: энзиматическое расщепление небольшого числа фосфолипидов для синтеза мессенджеров [509] и патологическое разрушение, связанное с нарушением клеточного гомеостаза и гибелью клеток. Массовый гидролиз фосфолипидов приводит не только к образованию большого числа биологически активных соединений, но

и меняет проницаемость клеточных мембран [510], в результате чего, клетка может начать терять калий или АТФ из цитозоля или пропускать натрий и кальций, которые находятся в значительно большей концентрации в межклеточном пространстве. ЛФХ участвуют в процессе апоптоза клеток [511], они стимулируют фагоцитоз миелиновой оболочки и могут изменять свойства поверхности эритроцитов [512]. Стоит отметить, что ЛФХ являются прекурсорами для синтеза фактора активации тромбоцитов [513]. В крови у курящих людей концентрации ЛФХ выше, чем у некурящих [514].

Высвобождение СЖК при гидролизе фосфолипидов в мозге в результате ишемии или конвульсий обнаружено достаточно давно [515], тем не менее, в ходе исследования мы не обнаружили статистически значимого увеличения концентрации СЖК в мозге крыс. В то же время, выявленное нами увеличение концентрации насыщенных и уменьшение концентрации ненасыщенных ЖК описано в ряде случаев болезни Альцгеймера [516].

В образцах плазмы крови крыс мы не определяли уровень СЖК и ЭЖК, однако выявили, что отношение концентраций ЛФХ(18:1) и ГФХ в гомогенате головного мозга увеличивается более чем в 500 раз, по сравнению с контрольной группой, в плазме крови при этом выявлено статистически значимое увеличение данного индекса в 3.5 раза. По-видимому, гидролиз фосфолипидов приводит к повышению гидрофильности молекул и, как следствие, повышению их концентрации в системном кровотоке. Следовательно, концентрации лизофосфолипидов в плазме крови могут служить маркером процессов, происходящих в головном мозге. Аналогичные процессы были выявлены у пациентов с множественным склерозом (увеличение концентрации ЛФХ в плазме крови) [517].

Изменения отношений концентраций ЛФХ(18:1) и ГФХ в плазме крови носят строгий дозозависимый характер, коэффициент корреляции Пирсона составляет 0.97. Тем не менее, только концентрация УВ 160 мг/м^3 вызывает статистически значимые изменения.

Отношение концентраций ЛФХ с другими ацильными группами, а именно стеариновой и суммой изомеров линолевой кислоты, увеличивается при экспонировании УВ с концентрацией 160 мг/м^3 в 15.8 и 24.3 раза соответственно. В плазме крови при этом увеличение составило 2.8 и 3.9 раза, соответственно.

Стоит отметить, что мы наблюдали изменения концентраций ЛФЭ, содержащих в качестве ацильных групп только насыщенные жирные кислоты: стеариновую и арахидиновую (18:0 и 20:0). Изменения их концентраций, отнесенные к концентрации ГФХ, изменились по сравнению с контрольной группой в 23.4 и 126.2 раза, соответственно. Концентрации ЛФЭ с ненасыщенными жирными кислотами не изменялись.

Таким образом, помимо общих признаков с известными нейродегенеративными заболеваниями человека, выявлен ряд отличий, что может быть обусловлено как спецификой токсического фактора, так и видовыми особенностями.

Высокое содержание лизофосфолипидов может свидетельствовать о деструкции клеточных мембран и развитии нейродегенеративных заболеваний. Повышение концентрации ЛФХ в мозге крыс сопровождается статистически значимым уменьшением уровня глицерол-3-фосфата и не сопровождается изменениями концентраций глицерофосфохолина, холина, ацетилхолина, СЖК или лизофосфатидной кислоты.

Содержание ЭЖК в экстрактах из гомогената мозга крыс, экспонированных концентрацией УВ 160 мг/м³, снижено в два раза по сравнению с контрольной группой. Высокое содержание ЛФХ в головном мозге крыс, экспонированных концентрацией УВ 160 мг/м³, приводит к повышению концентрации ЛФХ в системном кровотоке. Таким образом, можно предположить, что концентрация ЛФХ в крови потенциально может отражать воздействие смеси УВ С₆-С₁₀ на липидный состав мозга.

3.6.3. Обнаружение и идентификация биомаркеров эффекта смеси алифатических углеводородов С₆-С₁₀

В данном разделе рассмотрены результаты определения новых биомаркеров эффекта УВ, а также новые сведения о возможном механизме их токсического действия. Получены данные, которые существенно дополняют известные результаты биохимических и протеомных исследований сведениями о влиянии УВ на метаболитом [313].

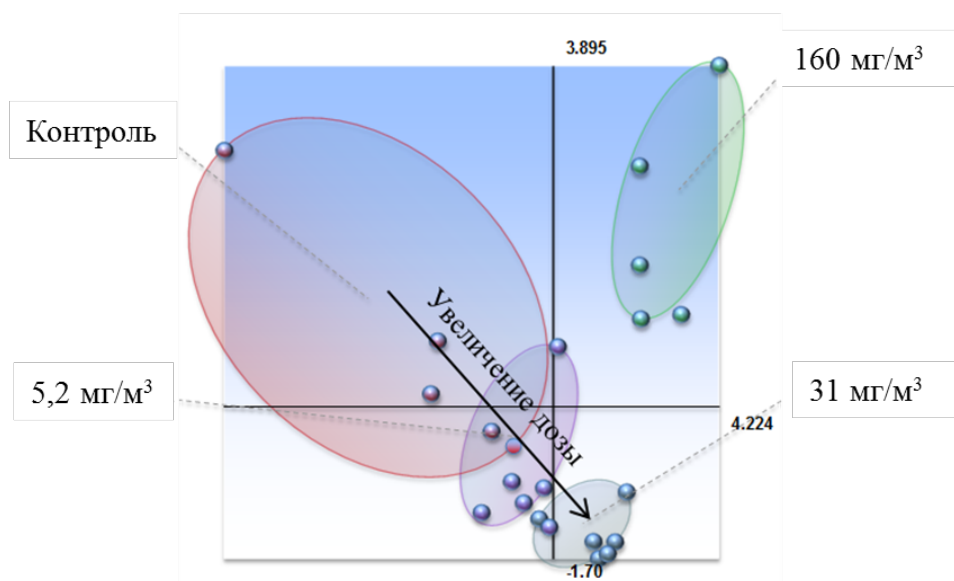


Рисунок 58 — График "счетов" старших главных компонент, построенный методом PLS-DA по результатам метаболического профилирования образцов плазмы крови после экспонирования различными концентрациями УВ С₆-С₁₀

Таблица 78 — Результаты выявления биомаркеров эффекта смеси УВ C₆-C₁₀ в крови

S _i /S _{контр} ¹			Биомаркер	Метод
160 мг/м ³	30 мг/м ³	5 мг/м ³		
Маркеры воздействия на печень				
-4.0	-1.9	-	Глицерол-3-фосфат*	GC EI+
-1.4	-	-	Глицерол-2-фосфат	GC EI+
-4.9	-	-	Инозитол	GC EI+
+1.6	-	-	Холестерол	GC EI+
+4.2	-	-	β-Ситостерол	GC EI+
-1.9	-1.4	-1.2	Пировиноградная кислота	GC EI+
-1.6	-1.5	-	Молочная кислота	GC EI+
-2.2	-1.3	-	2-Гидроксимасляная кислота	GC EI+
-2.0	-1.4	-	Оксопролин	GC EI+
-1.7	-	-	Глицериновая кислота	GC EI+
-1.2	-	-	3-фосфоглицерат	GC EI+
+5.2	- ²	-	Гипотаурин**	HPLC ESI-
+4.6	-	-	Таурохолевая кислота	HPLC ESI-
-2.7	-	-	Гликохолевая кислота**	HPLC ESI-
-3.1	-	-	Хенодезоксихолевая кислота	HPLC ESI-
+2.0	-	-	5-Метилтиоаденозин	HPLC ESI-
+1.6	-	-	Креатин	HPLC ESI+
-1.6	-1.4	-	Инозитолтрифосфат	HPLC ESI+
-1.6	-	-	Глутатион	HPLC ESI+
+1.4	-	-	4-Гуанидинобутанамид	HPLC ESI+
+3.0	-	-	4-Гуанидинобутаноат	HPLC ESI+
-2.7	-	-	Орнитин	HPLC ESI+
+1.8	-	-	N-ацетиламинобутаналь	HPLC ESI+
Маркеры воздействия на почки				
-10.4	-1.5	-1.2	Щавелевая кислота	GC EI+
+4.8	+1.5	-	Тригидроксивитамин D3	HPLC ESI-
Маркеры общей или неустановленной токсичности				
-2.2	-1.2	-	Фенилаланин	GC EI+
+48.2	+8.5	-	Пирофосфорная кислота**	GC EI+
-2.5	-	-	Гликолевая кислота	GC EI+
-9.5	-	-	L-аспарагин	GC EI+
+3.5	-	-	Фенилпируват	HPLC ESI-
+5.7	-	-	S-глутарилдигидролипоиллизин**	HPLC ESI-
+4.2	+1.2	-	Урокортизол	HPLC ESI-
+2.2	-	-	2-арахидоноил-лизофосфатидиновая к-та	HPLC ESI-
+2.1	-	-	2-Оксоадипат**	HPLC ESI+
-2.1	-	-	Глутамат	HPLC ESI+

Примечание: ¹ — Отношение площадей хроматографических пиков в *i*-ой и контрольной группах. Для иллюстрации добавлен знак: "+" — концентрация в группе выше, чем в контрольной в Храз, "-" — концентрация в первой группе меньше. * — значение $p < 0.005$; ** — значение $p < 0.001$. ² — статистически значимые изменения отсутствуют.

На рисунке 58 приведен результат PLS-DA анализа данных, полученных при метаболическом профилировании образцов плазмы крови крыс четырех групп методом ГХ-МС. Каждая

точка представляет собой один метаболический профиль в координатах главных компонент. Овыми выделены метаболические профили одной группы животных. Выявлены дозозависимые изменения метаболического профиля у животных, экспонированных концентрациями УВ 30 и 5 мг/м³, в группе, экспонированной 160 мг/м³ при этом выявлены существенные отличия.

Валидация построенной PLS-DA модели с помощью перестановочного теста (n = 20) показала, что достоверно отличить от контрольной можно только группу 160 мг/м³. В таблице 78 приведены результаты выявления биомаркеров эффекта УВ.

В таблице также приведены отношения площадей хроматографических пиков группы 160 мг/м³ и контрольной, методы определения аналита и предварительное отнесение маркеров к различным группам: маркеры токсического воздействия на печень, почки и пр.

Охарактеризовать и диагностировать воздействие УВ на печень возможно с помощью общеизвестных биохимических маркеров (АЛТ, АСТ и пр.); определение некоторых метаболитов, например, желчных кислот, сопряжено с трудностями методического характера, но в случае преодоления этих трудностей ценность полученных результатов значительно возрастает при изучении и диагностике некоторых форм поражения печени [518].

Кратко описать метаболизм желчных кислот в печени можно следующим образом: первичным субстратом для синтеза желчных кислот является холестерол, который через промежуточный продукт 7 α -гидроксихолестерол (1.14.13.17)⁶ превращается в 7 α -гидроксихолест-4-ен-3-он (1.1.1.181). Дальнейшее превращение последнего возможно по двум метаболическим путям. Один путь — это гидроксилирование метиленовой группы в положении 12 с образованием 4-холестен-7 α , 12 α -диол-3-она, который через длинную цепочку превращений образует холевую кислоту. Другой путь — это образование 7 α -гидрокси-5 β -холестан-3-она (1.3.1.3), который, в свою очередь, превращается в хенодезоксихолевую кислоту.

Полученные нами экспериментальные данные свидетельствуют о воздействии УВ на метаболизм стероидов и желчных кислот. Во-первых, наблюдается ослабление конверсии холестерола, а значительное (в 4.2 раза) повышение концентрации β -ситостерола в крови позволяет предполагать ослабление синтеза дигидротестостерона [519]. Во-вторых, наблюдается смещение баланса между различными путями образования желчных кислот и их конъюгатов в пользу таурохолевой кислоты, при этом ее уровень в крови возрастает в 4.5 раза. Отношение концентраций гликохолевой к таурохолевой кислоте (G/T) — известный показатель метаболизма желчных кислот. Так, в одном из недавних экспериментов было показано, что снижение этого показателя происходит при переходе на т.н. "западную" диету с низким содержанием клетчатки и высоким содержанием рафинированных сахаров, насыщенных молочных и полиненасыщенных ω -6

⁶ Здесь и далее имеются в виду номера ферментов по КФ катализирующих обсуждаемую реакцию.

жиров, что является одной из причин воспалительных заболеваний кишечника (язвенный колит, болезнь Крона и др.) [520]. Интересно отметить, что изменение баланса желчных кислот сопряжено с повышением соотношения грам-отрицательных бактериоидов к грам-положительным фирмикутам в микрофлоре кишечника, в том числе за счет экспансии иммуногенных сульфит-редуцирующих патобионтов. Такая взаимосвязь объясняется тем, что таурохолевая кислота способна солюбилизировать более гидрофобные жиры и, кроме того, обеспечивать доставку серы в составе таурина в дистальные отделы кишечника, где и происходит накопление патогенной микрофлоры.

Соотношение тригидроксихолатов (конъюгаты холевой кислоты) к дигидроксихолатам (конъюгаты хенодезоксихолевой и дезоксихолевой кислот) — другой коэффициент гидроксилирования желчи, повышение которого означает повышение детергентных свойств желчи и способность поддерживать холестерин-содержащие липиды в растворенном состоянии [521]. Снижение уровня хенодезоксихолевой кислоты в 3 раза позволяет предположить повышение данного коэффициента в нашем эксперименте. Известно, что кишечные бактерии метаболизируют первичные хенодезоксихолевую и холевую кислоты во вторичные литохолевую и дезоксихолевую соответственно, причем последняя обладает способностью повреждать ДНК и потому является канцерогеном [522]. Отсюда следуют предположения о дополнительных факторах риска развития онкологических заболеваний.

Кроме того, мы выявили статистически значимое повышение уровня гипотаурина в крови в 5 раз, при этом достоверных изменений уровня таурина в крови не было. Такое изменение баланса нам также представляется очень важным с точки зрения патогенеза некоторых заболеваний нервной системы. Окисление гипотаурина в таурин является лимитирующей стадией в процессе образования таурина, и эта стадия, очевидно, является ферментативной, а не спонтанной, по крайней мере, строго регулируемой, поскольку гипотетическая "гипотаурин дегидрогеназа" до сих пор не выделена в чистом виде [523]. Таурин выполняет несколько функций, среди которых — роль осмолита, особенно важная для нейронов, поскольку регуляция объема возбудимых клеток потоками ионов может привести к нарушению мембранного потенциала [524]. Удержание таурина в клетках нервной системы в гипотонической среде наблюдается при дефиците промежуточных нейрофиламентов [525], т.е. таурин играет важную вспомогательную роль в осморегуляции клеток, и нарушение синтеза таурина может привести к компенсаторному синтезу нейрофиламентов. Кроме того, таурин является аналогом глицина и участвует в глицинэргической передаче [526].

Повышенный уровень гипотаурина и/или повышение индекса гипотаурин/таурин свидетельствует еще и о смещении баланса в процессах утилизации цистеина: активация цистеиндиоксигеназы, наблюдаемая при некоторых интоксикациях или избытке цистеин-содержащего

белка в пищевом рационе, обуславливает дефицит глутатиона, поскольку цистеин является источником как гипотаурина, так и глутатиона [527]. Снижение уровня GSH в плазме крови является косвенным тому подтверждением.

Наибольшие изменения мы выявили в концентрации пирофосфата (PP_i) в плазме крови (увеличение в 48 раз в группе 1), поэтому особый интерес представляет механизм образования и утилизации PP_i . Уровень пирофосфата в плазме крови зависит от активности следующих ферментов и транспортеров: белок прогрессирующего анкилоза (ANK, локализован в мембранах, регулирует транспорт пирофосфата из клеток во внеклеточное пространство) и эктонуклеотид пирофосфатаза фосфодиэстераза (NPP1, локализован в мембранах гладкомышечных и некоторых других клеток, продуцирует пирофосфат путем гидролиза внеклеточного АТФ) обуславливают повышение уровня PP_i в крови, тогда как неспецифический тканевой изофермент щелочной фосфатазы (TNAP, имеется в плазме крови) расщепляет неорганический пирофосфат, способствуя тем самым минерализации костей у детей и сосудов у взрослых; пирофосфат, как известно, блокирует формирование кристаллов гидроксиапатита [528]. Отметим, что среди других субстратов TNAP — пиридоксаль-5'-фосфат (ПЛФ, основная циркулирующая форма витамина B6) и фосфоэтанолламин. TNAP гидролизует ПЛФ, позволяя пиридоксалу проникнуть через гематоэнцефалический барьер, после чего он восстанавливается в ПЛФ. ПЛФ играет важную роль как кофермент декарбоксилазы глутаминовой кислоты, фермента, отвечающего за синтез гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК). С другой стороны, повышенная активность NPP1 отмечена при хондрокальцинозе, остеоартрите и диабете 2 типа [529]. Таким образом, если повышенный уровень пирофосфата обусловлен снижением активности щелочной фосфатазы, можно ожидать нарушения тормозных процессов в ЦНС вследствие дефицита пиридоксальфосфата, тогда как повышенная активность NPP1 в качестве причины роста пирофосфата должна быть сопряжена с хондрокальцинозом, остеоартритом или диабетом 2 типа. Также необходимо учитывать концентрацию фосфата и АТФ в плазме крови. Имеющиеся данные не позволяют выявить причины значительного повышения PP_i в крови, однако анализ возможных механизмов его динамики дает информацию о путях поиска этих причин.

Одной из выявленных особенностей патогенеза интоксикации УВ является нарушение гликолиза и глюконеогенеза. Согласно литературным данным, в печени наблюдается ингибирование глюкозо-6-фосфатазы, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и фосфофруктокиназы. Также выявлено снижение уровня гликолитических ферментов в спинномозговой жидкости [527]. При этом уровень гликогена в печени остается неизменным. Методы нецелевой метаболомики позволяют выявить изменения концентраций в основном промежуточных и конечных продуктов ме-

таболизма. Например, выявленное нами снижение уровней глицерол-3-фосфата, 3-фосфоглицерата, инозитола, пирувата и лактата может служить подтверждением данных о нарушении гликолиза.

Нарушения редокс-гомеостаза сопровождают многие патологические состояния и имеют особое значение при острых химических отравлениях [530]. Многие ксенобиотики индуцируют образование активных форм кислорода (АФК), которые могут участвовать в их биотрансформации. В то же время, некоторые метаболиты обладают свойствами свободных радикалов и оказывают повреждающее действие на клетки организма [531]. УВ не способны сами по себе образовывать свободные радикалы, однако могут быть вовлечены в механизм возникновения оксидативного стресса опосредованно. Так, показано, что экспонирование гексаном приводит к избыточному образованию пероксида водорода и МДА — одного из основных продуктов перекисного окисления липидов.

Снижение уровня глицерол-3-фосфата может свидетельствовать о нарушении в соотношении восстановленной и окисленной форм пиридиновых нуклеотидов в печени, также о нарушении баланса пиридиновых нуклеотидов свидетельствует наблюдаемое понижение уровня α -гидроксибутирата при хроническом воздействии УВ [532]. Снижение уровней α -гидроксибутирата и оксопролина — один из признаков нарушения синтеза глутатиона [533] и снижения способности печени к детоксикации ксенобиотиков. α -Гидроксибутират производится в основном в печени в процессе катаболизма треонина и метионина [534] и является наиболее значимым маркером, обычно ассоциируемым с инсулинорезистентностью.

Некоторое повышение концентраций N-4-ацетиламинобутанала и 4-гуанидинобутаноата в крови, возможно, свидетельствует о воздействии УВ на цикл мочевины. N-4-ацетиламинобутаналь — это интермедиат цикла мочевины и метаболизма аминокислот, продукт моноаминоксидазы (ЕС 1.4.3.4) и субстрат митохондриальной альдегиддегидрогеназы (ЕС 1.2.1.3), он синтезируется из путресцина, т.е. можно сделать вывод о нарушении биосинтеза полиаминов. Изменений в концентрациях самой мочевины и мочевой кислоты при этом не выявлено. Дополнительным подтверждением этой гипотезы является то, что выявлено повышение концентрации 5'-метилтиаденозина, который, по некоторым данным, участвует в ингибировании биосинтеза полиаминов [535]. Таким образом, повышенные уровни 5'-метилтиаденозина и N-4-ацетиламинобутанала, а также пониженный уровень орнитина, подтверждают предположение о нарушении биосинтеза полиаминов.

В почках и кишечнике 1,25-дигидроксивитамин D₃ гидроксيليруется по положению 24, а затем новая гидроксильная группа окисляется до оксогруппы с образованием кальцитроевой кислоты, которая затем выводится с желчью [536]. Образование 1,24,25-тригидроксивитамин D₃ из

предшественника катализирует фермент 24-гидроксилаза (EC 1.14.13.126). 24-гидроксилаза вырабатывается многими типами клеток, однако самая высокая ее активность зафиксирована в почках. 1,25-дигидроксивитамин D3 играет важную роль в регулировании кальциевого гомеостаза и минерализации костей и по некоторым данным может являться маркером онкологических заболеваний [537]. Он также модулирует клеточную пролиферацию. Повышенное содержание 1,24,25-тригидроксивитамина D3 в крови (в 4.8 раза по сравнению с контрольной группой) может свидетельствовать о повышенной активности митохондриального фермента 24-гидроксилазы 1,25-дигидроксивитамина D3 (CYP24A1) [538].

Интересным фактом является 10-кратное снижение уровня щавелевой кислоты в плазме крови. Возможно, воздействие УВ вызывает усиленную экскрецию оксалата с мочей, однако экспериментальных свидетельств этому нет. В то же время, имеются сведения о реципрокной взаимозависимости концентраций оксалата и витамина B6 (пиридоксальфосфат) в плазме крови [539]. Выше, анализируя возможные причины значительного повышения уровня пирофосфата в плазме крови, мы указывали на щелочную фосфатазу, низкая активность которой могла быть одной из таких причин; при этом было отмечено, что ПЛФ (основная циркулирующая форма витамина B6) тоже является субстратом TNAP. Таким образом, имеются дополнительные сведения в пользу того, что сниженное количество и/или активность TNAP — основная причина как значительного повышения уровня пирофосфата, так и значительного снижения уровня оксалата в крови. Однако для подтверждения предположений необходимо получить данные по активности фермента и уровню ПЛФ.

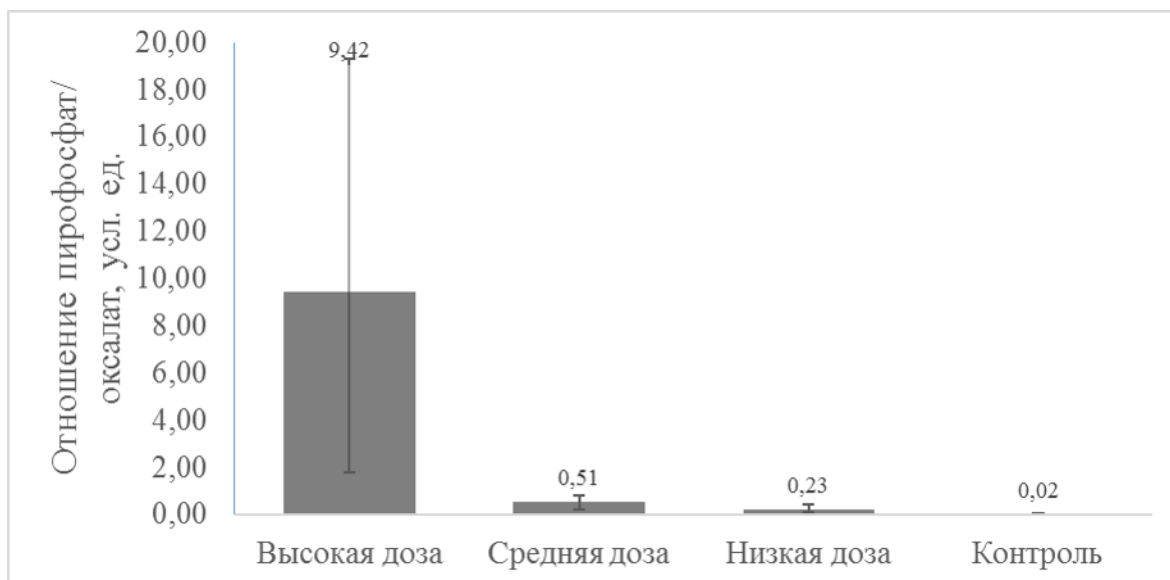


Рисунок 59 — Отношение хроматографических пиков пирофосфорной и щавелевой кислот в различных группах животных

Между тем, на рисунке 59 приведены отношения хроматографических пиков пирофосфорной и щавелевой кислот в различных группах животных. Изменение такого отношения статистически значимо во всех группах животных. Таким образом, на основании первичных данных метаболического анализа мы предлагаем использовать новый высокочувствительный диагностический индекс (рабочее название "пирофосфатный индекс"), который позволяет дифференцировать степень воздействия УВ на организм.

В результате, нами впервые выявлены биомаркеры эффекта низких концентраций алифатических углеводов C_6 - C_{10} . С учетом ранее полученных нами данных [316], подтверждается гипотеза о ковалентном связывании метаболитов углеводов, т.к. в плазме крови крыс выявлен диметилпирролнорлейцин. Выявлено снижение концентраций глицерол-3-фосфата, 3-фосфоглицерата, инозитола, пирувата и лактата в крови. Повышенные уровни 5'-метилтиоаденозина и N-4-ацетиламинобутаналя, пониженный уровень орнитина позволяют сделать предположение о нарушении биосинтеза полиаминов. Хроническое воздействие УВ приводит к накоплению метаболита витамина D3 в крови.

Отмечены нарушения цикла мочевины, снижение синтеза триглицеридов и глицерофосфолипидов, что свидетельствует о снижении функциональной активности печени. При воздействии УВ нарушен метаболизм желчных кислот, в частности, выявлено смещение баланса между различными путями образования желчных кислот в пользу таурохолевой кислоты. Кроме того, снижение уровня хенодесоксихолевой кислоты позволяет предполагать повышение соотношения тригидроксихолатов к дигидроксихолатам, что означает повышение детергентных свойств желчи и способность поддерживать холестерин-содержащие липиды в растворенном состоянии (коэффициент гидроксилирования желчи).

Анализ комплекса возможных причин, наиболее значительных из обнаруженных изменений — 48-кратного повышения PP_1 и 10-кратного снижения уровня щавелевой кислоты в плазме крови — позволил нам предположить снижение активности TNAP как наиболее вероятной причины, лежащей в основе этих изменений, что безусловно нуждается в дополнительной проверке методами клинической и лабораторной биохимии. Тем временем, мы установили, что отношение концентраций пирофосфорной и щавелевой кислот в различных группах животных является наиболее чувствительным биомаркером эффекта, получившим рабочее название "пирофосфатный индекс". Изменения пирофосфатного индекса имеет статистически значимый характер во всех группах животных, даже в группе 3, подвергавшейся экспонированию концентрацией УВ 5 мг/м^3 .

Повышение уровня гипотаурина, возможно, один из ключевых показателей с точки зрения патогенеза некоторых заболеваний нервной системы. Поскольку агрегация и аккумуляция нейрофиламентов является важнейшим признаком токсической полинейропатии, а нейрофиламенты

играют важнейшую роль в осморегуляции, синтез нейрофиламентов может быть компенсаторной реакцией в случае нарушения последней окислительной стадии при образовании таурина. Если нарушение стадии образования таурина в клетках нервной системы при интоксикации УВ подтвердится, применение таурина в качестве нутрицевтика может служить одним из вариантов терапии в случае развития нейропатии или в качестве профилактического средства. Действительно, имеются многочисленные данные о положительных эффектах таурина при нейропатиях различного генеза: таурин восстанавливает кровоток в нервных волокнах, скорость проведения импульса, порог болевой чувствительности и т.д. (см., например, [540]).

Другим возможным способом терапии энцефалопатии при отравлении УВ могут служить соединения, являющиеся донорами сульфгидрильных групп; так, дитиотреитол способен предотвращать агрегацию нейрофиламентов в культуре фибробластов пациентов с гигантской аксональной дегенерацией [541]. Другим примером может служить липоевая кислота: у крыс, получавших липоевую кислоту, моторная дисфункция проявлялась на 3 недели позже, чем у животных, не принимавших липоевую кислоту при непрерывном воздействии 700 ppm гексана в течение 9 недель [542].

Как было сказано выше, повышение индекса гипотаурин/таурин свидетельствует о смещении баланса в процессах утилизации цистеина и обуславливает дефицит глутатиона, поскольку цистеин является источником как гипотаурина, так и глутатиона. С учетом данных об ингибировании SH-содержащих гликолитических ферментов продуктами метаболизма УВ, снижении концентраций глицерол-3-фосфата, α -гидроксипутирата, оксопролина и глутатиона, мы предлагаем "редокс-гипотезу" патогенеза токсической полинейропатии в качестве альтернативы существующей "энергетической гипотезе" [334]. Редокс-гипотеза охватывает не только энергетические аспекты, но и предполагает нарушение сопряжения между энергетическими, сигнальными и метаболическими процессами; в этом смысле она соответствует принципам "ортогональной регуляции" метаболических и сигнальных процессов в клетках [543].

Совокупность биомаркеров эффекта составляет т.н. "сигнатуру токсичности", которая впоследствии может быть использована для выявления экспозиции работников предприятий нефтегазодобывающего и перерабатывающего комплекса и населения прилегающих территорий. Полученные предварительные результаты безусловно нуждаются в количественной оценке с точки зрения селективности (специфичности) и чувствительности обнаруженных биомаркеров как диагностических показателей [13].

3.6.4. Обнаружение и идентификация биомаркеров эффекта смеси алифатических углеводородов C₁-C₅

Для выявления биомаркеров эффекта смеси УВ C₁-C₅ на организм нами было проведено нецелелевое метаболическое профилирование образцов плазмы крови крыс, подвергавшихся экспонированию смесью УВ в течение 90 дней. Метаболические профили образцов плазмы крови крыс были исследованы с использованием сочетания ГХ-МС и ВЭЖХ-МС высокого разрешения. На рисунке 60 приведен результат PLS-DA анализа данных, полученных при метаболическом профилировании образцов плазмы крови крыс четырех групп методом ГХ-МС, на рисунке 61 — методом ВЭЖХ-МС. Каждая точка представляет собой один метаболический профиль в координатах главных компонент. Овалами выделены метаболические профили одной группы животных. Выявлены дозозависимые изменения метаболического профиля у животных, экспонированных средней и низкой концентрациями УВ, в группе экспонированной концентрацией 1250 мг/м³ при этом выявлены существенные отличия.

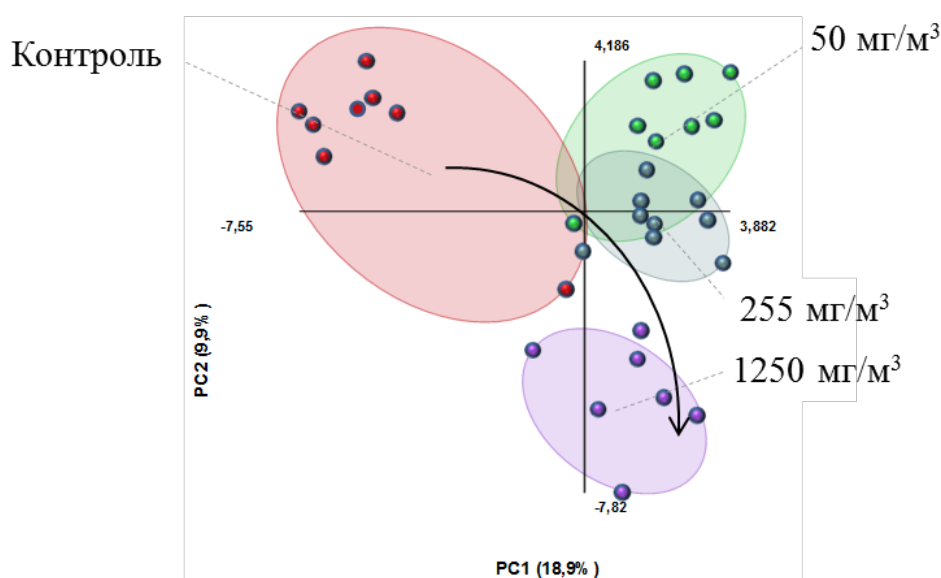


Рисунок 60 — График “счетов” старших главных компонент, построенный методом PLS-DA по результатам метаболического профилирования методом ГХ-МС

Валидация построенной PLS-DA модели с помощью перестановочного теста ($n = 20$) показала, что достоверно отличить от контрольной можно только группу животных, экспонированных концентрацией УВ 1250 мг/м³. В таблице 79 приведены результаты выявления биомаркеров эффекта УВ. В таблице также приведены отношения площадей хроматографических пиков группы 1250 мг/м³ и контрольной, методы определения аналита.

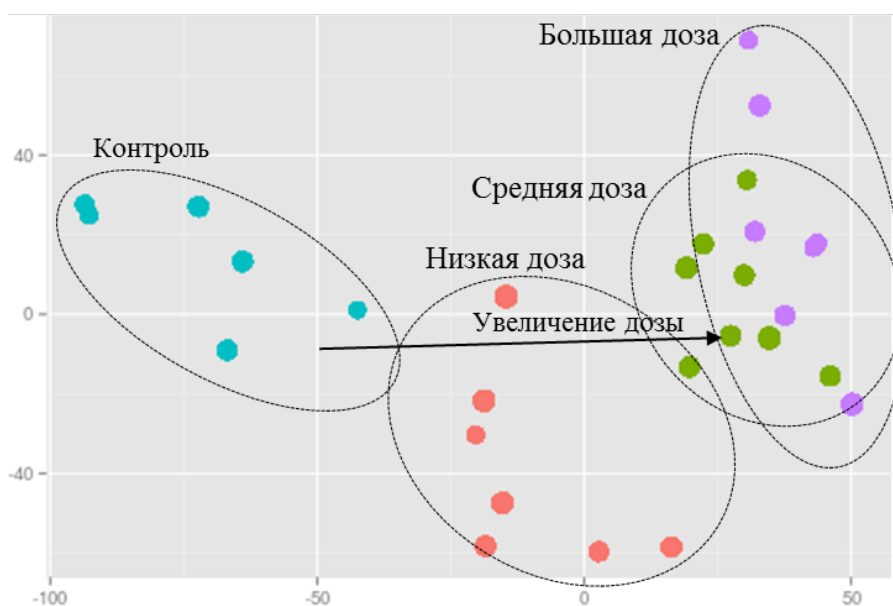


Рисунок 61 — График "счетов" старших главных компонент, построенный методом PLS-DA по результатам метаболического профилирования методом ВЭЖХ-МС

Таблица 79 — Результаты выявления биомаркеров эффекта смеси УВ C₁-C₅

$S_i/S_{\text{контр}}^1$			Соединение	Метод
1250 мг/м ³	250 мг/м ³	50 мг/м ³		
+3.0	-	-	ЛФЭ(18:0) ² тенденция к увеличению	HPLC ESI-
+4.0	-	-	ЛФЭ(18:1) тенденция к увеличению	HPLC ESI-
+1.7	-	-	ЛФЭ(18:2) тенденция к увеличению	HPLC ESI-
+1.5	-	-	ЛФЭ(20:4) тенденция к увеличению	HPLC ESI-
-1.5	-	-	Глицин	GC EI
-2.4	-1.7	-	Глицерол-3-фосфат	GC EI
-2.0	-	-	Инозитол	GC EI

Примечание: ¹ — Отношение площадей хроматографических пиков в первой и контрольной группах. Для иллюстрации добавлен знак: "+" — концентрация в группе выше, чем в контрольной в X раз, "-" — концентрация в первой группе меньше. ² — общепринятое краткое обозначение липидов: ЛФЭ — лизофосфатидилэтанолламины, скобках указаны количество атомов углерода в ацильных остатках и количество двойных связей C=C.

Нецелевое профилирование образцов плазмы крови методом ВЭЖХ позволило выявить незначительное увеличение концентрации монозамещенных фосфолипидов (лизофосфатидилэтанолламинов). Методом ГХ-МС выявлено уменьшение концентрации глицерол-3-фосфата.

Изменений в концентрации лизофосфатидилхолинов в плазме крови не выявлено. В результате установлено, что непрерывное ингаляционное воздействие в течение 90 суток смеси предельных углеводов C₁-C₅ с концентрацией 1250 ± 51.5 мг/м³ приводит к повышению содержания лизофосфатидилэтанолламинов в плазме крови крыс. Выявленное снижение концентрации глицерол-3-фосфата не может получить объяснения без получения

дополнительных данных. Можно предположить, что концентрация ЛФЭ в крови является потенциальным маркером влияния УВ на липидный состав мозга. Воздействие смесей с концентрациями 256 ± 16 мг/м³, 50 ± 6 мг/м³ не приводило к статистически значимым изменениям метаболических профилей, что согласуется с ранее полученными данными об отсутствии накопления метаболитов УВ в этих группах, поэтому такие концентрации можно считать недействующими.

3.6.5. Обнаружение и идентификация биомаркеров эффекта гидроксиламина

В данном разделе приведены результаты метаболического профилирования плазмы крови и мочи лабораторных крыс, подвергавшихся экспонированию различными дозами ГА. Результаты выявления маркеров в моче приведены в таблице 80.

Выявлено повышение уровня гистамина в крови, увеличение концентрации сфингозина и этаноламина. Несмотря на то, что активность лактатдегидрогеназы не отличалась по сравнению с контрольной группой, выявлено значительное уменьшение концентраций 2-кетокислот: 2-кетоизовалериановая кислота, 3-метил-2-кетопентановая кислота, 4-метил-2-кетопентановая кислота.

Таблица 80 — Результаты выявления в моче биомаркеров эффекта раствора ГА при *в/жс* введении крысам-самцам

S _i /S _{контр} *				Соединение
101.6 мг/кг	565 мкг/кг	113.1 мкг/кг	22.6 мкг/кг	
-21.3	-5.1	-3.2	-2.2	3-метил-2-кетопентановая кислота
-10.1	-6.2	-1.8	-**	2-кетоизовалериановая кислота
-8.3	-4.4	-	-	4-метил-2-кетопентановая кислота
-3.9	-	-	-	Пируват
-2.2	-1.5	-	-	N-ацетилсерин
+2.0	+13.1	+4.0	-	Пирофосфорная кислота
+2.7	-	-	-	Сфингозин
+2.8	+10.6	+2.1	-	Никотинамид
+4.2	+26	-	-	Инозитол
+4.5	-	-	-	Этаноламин
+4.8	-	-	-	Гистамин
+4.8	+5.0	+2.3	-	Глицериновая кислота
+6.2	-	-	-	Гидроксифенилпировиноградная кислота
+7.3	+1.2	-	-	Аспарагиновая кислота
+11.1	-	-	-	Гидроксифенилмолочная кислота

Примечание: * — Отношение площадей хроматографических пиков в *i*-ой и контрольной группах. Для иллюстрации добавлен знак: "+" — концентрация в группе выше, чем в контрольной в *X* раз, "-" — концентрация в первой группе меньше; ** — статистически значимых изменений в концентрации не выявлено.

Результаты выявления маркеров в плазме крови не приведены, так как в образцах крови, полученных от крыс, подвергавшихся воздействию средней и низкой дозы ГА, не обнаружено

статистически значимых отклонений в концентрациях метаболитов. В образцах крыс после острого отравления и хронического в высокой дозе выявлены повышенные концентрации никотиновой, пипеколиновой и глицериновой кислот, инозитола. После острого воздействия через 2 часа выявлено увеличение концентрации дигидроксиацетона, которая нормализуется через 24 часа.

Учитывая, что пируватоксим оказался наиболее чувствительным биомаркером эффекта ГА, нами было проведено количественное определение лактата и пирувата в моче крыс для определения возможного влияния на отношение концентраций лактат/пируват. Концентрации молочной и пировиноградной кислот оценивали методом стандартной добавки (см. таблицу 81).

Концентрация пирувата в моче снижается в среднем почти в 4 раза. Точная кинетика процесса не была определена, и изменение концентрации зафиксировано в моче, которую собирали в течение 24 ч после отравления. В уровнях лактата в моче не выявлено статистически значимых изменений.

Таблица 81 — Концентрации молочной и пировиноградной кислот в образцах крови и мочи при в/ж введении раствора ГА крысам-самцам

Образец	Лактат, нг/мл	Пируват, нг/мл	Отношение концентраций лактат/пируват
Моча			
Моча (контроль)	826 ± 496	757 ± 606	1.1 ± 0.5
101.6 мг/кг, 24 ч	1011 ± 758	194 ± 147*	5 ± 2*
565 мкг/кг	730 ± 358	440 ± 123	1.7 ± 0.6*
113.1 мкг/кг	690 ± 393	780 ± 577	0.9 ± 0.5
22.6 мкг/кг	713 ± 428	679 ± 509	1.1 ± 0.5
Плазма крови			
Плазма (контроль)	4558 ± 2598	450 ± 270	10 ± 5
101.6 мг/кг, 2 ч	775 ± 620*	184 ± 147*	4 ± 3*
101.6 мг/кг, 24 ч	2300 ± 1725	997 ± 538	2 ± 1*
565 мкг/кг	4660 ± 1212	539 ± 350	8 ± 2
113.1 мкг/кг	6640 ± 5312	609 ± 158	11 ± 6
22.6 мкг/кг	4540 ± 3950	640 ± 557	7 ± 4

* — $p < 0.05$

В плазме крови при этом выявлено уменьшение концентрации пирувата в 2.5 раза через 2 часа после отравления и превышение нормы (недостовверное) через 24 часа. Стоит отметить, что оксима пирувата в крови через 2 часа после отравления больше, чем самого пирувата приблизительно в 1.5 раза. Концентрация пируватоксима не изменилась в течение 24 часов, в то время как концентрация пирувата увеличилась практически вдвое больше нормы, к сожалению, вариация значений не позволяет сделать вывод о статистической значимости. Интересно отметить, что если в крови суммарное содержание пирувата и пируватоксима через 2 часа после введения ГА приблизительно соответствует исходному уровню пирувата, что вполне укладывается в простое

стехиометрическое соотношение реакции образования оксима, то в моче через 24 часа концентрация пируватоксима в 130 раз превышает концентрацию пирувата. Из этого можно сделать вывод об активной принудительной экскреции пируватоксима из организма.

Концентрация лактата в крови падает почти в 6 раз через 2 часа после отравления и достоверно в 2 раза меньше нормы через 24 часа. Соответственно, отношение концентраций лактат/пируват в крови в период до 24 часов достоверно снижено. Уменьшение концентрации лактата в крови в связи с метгемоглобинемией описано в [544], авторы отмечают, что более низкие уровни лактата у пациентов, получающих метиленовый синий, позволяют предположить, что метиленовый синий увеличивает тонус сосудов без соответствующего увеличения глобальной тканевой перфузии. Концентрации лактата в моче при метгемоглобинемии не описаны.

Таким образом, снижение концентраций пирувата и других 2-кетокислот можно объяснить их химическим связыванием в соответствующие оксимы. При этом активность лактатдегидрогеназы оставалась неизменной во всех группах животных.

Изменения концентрации пирувата и лактата, а также их отношения, имеют статистически значимый характер в образцах, полученных от животных, получавших $\frac{1}{2}DL_{50}$, а также высокую дозу ГА с питьевой водой. Уменьшение концентрации лактата в крови в связи с метгемоглобинемией и описано в [544], концентрации лактата в моче при метгемоглобинемии при этом не описаны.

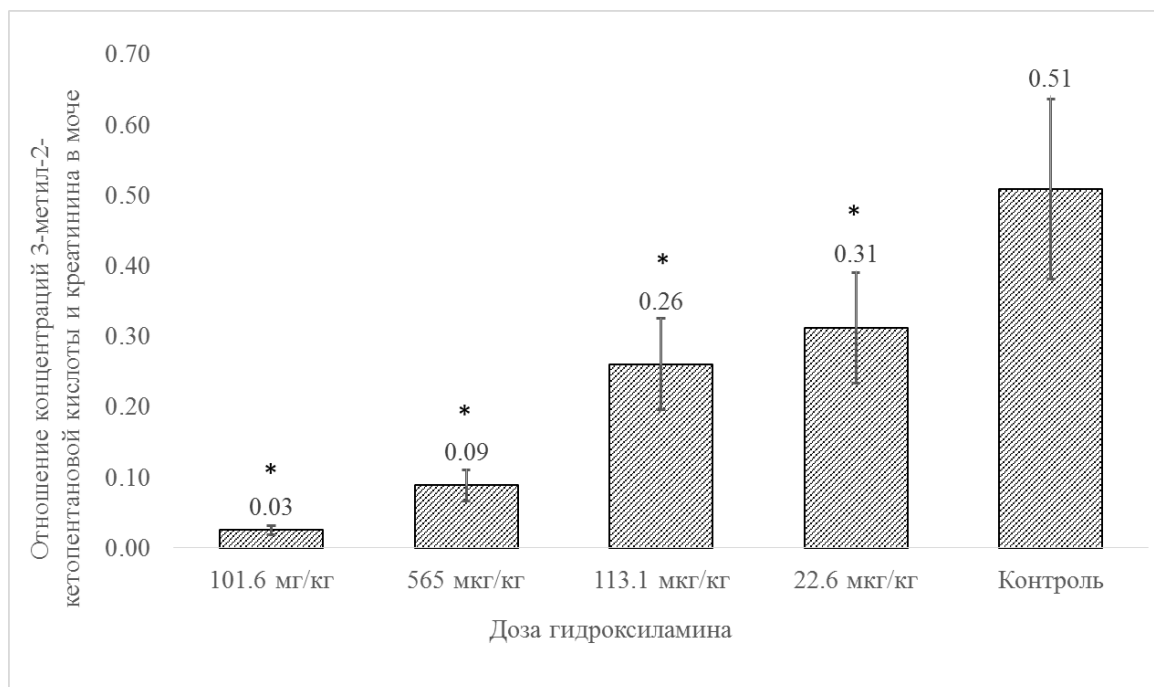


Рисунок 62 — Отношение концентраций 3-метил-2-кетопентановой кислоты и креатинина в моче крыс, экспонированных различными дозами гидроксиламина

Наиболее чувствительными биомаркерами эффекта ГА являются концентрации 2-кетокислот в моче. Отношение концентраций 3-метил-2-кетопентановой кислоты и креатинина остается

сниженным по сравнению с контрольной группой, даже в при низкоуровневом воздействии 22.6 мкг/кг ГА (см. рисунок 62).

Снижение концентрации 2-кетокислот возможно связано с оксимированием пирувата, который является предшественником 2-кетокислот в их биосинтезе.

Сочетание определения биомаркеров экспозиции — пируватоксида и гидроксиламина в моче с определением биомаркеров эффекта (2-кетокислот, а также пирувата и лактата) позволит более точно оценивать полученную дозу или уровень воздействия ГА на организм людей, контактирующих с ним. Стоит отметить, что такое определение возможно объединить в рамки одной методики на газовом хромато-масс-спектрометре.

3.6.6. Обнаружение и идентификация биомаркеров эффекта ДХГФ

Для выявления биомаркеров эффекта ДХГФ при ингаляционном воздействии на организм, нами было проведено нецелевое метаболическое профилирование образцов плазмы крови, подвергавшихся острому и подострому воздействию ДХГФ. Результаты выявления маркеров в моче приведены в таблице 82.

Таблица 82 — Результаты выявления биомаркеров эффекта различных концентраций ДХГФ

Биомаркер	$S_i/S_{\text{контр}}^*$				
	24 ч	0 ч			
	600 мг/м ³	600 мг/м ³	84.4 мг/м ³	18.8 мг/м ³	4.7 мг/м ³
Пировиноградная к-та	-1.8	-2.3	-**	-	-
4-метил-2-кетовалериановая к-та	-	-1.2	-	-	-
Молочная к-та	+1.3	+1.2	-	-	-
2-гидроксипропановая к-та	-	-	-2.0	-	-
3-метил-2-кетовалериановая к-та	-	+1.7	-	-	-
Урацил	+2.6	-	-	-	-
Гидроксикоричная к-та	+4.2	+5.1	+3.3	+2.2	-
L-пролин	-	+4.4	-	-	-
Глицерол-3-фосфат	-	-	-4.6	-	-
3-фосфоглицерат	-	+3.6	-	-	-
Лимонная к-та	+2.6	+2.9	-	-	-
Гиппуровая к-та	-	-2.0	-	-	-
Гулоновая к-та	-	+3.3	+1.8	+2.4	+2.3
мио-Инозитолфосфат***	-	-1.6	-2.4	-1.3	-1.2
мио-Инозитол	-	-	+1.8	+1.5	+1.2
Холестерол	-	-1.4	-	-	-
Аланин	-	-	-2,1	-	-

Примечание: * — Отношение площадей хроматографических пиков в *i*-ой и контрольной группах. Для иллюстрации добавлен знак: "+" — концентрация в группе выше, чем в контрольной в *X* раз, "-" — концентрация в первой группе меньше; ** — статистически значимых изменений в концентрации не выявлено; *** — точное положение фосфатной группы не установлено, возможные положения 1 или 3.

Для выявления возможных биомаркеров эффекта низких концентраций ДХГФ нами был проведен поиск отношений концентраций различных соединений, в частности показано, что отношение концентраций инозитолфосфат/инозитол дозозависимо изменяется. Однако значительное стандартное отклонение не позволяет говорить о достаточной статистической значимости ни в одной группе.

Отношение концентраций гулоновой кислоты и инозитолфосфата (см. рисунок 63) оказывается достаточно чувствительным биомаркером эффекта концентрации ДХГФ 18.8 мг/м³, а также, в первые часы после воздействия концентрации 600 мг/м³. Однако после 24 часов или при меньших концентрациях и многократном экспонировании, выявленный маркер не носит статистически значимого характера ($p = 0.18$).

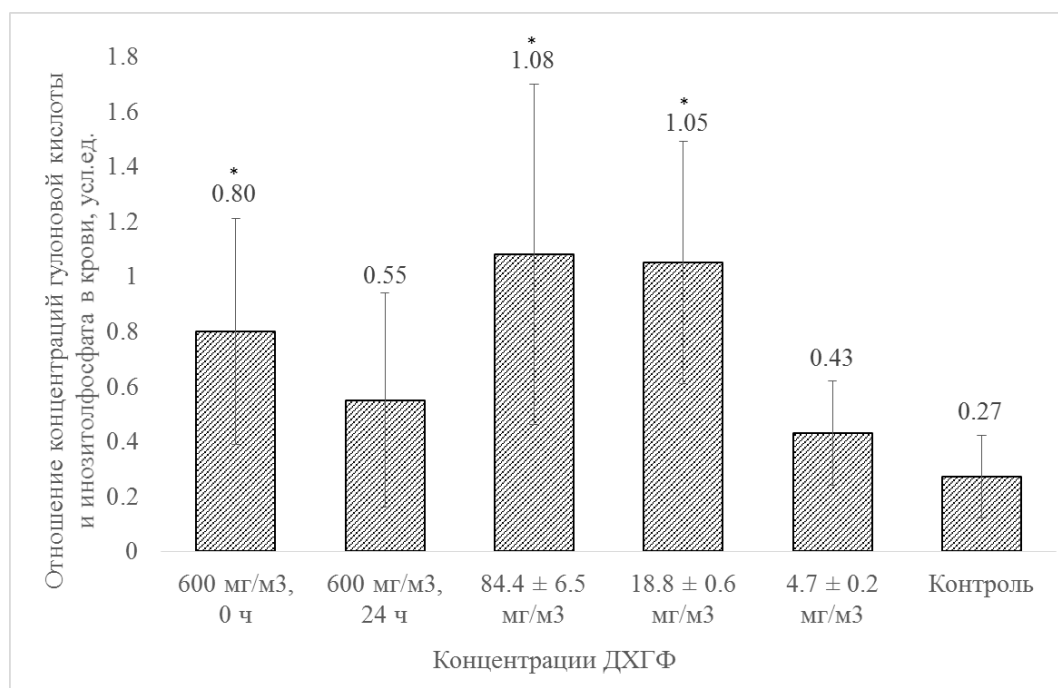


Рисунок 63 — Отношение концентраций гулоновой кислоты и инозитолфосфата в крови крыс, экспонированных различными концентрациями ДХГФ

Сочетание определения биомаркеров экспозиции — ДХГФ и 1,4-дихлор-1,1,3,4,4-бутантиона-2 в крови с определением биомаркеров эффекта — отношением концентраций гулоновой кислоты и инозитолфосфата позволит более точно оценивать полученную дозу или уровень воздействия ДХГФ на организм людей, контактирующих с ним.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Инструментально-методическая часть предлагаемой методологии является существенным расширением "классического" токсиколого-аналитического скрининга за счет объединения на одной платформе хроматомасс-спектрометрии методов выявления ксенобиотиков с использованием токсиколого-аналитического скрининга и методик количественного химического анализа,

а также методов метаболического профилирования для выявления эндогенных соединений, составляющих метаболические профили.

Предлагаемая методология состоит из следующих элементов:

1. Усовершенствованный метод расширенного токсиколого-аналитического скрининга.
2. Усовершенствованная методика метаболического профилирования биологических образцов с использованием ГХ с масс-селективным детектированием низкого разрешения и ВЭЖХ с масс-селективным детектированием высокого разрешения.
3. Набор методик количественного определения широкого спектра промышленных загрязнителей и токсичных органических соединений в биологических пробах.
4. Определение токсикокинетических параметров химических соединений для реконструкции абсорбированной дозы.
5. Использование наиболее чувствительных биомаркеров при расследовании обстоятельств острых и хронических отравлений вредными химическими веществами.

Первым элементом методологии является новый метод систематического токсиколого-аналитического скрининга, который позволяет минимизировать количество ложноотрицательных результатов за счет сочетания твердофазной микроэкстракции для определения летучих соединений в паровой фазе и экстракционного вымораживания при различных значениях рН с последующей дериватизацией различными дериватирующими агентами — МСТФА, CH_3I , ТФА, МТБСТФА и As_2O , а также за счет использования настройки автоматической интерпретации хроматомасс-спектрометрических данных, предусматривающей получение условно ложноположительных ответов в каждом рапорте, с их последующей экспертной проверкой. Снижение количества ложноположительных результатов скрининга достигается за счет использования электронных баз газохроматографических индексов удерживания.

Преимуществом нецелевых методов выявления биомаркеров является возможность получения новых знаний о механизмах действия малоизученных или неизученных химических соединений. Так, при экспериментальном моделировании интоксикации алифатическими углеводородами, распространёнными органическими загрязнителями атмосферного воздуха, выявлены ранее неизвестные механизмы их действия на головной мозг крыс. Показано, что непрерывное 90-дневное ингаляционное воздействие концентрации смеси УВ $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ 160 мг/м^3 приводит к значительному повышению концентрации лизофосфолипидов в экстракте из головного мозга и плазме крови. По-видимому, гидролиз фосфолипидов приводит к повышению гидрофильности молекул и, как следствие, к повышению их концентрации в системном кровотоке. Таким образом, можно предположить, что концентрация ЛФХ в крови отражает воздействие смеси УВ $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ на липидный состав мозга. При воздействии УВ с меньшим числом атомов углерода в цепи ($\text{C}_1\text{-C}_5$) также обнаружено повышение концентрации соответствующих

лизолипидов в крови, из чего можно сделать вывод о некоторой общности токсического действия углеводов с длиной цепи от 1 до 10 атомов углерода.

Использование нецелевых методов метаболического профилирования позволило получить новые знания о метаболизме и механизмах действия не изученных ранее химических соединений. К таким соединениям относятся хладон RL 316 (1,4-дихлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутена-2, ДХГФ) и гидроксилламин. При экспериментальном моделировании интоксикации ДХГФ в образцах крови и мочи крыс обнаружены и идентифицированы два летучих метаболита, продукта восстановительного замещения атомов хлора: 1-хлор-1,1,2,3,3,4,4,4-октафторбутан и 1-хлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутен-2. Всего в результате исследований выявлено и идентифицировано 15 различных ранее неизвестных метаболитов. Установлено, что основным путем превращений ДХГФ в организме является образование аддуктов с глутатионом и их дальнейшая деградация до цистеиновых и ацетилцистеиновых аддуктов. Также, среди продуктов распада аддуктов выявлены 4-метилсульфил-1-хлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутен-2, 4-метилсульфинил-1-хлор-1,1,2,3,4,4-гексафтор-бутен-2 и — 1,1,3,4,4-пентафтор-1,4-дихлорбутантион-2, который оказался наиболее чувствительным маркером у крыс. Показано, что при поступлении ДХГФ в организм не происходит его биоактивация с образованием лабильных тиокетенов, которые являются основной причиной мутагенного и канцерогенного действия некоторых галогенуглеводородов.

Для обоснования экстраполированного списка биомаркеров экспозиции для биоаналитического мониторинга воздействия ДХГФ на человека были использованы результаты сравнения активностей глутатион S-трансфераз, β -лиаз, дипептидаз и ацетилтрансфераз печени и почек крысы и человека по отношению к гексахлорбутадиену-1,3, который обладает достаточно близкой структурой к ДХГФ. Конъюгация гексахлорбутадиена-1,3 с глутатионом в микросомальной фракции печени крыс была в 5 раз более интенсивной чем у человека, в то время как метаболизм цистеинового аддукта почечными β -лиазами был приблизительно в 23 раза менее интенсивным у человека, чем у крысы. Активность ацетилтрансфераз в почках крыс и человека отличалась значительно меньше: в 3.5 раза больше у крыс. Таким образом, при биоаналитическом мониторинге воздействия ДХГФ на человека стоит в первую очередь в качестве целевых биомаркеров экспозиции рассматривать следующие соединения.

- Цистеиновые аддукты: 1-цистеинил-1,2,3,4,4-пентафтор-1,4-дихлорбутен-2 или его возможный изомер - 2-цистеинил-1,1,3,4,4-пентафтор-1,4-дихлорбутен-2.

- Ацетилцистеиновые аддукты: 1-(*N*-ацетилцистеинил)-1,2,3,4,4-пентафтор-1,4-дихлорбутен-2 или его возможный изомер - 2-(*N*-ацетилцистеинил)-1,1,3,4,4-пентафтор-1,4-дихлорбутен-2, 1-(*N*-ацетил-цистеинил)-1,2,3,4,4-пентафтор-1,4-дихлорбутан, 1-(*N*-ацетилцистеинил)-1,1,2,3,4,4-гексафтор-1,4-дихлорбутан.

Так как активность почечных β -лиаз была приблизительно в 23 раза меньше у человека, то можно не рассматривать продукты расщепления цистеиновых аддуктов по связи C-S в качестве целевых биомаркеров экспозиции при биомониторинге воздействия ДХГФ на человека: 4-метилсульфил-1-хлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутен-2, 4-метилсульфинил-1-хлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутен-2 и 1,1,3,4,4-пентафтор-1,4-дихлорбутантион-2.

Ранее не изученным путем метаболизма гидроксиламина является образование оксимов ($R=N-OH$, изонитрозосоединений) при взаимодействии с альдегидами и кетонами. Среди оксимов выявлены: оксим глицеральдегида, оксим пировиноградной кислоты, оксим N-формилглицина, оксим глиоксалевой кислоты и оксимы моносахаридов. Показано, что гидроксиламин сохраняется в кровотоке крыс, получавших минимальную дозу ГА с питьевой водой, несмотря на его высокую реакционную способность. Поступление в организм крыс гидроксиламина с питьевой водой приводит к значительному уменьшению концентраций 2-кетокислот: пировиноградной, 2-кетоизовалериановой, 3-метил-2-кетопентановой и 4-метил-2-кетопентановой кислот в моче. При этом концентрации 2-гидроксикислот, в т. ч. молочной, оставались неизменными.

Учитывая тот факт, что все обнаруженные метаболиты ГА в крови и мочи крыс были нами также обнаружены в образцах биологических жидкостей после внесения ГА *in vitro*, можно предположить, что образование этих оксимов не катализируется ферментами. Это позволяет не вносить изменений в список биомаркеров экспозиции при экстраполяции на человека.

Несмотря на то, что основной акцент в методологии сделан на нецелевых методах выявления биомаркеров, ее неотъемлемой частью являются методики количественного химического анализа, позволяющие проводить вычисление токсикокинетических параметров при экспериментальном моделировании интоксикаций. Так, нами были определены токсикокинетические параметры соединений из групп ЛПЗ и ФОП в крови и мочи кроликов. При этом, для повышения точности оценки токсикокинетических параметров было предложено разделять целевые соединения на 4 категории по типам зависимостей концентраций в крови от времени. Определение количественной зависимости концентраций биомаркеров в крови от времени позволяет проводить оценку абсорбированной дозы химического вещества, а проведение масштабирования токсикокинетических параметров позволяет экстраполировать их на человека. Нами опробована возможность приблизительной оценки абсорбированной дозы ФОП на основании сравнения значений площадей под кинетической кривой (AUC), вычисленных в различные моменты времени, для известной дозы и для искомой. В качестве исходных данных использованы: вид кинетического уравнения, токсикокинетические параметры, время, прошедшее с момента интоксикации до отбора пробы и концентрация ксенобиотика. Далее вычисленные значения AUC были сравнены со значениями для известной дозы ФОП. Отклонение при оценке дозы таким способом в

основном не превышало 100% и не зависело от времени прошедшего с момента отбора пробы крови.

Благодаря использованию предложенной методологии, удалось достичь чувствительности методов биоаналитического мониторинга, позволяющих выявлять факт ингаляционного поступления УВ C₆-C₁₀ в организм на уровне концентраций от 5.2 мг/м³, УВ C₁-C₅ на уровне концентраций от 50.2 мг/м³, ДХГФ на уровне концентраций от 18.8 мг/м³, факт поступления гидроксиламина с питьевой водой — в дозах от 22.6 мкг/кг, летучих промышленных токсикантов — в течение 6 дней после отравления дозами, эквивалентными 3×10^{-5} - 9×10^{-3} DL₅₀, фосфорорганических пестицидов — в течение 6 дней после отравления дозами, эквивалентными 1/50 — 1/10 DL₅₀, RVX — в течение 7 дней после отравления дозами, эквивалентными 2×0.4 DL₅₀ даже в условиях антидотной терапии.

Результаты обнаружения и идентификации биомаркеров использованы при обосновании предельно допустимых концентраций смесей алифатических углеводородов C₁-C₅ и C₆-C₁₀ (ГН 2.1.6.1338-03 с изм. от 30.08.16), ДХГФ (ГН 2.2.5.3532-18 с изм. от 13.02.18) и гидроксиламина. В результате оценки идентифицированных биомаркеров показано, что биомаркеры ДХГФ, гидроксиламина и смесей УВ с числом атомов углерода от 1 до 10 достаточно чувствительны для мониторинга пороговых и недействующих уровней, пригодны для использования в практике экспериментальной токсикологии и для целей гигиенического регламентирования.

ВЫВОДЫ И РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Обоснована и реализована хромато-масс-спектрометрическая методология анализа биологических объектов, включающая метод расширенного токсиколого-аналитического скрининга, методики определения экзогенных веществ и методики метаболического профилирования биологических образцов. Методология позволяет устанавливать пути биотрансформации в организме и механизмы действия ранее неизученных ксенобиотиков.

2. Разработаны аналитические схемы безэталонной идентификации биомаркеров токсикантов, включающие твердофазную микроэкстракцию определяемых компонентов из паровой фазы, экстракционное вымораживание биологических образцов при различных значениях pH, получение различных производных и автоматизированную обработку данных.

3. Предложено выделить в специализированные базы данных масс-спектры ионизации электронами и газохроматографические индексы удерживания аналитов, составляющие метаболические профили. Обращение к этим базам данных повышает эффективность газовой хроматографии с масс-селективным детектированием низкого разрешения для метаболического профилирования плазмы крови, мочи, органов и тканей. Для минимизации ошибок II рода при коли-

ественном определении потенциальных биомаркеров проведено обоснование необходимого размера экспериментальной выборки биологических образцов для нецелевого метаболического профилирования.

4. Сочетание предложенных хроматографических методик одновременной регистрации профилей свободных и связанных жирных кислот плазмы крови позволили пересмотреть токсикологические эффекты RVX в максимально переносимых дозах, включающие дозозависимое повышение суммарных концентраций этерифицированных и свободных форм жирных кислот, а также отношений концентраций ненасыщенных и насыщенных свободных жирных кислот в плазме крови. Данные отношения являются биомаркером эффекта RVX и служат показателем эффективности антидотной терапии карбоксимом.

5. Разработана высокочувствительная хромато-масс-спектрометрическая методика определения гидроксилamina в плазме крови и моче с двухстадийной дериватизацией бензальдегидом и БСТФА. Методика обеспечивает предел обнаружения на уровне 30 нг/мл при использовании ГХ-МС с одним квадруполом и 0,1 нг/мл при использовании ГХ-МС с системой трех квадруполов.

6. Разработанные методики определения лизофосфолипидов, в частности, арахинил-лизофосфатидилэтанолamina, а также стеарил-, олеил-, линолил- и арахидонилфосфатидилхолинов в системном кровотоке и тканях головного мозга позволили изучить механизм хронического ингаляционного воздействия алифатических углеводов с числом атомов углерода от 6 до 10, приводящим к значительному повышению их концентраций.

7. Проведена идентификация и количественное определение оксимов, образующихся при взаимодействии гидроксилamina с 2-кетокислотами, глицеральдегидом, глиоксалевой кислотой, *N*-формилглицином и несколькими моносахаридами в биологических средах. Таким образом, установлен основной механизм биотрансформации гидроксилamina в организме.

8. Проведена идентификация и определение аддуктов 1,4-дихлоргексафторбутена-2 с глутатионом в различных биосредах, что позволило выявить основной механизм его биотрансформации, включающий восстановительное замещение атомов хлора, образование указанных аддуктов и их дальнейшую деградацию до цистеиновых и ацетилцистеиновых аддуктов.

9. Выявлены подходы для более детальной структурной характеристики аналитов класса алкилфенолов, характеризующихся недостаточно информативными масс-спектрами ИЭ. При изучении структур позиционных изомеров алкилфенолов с использованием масс-спектров диссоциации, индуцированной соударениями протонированных молекул *para*-замещенных алкилфенолов C₄-C₉, в условиях положительной химической ионизации регистрируются характеристические ионы [M+H-H₂O]⁺, не свойственные другим позиционным изомерам.

10. Разработанные аналитические подходы позволили создать методики, обеспечивающие чувствительность, достаточную для биоаналитического мониторинга пороговых концентраций алифатических углеводов с числом атомов углерода от 1 до 10, 1,4-дихлоргексафторбутена-2 и гидроксиламина, а также для ретроспективной диагностики однократных отравлений максимально переносимыми дозами RVX и сублетальными дозами летучих промышленных загрязнителей и фосфорорганических пестицидов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. van Cauteren, H. Cancer risk evaluation / van Cauteren H., de Kok M.C.M., Van Schooten F.J. In: Toxicology. Principles and applications. Ed. Niesink R.J.M., de Vries J., Hollinger H.A. New York: CRC. — 1996. — 1312 p.
2. Corradi, M. A review on airway biomarkers: exposure, effect and susceptibility / Corradi M., Goldoni M., Mutti A. // *Expert. Rev. Respir. Med.* — 2015. — V. 9. — № 2. — P. 205–220.
3. Гигиенические критерии состояния окружающей среды: совмест. изд. Программы ООН по окружающей среде, Междунар. орг. труда и ВОЗ. 155: Биомаркеры и оценка риска: концепции и принципы. [пер. с англ.]. — Москва. — 1996. — 96 с.
4. Григорьев, А.М. Хроматомасс-спектрометрические методы выявления метаболитов лекарственных средств и синтетических каннабимиметиков: дис. ... докт. хим. наук: 02.00.02 / Григорьев Андрей Михайлович. — Москва, 2016. - 321 с.
5. Савчук, С.А. Новые методические подходы к контролю качества алкогольной продукции и к выявлению наркотических веществ в биологических средах хроматографическими и хромато-масс-спектрометрическими методами: дис. ... докт. хим. наук: 02.00.02 / Савчук Сергей Александрович. — СПб, 2012. - 377 с.
6. Ревельский, И.А. Методология анализа объектов различного происхождения методами газовой хроматографии-масс-спектрометрии и элементного анализа на содержание следов среднелетучих органических веществ: дис. ... докт. хим. наук: 02.00.02 / Ревельский Александр Игоревич. — Москва, 2012. - 245 с.
7. Бехтерев, В.Н. Экстракционное вымораживание и парофазная экстракция - новые методы извлечения гидрофильных органических веществ из водных сред: дис. ... докт. хим. наук: 02.00.02 / Бехтерев Виктор Николаевич. — Москва, 2011. - 271 с.
8. Hyotylainen, T. RSC Chromatography Monographs No. 18 Chromatographic Methods in Metabolomics. Chapter 18 / Hyotylainen T., Wiedmer S. Cambridge: RSC Publishing. — 2013. — 247 p.
9. Hartung, T. Food for Thought ... on mapping the human toxome / Hartung T., McBride M. // *ALTEX.* — 2011. — V. 28. — № 2. — P. 83–93.

-
10. Koppel, C. Scope and Limitations of a General Unknown Screening by Gas Chromatography–Mass Spectrometry in Acute Poisoning / Koppel C., Tenczer J. // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* — 1995. — V. 6. — № 11. — P. 995–1003.
 11. Biomarker and surrogate endpoints: preferred definition and conceptual framework / Atkinson A.J. [и др.] // *Clin. Pharmacol. Ther.* — 2001. — V. 69. — P. 89–95.
 12. Метаболомика: на пути интеграции биохимии, аналитической химии, информатики / А.И. Уколов [и др.] // *Успехи соврем. биол.* — 2015. — Т. 135. — № 1. — С. 3–17.
 13. Войтенко, Н.Г. Проблемы диагностики при интоксикации фосфорорганическими соединениями / Войтенко Н.Г., Прокофьева Д.С., Гончаров Н.В. // *Токсикол. вестн.* — 2013. — Т. 5. — С. 2–6.
 14. Ткачева, Т.А. Биомаркеры экспозиции и эффекта в системе гигиенического нормирования и оценки риска воздействия вредных веществ: дис. ... докт. мед. наук: 14.00.50 / Ткачева Татьяна Анатольевна. — Москва, 2005. — 274 с.
 15. Technical and ethical guidelines for workers' health surveillance. OSH No 72. Geneva: ILO, 1998.- 41 p.
 16. Biological monitoring and biomarkers (Chapter 4). Handbook on the Toxicology of Metals / Aitio A. [и др.] — New York: Academic Press/Elsevier. — 2007. — P. 65–78.
 17. Lowry, L.K. Role of biomarkers of exposure in the assessment of health risks / Lowry L.K. // *Toxicol. Lett.* — 1995. — V. 77. — P. 31–38.
 18. Биологический контроль производственного воздействия вредных веществ: Метод, рекомендации № 5205-90 / Сост. И.В. Саноцкий, И.П. Уланова, Г.Г. Авилова, Т.А. Ткачева и др. — М., 1990. — 30 с.
 19. Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals Updated Tables, January 2017, Vol. 1. 2017.
 20. Гадаскина И.Д., Гадаскина Н.Д., Филов В.А. Определение промышленных неорганических ядов в организме/ Ленинград : Медицина, Ленингр. отд-ние. 1975. 287 с.
 21. Гадаскина И.Д. Филов В.А. Превращения и определение промышленных органических ядов в организме. Ленинград : Медицина, Ленингр. отд-ние. 1971. 304 с.
 22. US National Research Council. Biologic markers in reproductive toxicology. — Washington, DC: National Academy Press. — 1989. — 395 p.
 23. WHO International Programme on Chemical Safety Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation. 2001.
 24. Strimbu, K. What are Biomarkers? / Strimbu K., Tavel J.A. // *Curr Opin HIV AIDS.* — 2010. — V. 5. — № 6. — P. 463–466.
 25. Biomarkers Definition Working Group Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework // *Clin. Pharmacol. Therapeutics.* — 2001. — V. 69. — P. 89–95.

-
26. Silbergeld, E.K. Role of biomarkers in identifying and understanding environmentally induced disease / Silbergeld E.K., Davis D.L. // *Clin. Chem.* — 1994. — V. 40. — № 7. — P. 1363–1367.
27. Biomarkers. In: *Principles of Ecotoxicology* / Walker C.H. [и др.] — London: Taylor and Francis. — 1996. — P. 175–194.
28. Aprea, M.C. Environmental and biological monitoring in the estimation of absorbed doses of pesticides / Aprea M.C. // *Toxicol. Lett.* — 2012. — V. 210. — № 2. — P. 110–118.
29. Bernard, A. Present status and trends in biological monitoring of exposure to industrial chemicals / Bernard A., Lauwerys R. // *J Occup Med.* — 1986. — V. 28. — P. 558–562.
30. Angerer, J. Human biomonitoring: state of the art / Angerer J., Ewersb U., Wilhelm M. // *Int. J. Hyg. Environ. Health.* — 2007. — V. 210. — P. 201–228.
31. Определение дихлофоса, диметоата, хлорпирифоса, фозалона, диазинона и метилпаратиона в крови и моче методом газовой хроматографии с тандемным масс-селективным детектированием / А.И. Уколов [и др.] // *Аналитика и контроль.* — 2014. — Т. 18. — №3. — С. 280–286.
32. Lauwerys, R.R. Introduction. In: *Industrial Chemical Exposure: Guidelines for Biological Monitoring.* 20 ed. / Lauwerys R.R., Hoet P. — USA: Lewis. — 1993. — P. 1–13.
33. Correlation between environmental and biological monitoring of exposure to benzene in petrochemical industry operators / Carrieri M. [и др.] // *Toxicol. Lett.* — 2010. — V. 192. — P. 17–21.
34. International programm on chemical safety Human exposure assessment. Environmental Health Criteria No. 210. — WHO. — Geneva. — 2000.
35. Gil, F. Biomarkers as biological indicators of xenobiotic exposure / Gil F., Pla A. // *J Appl Toxicol.* — 2001. — V. 21. — № 4. — P. 245–255.
36. Биомаркеры экспозиции и эффекта бериллия / Луковникова Л.В., Стосман К.И., Крупкин А.Б., Иванова А.С. // *Биомедицинский журнал Medline.ru.* — 2015. —Т. 16. —С. 728–736.
37. Биомониторинг — способ объективной диагностики острых и хронических интоксикаций химической этиологии/ Луковникова Л.В., Сидорин Г.И., Аликбаева Л.А., Фомин М.В. // *Гигиена окружающей и производственной среды.* — 2009. —Т. 3.- № 32. — С. 61-65.
38. Nordberg, G.F. Biomarkers of exposure, effects and susceptibility in humans and their application in studies of interactions among metals in China / Nordberg G.F. // *Toxicol. Lett.* — 2010. — V. 192. — P. 45–49.
39. Lauwerys, R. Occupational Toxicology. In: *Casarett and Doulls Toxicology. The basic Science of Poisons.* 40 ed. / Amdur M., Doull J., Klaassen C. New York: Pergamon. — 1991.
40. Biomarkers of chemical exposure: State of the art / Grandjean P. [и др.] // *Clin. Chem.* — 1994. — V. 40. — № 7. — P. 1360–1362.
41. Rockey, D.C. Noninvasive measures of liver fibrosis / Rockey D.C., Bissell D.M. // *Hepatology.* — 2006. — 43. —P. 113–20.

-
42. Hermans, C. Clara cell protein (CC16): characteristics and potential applications as biomarker of lung toxicity / Hermans C., Bernard A. // *Biomarkers*. — 1996. — V. 1. — P. 3–8.
43. Porphyria in herring gulls: a biochemical response to chemical contamination of Great Lakes food chains / Fox G.A. [и др.] // *Environ. Toxicol. Chem.* — 1988. — V. 7. — P. 831–839.
44. Fairbrother, A. The usefulness of cholinesterase measurement. / Fairbrother A., Bennett J.K. // *J. Wildlife Diseases*. — 1988. — V. 24. — P. 587–590.
45. Platelet monoamine oxidase B activity in workers exposed to styrene / Checkoway H. [и др.] // *Int. Arch. Occup. Environ. Health*. — 1994. — V. 66. — P. 359–362.
46. Lotti, M. Organophosphate-induced delayed polyneuropathy in humans: perspectives for biomonitoring / Lotti M. // *Trends Pharm. Sci.* — 1987. — V. 8. — P. 175–176.
47. Poirier, M.C. Human DNA adduct measurements: state of the art / Poirier M.C., Weston A. // *Environ. Health. Perspect.* — 1996. — V. 104. — P. 883–893.
48. Hoffman, D.J. Hepatic glutathione metabolism and lipid peroxidation in response to excess dietary selenomethionine and selenite in mallard ducklings / Hoffman D.J., Heinz G.H., Krynitsky A.J. // *J. Toxicol. Environ. Health*. — 1989. — V. 27. — P. 263–271.
49. Kumar, M. Biomarkers of diseases in medicine / Kumar M., Sarin S.K. // *Curr. Trends Sci.* — 2009.
50. Phases of biomarker development for early detection of cancer / Pepe M.S. [и др.] // *J. Natl. Cancer Inst.* — 2001. — V. 93. — № 14. — P. 1054–1061.
51. Систематический токсиколого-аналитический скрининг биологических образцов методом хроматомасс-спектрометрии. Примеры обнаружения диазепема, трамадола и прозерина / А.И. Уколов [и др.] // *Масс-спектрометрия*. — 2013. — Т. 10. — № 2. — С. 120–129.
52. Parasuraman, S. Toxicological screening / Parasuraman, S. // *J. Pharmacol. Pharmacother.* — 2011. — V. 2. — N. 2. — P. 74–79.
53. Sullivan, T.J. Pharmacological screening of new chemical entities in human subjects and methods of data handling / Sullivan T.J., Croft A.R., Hanka R., Roberts S.J. // *Br J Clin Pharmacol.* — 1980. — V. 9. — N. 4. P. 341–349.
54. An automated screening method for drugs and toxic compounds in human serum and urine using liquid chromatography–tandem mass spectrometry / Sturm S. [и др.] // *J. Chromatogr. B.* — 2010. — V. 878. — I. 28. — P. 2726–2732.
55. Broecker, S. General unknown screening in hair by liquid chromatography–hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC–QTOF–MS) / Broecker S., Herre S., Pragst F. // *Forensic Sci. Int.* — 2012. — V. 218. — I. 1–3. — P. 68–81.
56. Stimpfl, T. Automatic screening in postmortem toxicology / Stimpfl T., Vycudilik W. // *Forensic Sci. Int.* — 2004. — V. 142. — I. 2–3. — P. 115–125.

-
57. Clinica Performance evaluation of three liquid chromatography mass spectrometry methods for broad spectrum drug screening / Lynch K.L. [и др.] // *Chimica Acta.*— 2010. — V. 411. — I. 19–20. — P. 1474–1481.
58. Rapid screening and confirmation of drugs and toxic compounds in biological specimens using liquid chromatography/ion trap tandem mass spectrometry and automated library search / Liu H.C. [и др.] // *Rapid Comm. Mass Spectrom.*— 2010. — V. 24. — I. 1. — P. 75–84.
59. Maurer, H.H. Position of chromatographic techniques in screening for detection of drugs or poisons in clinical and forensic toxicology and/or doping control / Maurer H.H. // *Clin. Chem. Lab. Med.*— 2004. — V. 42. — N. 11. — P. 1310–1324.
60. Maurer, H.H. Hyphenated mass spectrometric techniques—indispensable tools in clinical and forensic toxicology and in doping control / Maurer H.H. // *J. Mass Spectrom.* — 2006. — V. 41. — I. 11. — P. 1399–1413.
61. Maurer, H.H. Mass Spectral and GC Data of Drugs, Poisons, Pesticides, Pollutants and their Metabolites / Maurer H.H., Pfleger K., Weber A.A. Weinheim: Wiley–VCH. — 2007. — 1756 p.
62. Tracqui, A. Systematic toxicological analysis using HPLC/DAD /Tracqui A., Kintz P., Mangin P. // *J. Forensic Sci.* – 1995. — V.40. — I. 2. — P. 254–262.
63. Maier, R.D. Identification power of standardized HPLC–DAD system for systematic toxicological analysis / Maier R.D., Bogusz M. // *J. Anal. Toxicol.* – 1995. — V. 19. — I. 2. — P. 79–83.
64. Lambert, W.E. Potential of high–performance liquid chromatography with photodiode array detection in forensic toxicology /Lambert W.E., van Bocxlaer J.F., de Leenheer A.P. // *J. Chromatogr. B.* – 1997. — V. 689. — I. 1. — P. 45–53.
65. Dussy, F.E. Quantification of benzodiazepines in whole blood and serum / Dussy F.E., Hamberg C. Briellmann T.A. // *Int. J. Legal. Med.* — 2006. — V. 120. — I. 6. — P. 323–330.
66. Comprehensive screening of target, non–target and unknown pesticides in food by LC–TOF–MS / Garcia–Reyes J.F. [и др.] // *Trends in Analytical Chemistry.* — 2007. — V. 26. — N. 8. — P. 828–841.
67. Maurer, H.H. Systematic toxicological analysis of drugs and their metabolites by gas chromatography–mass spectrometry / Maurer H.H. // *J. Chromatogr.*— 1992. — V. 580. – I. 1–2. — P. 3–4.
68. Non–target screening of organic contaminants in marine salts by gas chromatography coupled to high–resolution time–of–flight mass spectrometry / Serrano R. [и др.] // *Talanta.* — 2011. — V. 85. — I. 2. — P. 877–884.
69. Identification and chemical characterization of specific organic constituents of petrochemical effluents / Botalova O. [и др.] // *Water research.* – 2009. — V. 43. — I. 15. — P. 3797–3812.
70. Determination of priority micro–pollutants in water by gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry / Pitarch E. [и др.] // *Anal. Chim. Acta.* — 2007. — V. 583. — I. 2. — P. 246–258.

-
71. Development and validation of a rapid and wide-scope qualitative screening method for detection and identification of organic pollutants in natural water and waste water by gas chromatography time-of-flight mass spectrometry / Portoles T. [и др.] // *J. Chromatogr. A.* — 2011. — V. 1218. — I. 2. — P. 303–315.
72. Characterization of the organic contamination pattern of a hyper-saline ecosystem by rapid screening using gas chromatography coupled to high-resolution time-of-flight mass spectrometry / Serrano R. [и др.] // *Sci. Tot. Environ.* — 2012. — V. 433. — P. 161–168.
73. Dresen, S. Electrospray-ionization MS/MS library of drugs as database for method development and drug identification / Dresen S., Kempf J., Weinmann W. // *Forensic Sci. Int.* — 2006. — V. 161. — I. 2–3. — P. 86–91.
74. Screening for basic drugs in hair of drug addicts by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry / Pelander A. [и др.] // *Ther. Drug Monit.* — 2008. — V. 30. — I. 6. — P. 717–724.
75. Simultaneous screening and quantification of 52 common pharmaceuticals and drugs of abuse in hair using UPLC-TOF-MS / Klose M.K. [и др.] // *Forensic Sci. Int.* — 2010. — V. 196. — I. 1–3. — P. 85–92.
76. General unknown screening of illicit drugs: A novel approach using high resolution and accurate mass / Duretz B. [и др.] // *Toxicol. Lett.* — 2010. — V. 196S. — P. 291–292.
77. Development practical application of a CID accurate mass spectra library of more than 2500 toxic compounds for systematic toxicological analysis by LC-QTOF-MS with data dependent acquisition / Broecker S. [и др.] // *Anal. Bioanal. Chem.* — 2011. — V. 400. — I. 1. — P. 101–117.
78. Combined use of liquid chromatography-hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF-MS) and high performance liquid chromatography with photodiode array detector (HPLC-DAD) in systematic toxicological analysis / Broecker S. [и др.] // *Forensic Sci. Int.* — 2011. — V. 212. — I. 1–3. — P. 215–226.
79. Toxicological Screening with the Agilent LC/MS-QTOF and the Personal Compound Database and the Broecker, Herre and Pragst Accurate Mass Spectral Library / Broecker S. [и др.] SantaClara: Agilent Technologies, Inc. — 2010.
80. Систематический токсиколого-аналитический скрининг биологических образцов методом газовой хромато-масс-спектрометрии. Апробация метода идентификации токсичных органических соединений / А.И. Уколов [и др.] // *Токсикол. вестн.* — 2014. — № 2. — С. 39–45.
81. Kees, F. Simultaneous determination of acetylsalicylic acid and salicylic acid in human plasma by high-performance liquid chromatography / Kees F., Jehnich D., Grobecker H. // *J. Chromatogr. B.* — 1996. — V. 677. — P. 172–177.
82. Comprehensive drug screening in blood for detecting abused drugs or drugs potentially hazardous for traffic safety / Lillsunde P. [и др.] // *Forensic Sci. Int.* 1996. — V. 77. — N. 3. — P. 191–210.

-
83. Maurer, H.H. Systematic toxicological analysis procedures for acidic drugs and/or metabolites relevant to clinical and forensic toxicology and/or doping control / Maurer H.H. // *J. Chromatogr. B.* — 1999. — V. 733. — P. 3–25.
84. Hirai, T. Simultaneous analysis of several non-steroidal anti-inflammatory drugs in human urine by high-performance liquid chromatography with normal solid-phase extraction / Hirai T., Matsumoto S., Kishi I. // *J. Chromatogr. B.* — 1997. — V. 692. — N. 2. — P. 375–388.
85. Spahn, L.H. Acyl glucuronides revisited: is the glucuronidation process a toxification as well as a detoxification mechanism? / Spahn L.H., Benet L.Z. // *Drug Metab. Rev.* — 1992. — V. 24. — N. 1. — P. 5–47.
86. Kostakis, C. *Liquid Chromatography Applications. 2013. Ch. 10. Forensic Toxicology.* / Kostakis C., Harpas P., Stockham P. Amsterdam: Elsevier. — 2013. — P. 249–293.
87. Felgate, D. Toxicology: initial testing. In: *Wiley encyclopedia of forensic science.* / Felgate D. London: John Wiley & Sons, Ltd. — 2009. — 3104 p.
88. Drummer, O.H. Chromatographic screening techniques in systematic toxicological analysis / Drummer O.H. // *J. Chromatogr. B.* — 1999. — V. 733. — N. 1–2. — P. 27–45.
89. Tracqui, A. Sample preparations for HPLC screening / Tracqui A. // *J. Forensic Sci.* — 1994. — V. 50. — P. 254–262.
90. Koves, E.M. Evaluation of a photodiode array / HPLC-based system for the detection and quantitation of basic drugs in postmortem blood / Koves E.M., Wells J. // *J. Forensic Sci.* — 1992. — V. 37. — N. 1. — P. 42–60.
91. Uniform solid-phase extraction procedure for toxicological drug screening in serum and urine by HPLC with photodiode-array detection / Lai C.K. [и др.] // *Clin. Chem.* — 1997. — V. 43. — N. 2. — P. 312–325.
92. Rapid screening for 61 central nervous system drugs in plasma using weak cation exchange solid-phase extraction and high performance liquid chromatography with diode array detection / Zhang Y. [и др.] // *African J. Pharm.* — 2011. — V. 5. — N. 6. — P. 706–720.
93. Alabdalla, M.A. HPLC-DAD for analysis of different classes of drugs in plasma / Alabdalla M.A. // *J. Clin. Forensic Med.* — 2005. — V. 12. — N. 6. — P. 310–315.
94. Pragst, F. Systematic toxicological analysis by highperformance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) / Pragst F., Herzler M., Erxleben B.T. // *Clin. Chem. Lab. Med.* — 2004. — V. 42. — N. 11. — P. 1325–1340.
95. Elliott, S.P. Applications of an HPLC-DAD drug-screening system based on retention indices and UV spectra / Elliott S.P., Hale K.A. // *J. Anal. Toxicol.* — 1998. — V. 22. — N. 4. — P. 279–289.
96. Bogusz, M. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic database of retention indices and UV spectra of toxicologically relevant substances and its interlaboratory use / Bogusz M., Erkens M. // *J. Chromatogr. A.* — 1994. — V. 674. — P. 97–126.

-
97. Pawliszyn, J. *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice* / Pawliszyn J. New York: Wiley-VCH.— 1997. — 264 p.
98. Development of a simple in-vial liquid-phase microextraction device for drug analysis compatible with capillary gas chromatography, capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography / Rasmussen K.E. [и др.] // *J.Chromatogr. A.* — 2000. — V. 873. — P. 3–11.
99. Anderson, S. Liquid-phase microextraction combined with capillary electrophoresis, a promising tool for the determination of chiral drugs in biological matrices / Anderson, S. // *J.Chromatogr. A.* — 2002. — V. 963. — P. 303–312.
100. Ho, T.S. Liquid-phase microextraction of hydrophilic drugs by carrier-mediated transport / Ho T.S., Halvorsen T.G. // *J.Chromatogr. A.* — 2003. — V. 998. — P. 61–72.
101. Dubey, D.K. Hollow fiber-mediated liquid-phase microextraction of chemical warfare agents from water / Dubey D.K., Pardasani D., Gupta A.K. // *J.Chromatogr. A.* — 2006. — V. 1107. — P. 29–35.
102. Eisert, R. Automated In-Tube Solid-Phase Microextraction Coupled to High-Performance Liquid Chromatography / Eisert R., Pawliszyn J. // *J. Anal. Chem.* — 1997. — V. 69. — P. 3140–3147.
103. Lipinski, J. Automated multiple solid phase micro extraction. An approach to enhance the limit of detection for the determination of pesticides in water / Lipinski J. // *Fresenius J. Anal. Chem.* — 2000. — V. 367. — P. 445–449.
104. Lipinski, J. Automated solid phase dynamic extraction — Extraction of organics using a wall coated syringe needle / Lipinski J. // *Fresenius J. Anal. Chem.* 2001. V. 369. P. 57–62.
105. Abdel-Rehim, M. New trend in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications: I. Determination of local anaesthetics in human plasma samples using gas chromatography–mass spectrometry / Abdel-Rehim M. // *J. Chromatogr. B.* — 2004. — V. 801. — P. 317–321.
106. Baltussen, E. Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles / Baltussen E., Cramers C.A. // *J. Microcol. Sep.* — 1999. — V. 11. — P. 737–747.
107. Baltussen, E. Sorptive sample preparation – a review / Baltussen E., Cramers C.A. // *Anal. Bioanal. Chem.* — 2002. — V. 373. — P. 3–22.
108. Tienpont, B. Stir bar sorptive extraction–thermal desorption–capillary GC–MS applied to biological fluids / Tienpont B. // *Anal. Bioanal. Chem.* — 2002. — V. 373. — P. 46–55.
109. Determination of organic compounds in water using liquid–liquid microextraction / Rezaee M. [и др.] // *J. Chromatogr. A.* — 2006. — V. 1116. — P. 1–9.
110. Arthur, C.L. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers / Arthur C.L., Pawliszyn J. // *J. Anal. Chem.* — 1990. — V. 62. — P. 2145–2148.
111. Review: toxicometabolomics. / Bouhifd M. [и др.] // *J. Appl. Toxicol.* — 2013. — V. 33. — N. 12. — P. 1365–1383.

-
112. The use of metabolomics for the discovery of new biomarkers of effect / van Ravenzwaay B. [и др.] // *Toxicol. Lett.* — 2007. — V. 172. — P. 21–28.
113. Beyoglu, D. Metabolomics and its potential in drug development / Beyoglu D., Idle J.R. // *Biochem. Pharm.* — 2013. — V. 85. — P. 12–20.
114. The human serum metabolome / Psychogios N. [и др.] // *PLoS One.* — 2011. — V. 6. — N. 2. — P. e16957.
115. Xenobiotic metabolomics: major impact on the metabolome / Johnson C.H. [и др.] // *Annu. Rev. Pharm. Toxicol.* — 2012. — V. 52. — P. 37–56.
116. Aberrant lipid metabolism in hepatocellular carcinoma revealed by plasma metabolomics and lipid profiling / Patterson A.D. [и др.] // *Cancer Res.* — 2012. — V. 71. — P. 6590–6600.
117. Nicholson, J.K. ‘Metabonomics’: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data / Nicholson J.K., Lindon J.C., Holmes E. // *Xenobiotica.* — 1999. — V. 29. — P. 1181–1189.
118. Interpreting metabolomic profiles using unbiased pathway models / Deo R.C. [и др.] // *PLoS Comput. Biol.* — 2010. — V. 6. — P. e1000692.
119. Mass spectral molecular networking of living microbial colonies / Watrous J. [и др.] // *Proc. Nation. Acad. Sci. USA.* — 2012. — V. 109. — P. 1743–1752.
120. Bennett, D. Growing pains for metabolomics / Bennett D. // *The Scientist.* — 2005. — V. 19. — N. 8. — P. 25–28.
121. Metabolomic Characterization of Human Rectal Adenocarcinoma with Intact Tissue Magnetic Resonance Spectroscopy / Jordan K.W. [и др.] // *Dis. Colon. Rectum.* — 2009. — V. 52. — N. 3. — P. 520–525.
122. Nicholson, J.K. Global systems biology, personalized medicine and molecular epidemiology / Nicholson J.K. // *Mol. Syst. Biol.* — 2006. — V. 2. — N. 52. — P. 1–6.
123. Robertson, D.G. Metabonomics in toxicology: a review / Robertson D.G. // *Toxicol. Sci.* — 2005. — V. 85. — N. 2. — P. 809–822.
124. Nonlinear data alignment for UPLC–MS and HPLC–MS based metabolomics: quantitative analysis of endogenous and exogenous metabolites in human serum / Nordström A. [и др.] // *Anal. Chem.* — 2006. V.78. — N. 10. — P. 3289–3295.
125. ¹H NMR and UPLC–MS(E) statistical heterospectroscopy: characterization of drug metabolites (xenometabolome) in epidemiological studies / Crockford D.J. [и др.] // *Anal. Chem.* — 2008. — V. 80. — N. 18. — P. 6835–6844.
126. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function / Nicholson J.K. [и др.] // *Nat. Rev. Drug Discov.* — 2002. — V. 1. — N. 2. — P. 153–161.
127. Griffin, J.L. Metabonomics: its potential as a tool in toxicology for safety assessment and data integration / Griffin J.L., Bollard M.E. // *Curr. Drug Metab.* — 2004. — V. 5. — P. 389–398.

-
128. Metabonomics technologies and their applications in physiological monitoring, drug safety assessment and disease diagnosis / Lindon J.C. [и др.] // *Biomarkers*. — 2004. — V. 9. — P. 1–31.
129. Bilello, J.A. The agony and ecstasy of “omic” technologies in drug development / Bilello J.A. // *Curr. Mol. Med.* — 2005. — V. 5. — P. 39–52.
130. The sensitivity of metabolomics versus classical regulatory toxicology from a NOAEL perspective / van Ravenzwaay B. [и др.] // *Toxicol. Lett.* — 2014. — V. 227. — P. 20–28.
131. Wang, R.E. The search for new cardiovascular biomarkers / Wang R.E., Gerszten T.J. // *Nature*. — 2008. — V. 451. — P. 949–952.
132. Robinson, A.B. Origins of Metabolic Profiling. T.O. Metz (ed.), *Metabolic Profiling, Methods in Molecular Biology 708*. / Robinson A.B., Robinson N.E. New York: Springer. — 2011. — P. 1–24.
133. Amino Acid Profiling for the Diagnosis of Inborn Errors of Metabolism. T.O. Metz (ed.), *Metabolic Profiling, Methods in Molecular Biology 708* / Piraud M. [и др.] New York: Springer. — 2011. — P. 25–54.
134. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression / Sreekumar A. [и др.] // *Nature*. — 2009. — V. 457. — P. 910–914.
135. Bananas as an energy source during exercise: a metabolomics approach / Nieman D.C. [и др.] // *PLoS One*. — 2012. — V. 7. — N. 5. — P. e37479.
136. Metabolomics in toxicology and preclinical research / Ramirez T. [и др.] // *ALTEX*. — 2013. — V. 30. — N. 2. — P. 209–225.
137. NMR-based metabonomic study of the subacute toxicity of titanium dioxide nanoparticles in rats after oral administration / Bu Q. [и др.] // *Nanotechnol.* — 2010. — V. 21. — N. 12. — P. 125105.
138. Dose dependent in vivo metabolic characteristics of titanium dioxide nanoparticles / Tang M. [и др.] // *J. Nanosci. Nanotechnol.* — 2010. — V. 10. — P. 8575–8583.
139. Robertson, D.G. High-throughput toxicology: practical considerations / Robertson D.G., Bulera S.J. // *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* — 2000. — V. 3. — P. 42–47.
140. HILIC–UPLC–MS for exploratory urinary metabolic profiling in toxicological studies / Spagou K. [и др.] // *Anal. Chem.* — 2011. — 83. — P. 382–390.
141. Lindon, J.C. Metabonomics techniques and applications to pharmaceutical research & development / Lindon J.C., Holmes E., Nicholson J.K. // *Pharm. Res.* — 2006. — V. 23. — N. 6. — P. 1075–1088.
142. Committee on Toxicity Testing and Assessment of Environmental Agents, National Research Council: *Toxicity Testing in the 21st century: A vision and a strategy*. New York: The National Academies Press NRC. — 2007. — 196p.
143. Mapping the Human Toxome by Systems Toxicology / Bouhifd M. [и др.] // *Basic Clin. Pharm. Toxicol.* — 2014. — V. 115. — N. 1. — P. 24–31.
144. Everett, J.R. Pharmacometabonomics and personalized medicine / Everett J.R., Loo R.L., Pullen F.S. // *Ann. Clin. Biochem.* — 2013. — V. 50. — N. 6. — P. 523–545.

-
145. Toxicometabolomics of urinary biomarkers for human gastric cancer in a mouse model / Kim K.B. [и др.] // *J. Toxicol. Environ. Health.*— 2010. —V. 73. — N. 21–22. —P. 1420–1430.
146. Toxicometabolomics approach to urinary biomarkers for mercuric chloride (HgCl₂)–induced nephrotoxicity using proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR) in rats / Kim K.B. [и др.] // *Toxicol. Appl. Pharmacol.*— 2010. — V. 249. — N. 2. — P. 114–126.
147. Гончаров, Н.В. Современные представления о токсикологии фторацетата / Гончаров Н.В., Кузнецов А.В., Радиллов А.С. // *Токсикол. вестн.* — 2005. —Т. 5. —С. 31-44.
148. Goncharov, N.V. Toxicology of fluoroacetate: a review, with possible directions for therapy research / Goncharov N.V., Jenkins R.O., Radilov A.S. // *J. Appl. Toxicol.* — 2006. — V. 26. — N. 2. —P. 148–161.
149. Biomarker profiling by nuclear magnetic resonance spectroscopy for the prediction of all–cause mortality: an observational study of 17,345 persons / Fischer K. [и др.] // *PLoS Med.*— 2014. —V. 11. — P. e1001606.
150. Metabolomics: A tool for early detection of toxicological effects and an opportunity for biology based grouping of chemicals—From QSAR to QBAR / van Ravenzwaay B. [и др.] // *Mutation Research.* — 2012. — V. 746. — P. 144–150.
151. Identification of a metabolic biomarker panel in rats for prediction of acute and idiosyncratic hepatotoxicity / Sun J. [и др.] // *Comput. Struct. Biotech. J.*— 2014. — V. 10. — P. 78–89.
152. Using combined bio–omics methods to evaluate the complicated toxic effects of mixed chemical wastewater and its treated effluent / Zhang Y. [и др.] // *J. Hazard. Mater.*— 2014. — V. 272. — P. 52–58
153. Target profiling analyses of bile acids in the evaluation of hepatoprotective effect of gentiopicroside on ANIT–induced cholestatic liver injury in mice / Tang X. [и др.] // *J. Ethnopharm.* — 2016. — V. 194. — P. 63–71.
154. A combination of metallomics and metabolomics studies to evaluate the effects of metal interactions in mammals. Application to *Mus musculus* mice under arsenic/cadmium exposure / García–Sevillano M.G. [и др.] // *J. Proteomics.* — 2014. — V. 104. — P. 66–79.
155. An integrated metabolomic method for profiling of metabolic changes in carbon tetrachloride induced rat urine / Lina Y. [и др.] // *Toxicology.* — 2009. — V. 256. — P. 191–200.
156. NMR–based metabolomic and quantitative real–time PCR in the profiling of metabolic changes in carbon tetrachloride–induced rat liver injury / Li X. [и др.] // *J. Pharm. Biomed. Anal.* — 2014. — V. 89. — P. 42–49.
157. A ¹H NMR–based Metabolomics Approach for Mechanistic Insight into Acetaminophen–induced Hepatotoxicity / Fukuhara K. [и др.] // *Drug Metab. Pharmacokinet.* — 2011. — V. 26. — N. 4. — P. 399–406.

-
158. Metabolomic profiling reveals novel biomarkers of alcohol intake and alcohol-induced liver injury in community-dwelling men / Harada S. [и др.] // *Environ. Health. Prev. Med.* — 2016. — V. 21. — P. 18–26.
159. Human urinary biomarkers of dioxin exposure: Analysis by metabolomics and biologically driven data dimensionality reduction / Jeanneret F. [и др.] // *Toxicol. Lett.* — 2014. — V. 230. — I. 2. — P. 234–243.
160. Evaluation and identification of dioxin exposure biomarkers in human urine by high-resolution metabolomics, multivariate analysis and in vitro synthesis / Jeanneret F. [и др.] // *Toxicol. Lett.* — 2016. — V. 240. — P. 22–31.
161. Metabolomics identifies an inflammatory cascade involved in dioxin- and diet-induced steatohepatitis / Matsubara T. [и др.] // *Cell Metab.* — 2012. — V. 16. — N. 5. — P. 634–644.
162. LC/MS-based non-targeted metabolomics for the investigation of general toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in C57BL/6J and DBA/2J mice / Lina S. [и др.] // *Int. J. Mass. Spectrom.* — 2011. — V. 301. — P. 29–36.
163. Increased serum bile acid concentration following low-dose chronic administration of thioacetamide in rats, as evidenced by metabolomic analysis / Jeong E.S. [и др.] // *Toxicol. Appl. Pharm.* — 2015. — V. 288. — N. 2. — P. 213–222.
164. Integrated metabolomics analysis of the size-response relationship of silica nanoparticles-induced toxicity in mice / Lu X. [и др.] // *Nanotechnology.* — 2011. — V. 22. — N. 5. — I. 055101. — P. 1–16.
165. Metabolic profiling of serum from gadolinium chloride-treated rats by ¹H NMR spectroscopy / Liao P. [и др.] // *Anal. Biochem.* — 2007. — V. 364. — P. 112–121.
166. Toxic effects of chronic low-dose exposure of thioacetamide on rats based on NMR metabolic profiling / Wei D.D. [и др.] // *J. Pharm. Biomed. Anal.* — 2014. — V. 98. — P. 334–338.
167. Influence of strain and sex on the metabolic profile of rats in repeated dose toxicological studies / Strauss V. [и др.] // *Toxicol. Lett.* — 2009. — V. 191. — P. 88–95.
168. Metabolomic analysis of biofluids from rats treated with Aconitum alkaloids using nuclear magnetic resonance and gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry / Sun B. [и др.] // *Anal. Biochem.* — 2009. — V. 395. — P. 125–133.
169. A metabolic profiling analysis of the nephrotoxicity of acyclovir in rats using ultra performance liquid chromatography/mass spectrometry / Xing W. [и др.] // *Environ. Toxicol. Pharmacol.* — 2016. — V. 46. — P. 234–240.
170. Toxicology effects of Morning Glory Seed in rat: A metabolomic method for profiling of urine metabolic changes / Ma C. [и др.] // *J. Ethnopharm.* — 2010. — V. 130. — P. 134–142.
171. Metabolomic analysis of the toxic effect of chronic low-dose exposure to acephate on rats using ultra-performance liquid chromatography/mass spectrometry / Hao D.F. [и др.] // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* — 2012. — V. 83. — P. 25–33.

-
172. The toxicity of 3-chloropropane-1,2-dipalmitate in Wistar rats and a metabonomics analysis of rat urine by ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry / Li J. [и др.] // *Chem. Biol. Interact.* — 2013. — V. 206. — N. 2. — P. 337–345.
173. The individual and combined metabolite profiles (metabolomics) of dibutylphthalate and di(2-ethylhexyl)phthalate following a 28-day dietary exposure in rats / van Ravenzwaay B. [и др.] // *Toxicol. Lett.* — 2010. — V. 198. — N. 2. — P. 159–170.
174. Identifying developmental toxicity pathways for a subset of ToxCast chemicals using human embryonic stem cells and metabolomics / Kleinstreuer N.C. [и др.] // *Toxicol. Appl. Pharm.* — 2011. — V. 257. — P. 111–121.
175. Plasma metabolic profiling analysis of cyclophosphamide-induced cardiotoxicity using metabolomics coupled with UPLC/Q-TOF-MS and ROC curve / Yin J. [и др.] // *J. Chromatogr. B.* — 2016. — V. 1033–1034. — P. 428–435.
176. Metabonomic analysis reveals the CCl₄-induced systems alterations for multiple rat organs / Jiang L. [и др.] // *J. Proteom. Res.* — 2012. — V. 11. — N. 7. — P. 3848–3859.
177. Triptolide disrupts fatty acids and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) levels in male mice testes followed by testicular injury: A GC-MS based metabolomics study / Ma B. [и др.] // *Toxicology.* — 2015. — V. 336. — P. 84–95.
178. Mechanistic analysis of metabolomics patterns in rat plasma during administration of direct thyroid hormone synthesis inhibitors or compounds increasing thyroid hormone clearance / Montoya G.A. [и др.] // *Toxicol. Lett.* — 2014. — V. 225. — P. 240–251.
179. A metabolomic study of fipronil for the anxiety-like behavior in zebrafish larvae at environmentally relevant levels / Wang C. [и др.] // *Environ. Pollut.* — 2016. — V. 211. — P. 252–258.
180. Metabolomic analysis of the toxic effects of chronic exposure to low-level dichlorvos on rats using ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry / Yang J. [и др.] // *Toxicol. Lett.* — 2011. — V. 206. — P. 306–313.
181. ¹H NMR based metabolomics approach to study the toxic effects of dichlorvos on goldfish (*Carassius auratus*) / Liu Y. [и др.] // *Chemosphere.* — 2015. — V. 138. — P. 537–545.
182. Metabolomic analysis to define and compare the effects of PAHs and oxygenated PAHs in developing zebrafish / Elie M.R. [и др.] // *Environ. Res.* — 2015. — V. 140. — P. 502–510.
183. Proteomic and metabolomic analysis on the toxicological effects of Benzo[a]pyrene in pearl oyster *Pinctada martensii* / Chen H. [и др.] // *Aquat. Toxicol.* — 2016. — V. 175. — P. 81–89.
184. Metabolomic profiling of a modified alcohol liquid diet model for liver injury in the mouse uncovers new markers of disease / Bradford B.U. [и др.] // *Tox. Appl. Pharm.* — 2008. — V. 232. — P. 236–243.

-
185. Shi, X. Identification of N-Acetyltaurine as a Novel Metabolite of Ethanol through Metabolomics-guided Biochemical Analysis / Shi X., Yao D., Chen C. // *J. Biol. Chem.* — 2012. — V. 287. — N. 9. — P. 6336–6349.
186. A metabolomics based approach to assessing the toxicity of the polyaromatic hydrocarbon pyrene to the earthworm *Lumbricus rubellus* / Jones O. [и др.] // *Chemosphere.* — 2008. — V. 71. — N. 3. — P. 601–609.
187. Untargeted metabolomic analysis of miltefosine action in *Leishmania infantum* reveals changes to the internal lipid metabolism / Vincent I.M. [и др.] // *Int. J. Parasit: Drugs and Drug Resistance.* — 2014. — V. 4. — P. 20–27.
188. Advances in understanding the mechanisms of mercury toxicity in wild golden grey mullet (*Liza aurata*) by ¹H NMR-based metabolomics / Cappello T. [и др.] // *Environ. Pollut.* — 2016. — V. 219. — P. 139–148.
189. Insights into the mechanisms underlying mercury-induced oxidative stress in gills of wild fish (*Liza aurata*) combining ¹H NMR metabolomics and conventional biochemical assays / Cappello T. [и др.] // *Sci. Tot. Environ.* — 2016. — V. 548–549. — P. 13–24.
190. Metabolic responses of clams, *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum*, to short-term exposure to lead and zinc / Arua V. [и др.] // *Mar. Pollut. Bull.* — 2016. — V. 107. — N. 1. — P. 292–299.
191. Gillis, J.D. Lethal and sub-lethal effects of triclosan toxicity to the earthworm *Eisenia fetida* assessed through GC-MS metabolomics / Gillis J.D., Price G.W., Prasher S.O. // *J. Hazard. Mater.* — 2017. — V. 323A. — P. 203–211.
192. GC-TOF/MS-based metabolomic strategy for combined toxicity effects of deoxynivalenol and zearalenone on murine macrophage ANA-1 cells / Ji J. [и др.] // *Toxicon Volume.* — 2016. — V. 120. — P. 175–184.
193. Global and targeted metabolomics reveal that Bupleurotoxin, a toxic type of polyacetylene, induces cerebral lesion by inhibiting GABA receptor in mice / Zhang Z. [и др.] // *J. Proteom. Res.* — 2014. — V. 13. — N. 2. — P. 925–933.
194. Integrated analysis of transcriptomics and metabolomics profiles in aflatoxin B1-induced hepatotoxicity in rat / Lu X. [и др.] // *Food Chem. Toxicol.* — 2013. — V. 55. P. 444–455.
195. Metabolomic analysis reveals metabolic changes caused by bisphenol A in rats / Chen M. [и др.] // *Toxicol. Sci.* — 2014. — V. 138. — N. 2. — P. 256–267.
196. Kovacevic, V. (¹H NMR-based metabolomics of *Daphnia magna* responses after sub-lethal exposure to triclosan, carbamazepine and ibuprofen / Kovacevic V., Simpson A.J., Simpson M.J. // *Comp. Biochem. Physiol. D: Genom. Proteom.* — 2016. — V. 19. — P. 199–210.
197. NMR-based metabolomics approach to study the toxicity of lambda-cyhalothrin to goldfish (*Carassius auratus*) / Li M. [и др.] // *Aquat. Toxicol.* — 2014. — V. 146. — P. 82–92.

-
198. Influences of methamphetamine-induced acute intoxication on urinary and plasma metabolic profiles in the rat / Shima N. [и др.] // *Toxicology*. — 2011. — V. 287. — P. 29–37.
199. ¹H NMR based metabolomics approach to study the toxic effects of herbicide butachlor on goldfish (*Carassius auratus*) / Xu H.D. [и др.] // *Aquat. Toxicol.* — 2015. — V. 159. — P. 69–80
200. Transcriptomic and metabolomic approaches to investigate the molecular responses of human cell lines exposed to the flame retardant hexabromocyclododecane (HBCD) / Zhang J. [и др.] // *Toxicol. in vitro*. — 2015. — V. 29. — P. 2116–2123.
201. Metabolomic analysis of the effects of polychlorinated biphenyls in nonalcoholic fatty liver disease / Shi X. [и др.] // *J. Proteom. Res.* — 2012. — V. 11. — P. 3805–3815.
202. Aliferis, K.A. Metabolomics — A robust bioanalytical approach for the discovery of the modes-of-action of pesticides: A review / Aliferis K.A., Jabaji S. // *Pestic. Biochem. Physiol.* — 2011. — V. 100. — P. 105–117.
203. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Section 4. Paris. — 1996. — 23 p.
204. European Centre For Ecotoxicology and toxicology of Chemicals, 2007. ECETOC Workshop Report 11.
205. Lindon, J.C. Toxicological applications of magnetic resonance / Lindon J.C., Holmes E., Nicholson J.K. // *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* — 2004. — 45. — P. 109–143.
206. Looser, R. Metabolite profiling with GC–MS and LC–MS—a key tool for contemporary biology. In: Vaidyanathan, S., Harrigan, G.G., Goodacre, R. (Eds.), *Metabolome Analyses — Strategies for Systems Biology*. / Looser R., Krotzky A.J., Trethewey R.N. New York: Springer. — 2005. — P. 103–118.
207. Weckwerth, W. Metabolomics: from pattern recognition to biological interpretation / Weckwerth W., Morgenthal K. // *Drug Discov. Today*. — 2005. — V. 10. — P. 1551–1558.
208. Metabolite Profiling: from diagnostics to systems biology / Fernie, A.R. [и др.] // *Nat. Rev.* — 2005. — V. 5. — P. 1–7.
209. Different levels of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and chlorinated compounds in breast milk from two U.K. Regions / Kalantzi O.I. [и др.] // *Environ. Health Perspect.* — 2004. — V. 112. — N. 10. — P. 1085–1091.
210. Bertram, H.C. Potential of human saliva for nuclear magnetic resonance-based metabolomics and for health-related biomarker identification / Bertram H.C., Eggers N., Eller N. // *Anal. Chem.* — 2009. — V. 81. — N. 21. — P. 9188–9193.
211. Analyzing and mapping sweat metabolomics by high-resolution NMR spectroscopy / Kutysenko V.P. [и др.] // *PLoS One*. — 2011. — V. 6. — N. 12. — P. e28824.
212. Variability analysis of human plasma and cerebral spinal fluid reveals statistical significance of changes in mass spectrometry-based metabolomics data / Crews B. [и др.] // *Anal. Chem.* — 2009. — V. 81. — N. 20. — P. 8538–8544.

-
213. Kanoh, S. Exhaled ethane: an in vivo biomarker of lipid peroxidation in interstitial lung diseases / Kanoh S., Kobayashi H., Motoyoshi K. // *Chest*. — 2005. — V. 128. — N. 4. — P. 2387–2392.
214. Metabolomics investigation of exercise–modulated changes in metabolism in rat liver after exhaustive and endurance exercises / Huang C.C. [и др.] // *Eur. J. Appl. Physiol.* — 2010. — V. 108. — N. 3. — P. 557–566.
215. Pharmacometabonomic investigation of dynamic metabolic phenotypes associated with variability in response to galactosamine hepatotoxicity / Coen M. [и др.] // *J. Proteom. Res.* — 2012. — V. 11. — N. 4. — P. 2427–2440.
216. A novel in vitro metabolomics approach for neurotoxicity testing, proof of principle for methyl mercury chloride and caffeine / van Vliet E. [и др.] // *Neurotoxicol.* — 2008. — V. 29. — N. 1. — P. 1–12.
217. Metabolic response to low–level toxicant exposure in a novel renal tubule epithelial cell system / Ellis J.K. [и др.] // *Mol. Biosyst.* — 2011. — V. 7. — N. 1. — P. 247–57.
218. HMDB: the human metabolome database / Wishart D.S. [и др.] // *Nucleic Acids Res.* — 2007. — V. 35. — P. D521–D526.
219. Pasikanti, K.K. Development and validation of a gas chromatography/mass spectrometry metabonomic platform for the global profiling of urinary metabolites / Pasikanti K.K., Ho P.C., Chan E.C. // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* — 2008. — V. 22. — P. 2984–2992.
220. Pasikanti, K.K. Gas chromatography/mass spectrometry in metabolic profiling of biological fluids / Pasikanti K.K., Ho P.C., Chan E.C. // *J. Chromatogr. B.* — 2008. — V. 871. — P. 202–211.
221. GMD@CSB.DB: the Golm metabolome database / Kopka J. [и др.] // *Bioinformatics.* — 2005. — V. 21. — P. 1635–1638.
222. Griffin, J.L. The Cinderella story of metabolic profiling: does metabolomics get to go to the functional genomics ball? / Griffin, J.L. // *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B* — 2006. — V. 361. — P. 147–161.
223. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts / Beckonert O. [и др.] // *Nat. Protoc.* — 2007. — V. 2. — N. 11. — P. 2692–2703.
224. Lenz, E.M. Analytical strategies in metabonomics / Lenz E.M., Wilson I.D. // *J. Proteom. Res.* — 2007. — V. 6. — P. 443–458.
225. Ng, D. Trend analysis of metabonomics and systematic review of metabonomics–derived cancer marker metabolites / Ng D., Pasikanti K., Chan E. // *Metabolomics.* — 2011. — V. 7. — P. 155–178.
226. Gerszten, R.E. The search for new cardiovascular biomarkers / Gerszten R.E., Wang T.J. // *Nature.* — 2008. — V. 451. — N. 7181. — P. 949–952.
227. Microbial metabolomics with gas chromatography/mass spectrometry / Koek M.M. [и др.] // *Anal. Chem.* — 2006. — V. 78. — N. 4. — P. 1272–1281.

-
228. Predictive metabolomics evaluation of nutrition–modulated metabolic stress responses in human blood serum during the early recovery phase of strenuous physical exercise / Chorell E. [и др.] // *J. Proteom. Res.* — 2009. — V. 8. — N. 6. — P. 2966–2977.
229. HMDB: a knowledgebase for the human metabolome / Wishart D.S. [и др.] // *Nucleic Acids Res.* — 2009. — V. 37. — P. D603–610.
230. From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG / Kanehisa M. [и др.] // *Nucleic Acids Res.* — 2006. — V. 34. — P. D354–357.
231. LIPID MAPS online tools for lipid research / Fahy E. [и др.] // *Nucleic Acids Res.* — 2007. — V. 35. — P. W606–612.
232. Database resources of the National Center for Biotechnology Information / Wheeler D.L. [и др.] // *Nucleic Acids Res.* — 2007. — V. 35. — P. D5–12.
233. ChEBI: a database and ontology for chemical entities of biological interest / Degtyarenko K. [и др.] // *Nucleic Acids Res.* — 2008. — V. 36. — P. D344–350.
234. Metabolite identification via the Madison Metabolomics Consortium Database / Cui Q. [и др.] // *Nat. Biotechnol.* — 2008. — V. 26. — P. 162–164.
235. METLIN: a metabolite mass spectral database / Smith C.A. [и др.] // *Ther. Drug Monit.* — 2005. — V. 27. — P. 747–751.
236. Taguchi, R. Basic analytical systems for lipidomics by mass spectrometry in Japan / Taguchi R., Nishijima M., Shimizu T. // *Methods Enzymol.* — 2007. — V. 432. — P. 185–211.
237. Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS / Halket J.M. [и др.] // *J. Exp. Bot.* — 2005. — V. 56. — P. 219–243.
238. Extraction and GC/MS analysis of the human blood plasma metabolome / Jiye A. [и др.] // *Anal. Chem.* — 2005. — V. 77. — P. 8086–8094.
239. Kanani, H. Standardizing GC–MS metabolomics / Kanani H., Chrysanthopoulos P.K., Klapa M.I. // *J. Chromatogr. B.* — 2008. — V. 871. — P. 191–201.
240. Chan, E.C. Global urinary metabolic profiling procedures using gas chromatography–mass spectrometry / Chan E.C.Y., Pasikanti K.K., Nicholson J.K. // *Nat. protoc.* — 2011. — V.6. — N. 10. — P. — 1483–1499.
241. Radiation metabolomics. 3. Biomarker discovery in the urine of gamma-irradiated rats using a simplified metabolomics protocol of gas chromatography–mass spectrometry combined with random forests machine learning algorithm / Lanz C. [и др.] // *Radiat. Res.* — 2009. — V. 172. — P. 198–212.
242. Garcia, A. Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC–MS)–Based Metabolomics T.O. Metz (ed.), *Metabolic Profiling, Methods in Molecular Biology 708.* / Garcia A., Barbas C. New York: Springer. — 2011. — P.191–204.

-
243. Trygg, J. Chemometrics in metabonomics / Trygg J., Holmes E., Lundstedt T. // *J. Proteom. Res.* — 2007. — V. 6. — P. 469–479.
244. Instrumental and experimental effects in LC–MS–based metabolomics / Burton L. [и др.] // *J. Chromatogr. B.* — 2008. — V. 871. — P. 227–235.
245. Metabolite fingerprinting: detecting biological features by independent component analysis / Scholz M. [и др.] // *Bioinformatics.* — 2004. — V. 20. — P. 2447–2454.
246. Quantification of proteins and metabolites by mass spectrometry without isotopic labeling or spiked standards / Wang W. [и др.] // *Anal. Chem.* — 2003. — V. 75. — P. 4818–4826.
247. Phenotype characterization using integrated gene, protein and metabolite profiling / Oresic M. [и др.] // *Appl. Bioinform.* — 2004. — V. 3. — P. 205–217.
248. Родионова, О.Е. Хемометрический подход к исследованию больших массивов химических данных / Родионова О.Е. // *Рос.хим.ж.* — 2006. — Т. 50. — №2. — С. 128–144.
249. Word, S. Principal Component Analysis / Word S., Esbensen K., Geladi P. // *Chemom. Intell. Lab. Syst.* — 1987. — V. 2. — P. 37–52.
250. Yeung, K.Y. Principal components analysis for clustering gene expression data / Yeung K.Y., Ruzzo W.L. // *Bioinformatics.* — 2001. — V. 17. — P. 763–774.
251. Ivosev, G. Dimensionality reduction and visualization in principal components analysis / Ivosev G., Burton L., Bonner R. // *Anal. Chem.* — 2008. — V. 80. — P. 4933–4944.
252. Keller, H.R. Evolving factor analysis / Keller H.R., Massart D.L. // *Chemom. Intell. Lab. Syst.* — 1992. — V. 12. — P. 209–224.
253. Malinowski, E.D. Window factor analysis: Theoretical derivation and application to flow injection analysis data / Malinowski E.D. // *J. Chemom.* — 1992. — V. 6. — N. 1. — P. 29–40.
254. Gemperline, P.J. Target transformation factor analysis with linear inequality constraints applied to spectroscopic–chromatographic data / Gemperline P.J. // *Anal. Chem.* — 1986. — V. 58. — N. 13. — P. 2656–2663.
255. Word, S. Pattern recognition by means of disjoint principal components models / Word S. // *J. Patt. recogn.* — 1976. — V. 8. — N. 3. — P. 127–139.
256. Development of a robust and repeatable UPLC–MS method for the long–term metabolomics study of human serum / Zelena E. [и др.] // *Anal. Chem.* — 2009. — V. 81. — N. 4. — P. 1357–1364.
257. Evaluation of the repeatability of ultra–performance liquid chromatography–TOF–MS for global metabolic profiling of human urine samples / Gika H.G. [и др.] // *J. Chromatogr. B.* — 2008. — V. 871. — P. 299–305.
258. Barker, M. Partial least squares for discrimination / Barker M., Rayens W. // *J. Chemom.* — 2003. — V. 17. — P. 166–173.

-
259. OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification / Bylesjö M. [и др.] // *J. Chemom.* — 2006. — V. 20. — P. 341–351.
260. Metabolomic investigation into variation of endogenous metabolites in professional athletes subject to strength–endurance training / Yan B. [и др.] // *J. Appl. Physiol.* — 2009. — V. 106. — N. 2. — P. 531–538.
261. Plasma esterified and non–esterified fatty acids metabolic profiling using gas chromatography–mass spectrometry and its application in the study of diabetic mellitus and diabetic nephropathy / Han L.D. [и др.] // *Anal. Chim. Acta.* — 2011. — V. 689. — N. 1. — P. 85–91.
262. Introduction to multi– and megavariate data analysis using projection methods (PCA and PLS) / Eriksson L. [и др.] Sweden, Umea: Umetrics. — 1999. — P. 69–111.
263. Процедура проведения количественного хромато–масс–спектрометрического анализа токсичных и сильнодействующих веществ в биологических объектах. Методические рекомендации / Е.И. Савельева [и др.] // Издание официальное. ©Федеральное медико–биологическое агентство, МРФМБА России 4.1.23–2014 — Москва, 2014. — 103 с.
264. Stein, S.E. An integrated method for spectrum extraction and compound identification from gas chromatography/mass spectrometry data / Stein S.E. // *J. Am. Soc. Mass Spec.* — 1999. — V. 10. — P. 770–781.
265. [Электронный ресурс] NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library. Software/Data Version (NIST 14) (CD–ROM).
266. [Электронный ресурс]. NISTChemistryWebBook. URL: <http://webbook.nist.gov/> (обращение январь 2017).
267. [Электронный ресурс]. Maurer H., Pfleger K., Weber A. Mass–spectral library of drugs, poisons, pesticides, pollutants and their metabolites. 2011. CD–ROM.
268. [Электронный ресурс]. Wiley Registry™ of Mass–Spectral Data, 7th edition. CD–ROM.
269. XCMS: Processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching and identification / Smith C.A. [и др.] // *Analytical Chemistry.* — 2006. — V. 78. — P. 779–787.
270. [Электронный ресурс] XCMS Online — The Scripps Research Institute. URL: <https://xcmsonline.scripps.edu> (обращение январь 2017).
271. The Golm Metabolome Database: a database for GC–MS based metabolite profiling. In Nielsen, J. and Jewett, M.C. (eds), *Metabolomics.* / Hummel J. [и др.] New York: Springer–Verlag. — 2007. — P. 75–96.
272. [Электронный ресурс] the Golm Metabolome Database: GMD. URL: <http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/> (обращение январь 2017).
273. [Электронный ресурс] Metlin — The Scripps Research Institute. URL: <https://metlin.scripps.edu/> (обращение январь 2017).

-
274. Орлова, Т.И. Совершенствование двухстадийной методики хроматомасс–спектрометрического определения свободных и этерифицированных жирных кислот в биологических образцах: дис. ... канд. хим. наук: 02.00.02 / Орлова Татьяна Игоревна. — СПб, 2016. — 119 с.
275. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 305. Bioconcentration: flow-through fish test. Paris:OECD. — 1996. — 23 p.
276. Kidd, H. The Agrochemicals Handbook, Third Edition. Royal Society of Chemistry Information Services / Kidd H., James D.R. UK: Cambridge. — 1991. —P. 5–14.
277. Pelander, A. Toxicological screening with formula-based metabolite identification by liquid-chromatography/time-offlight mass spectrometry /Pelander A., Ojanpera I., Laks S. // Anal. Chem. — 2003. — V. 75. —P. 5710–5718.
278. Tang, J. Metabolism of organophosphorus and carbamate pesticides. Toxicology of organophosphate & carbamate compounds. In: R.C.Gupta (ed.) / Tang J., Rose R.L., Chambers J.E. Elsevier Academic Press. — 2006. — P. 127–143.
279. Computer assisted substance identification in systematic toxicological analysis: New life for old methods / Linden R. [и др.] // Forensic Sci. Int. — 2010. V. 202. — P. e53–e60.
280. Johnson, J.V. Tandem Mass Spectrometry for Trace Analysis / Johnson J.V., Yost R.A. // Anal. Chem. — 1985. —V. 57. — N. 7. —P. 758A–768A.
281. Colin MacBean (ed.). The Pesticide Manual: A World Compendium. Eighth edition. 12th ed. Oxfordshire: CABI. — 2012. — 1439 p.
282. Уколов, А.И. Определение гидроксилamina в плазме крови и моче методом газовой хроматомасс–спектрометрии / А.И. Уколов, А.С. Радиллов // Вестник СПбГУ. Физика и химия. — 2017. — Т. 4 (62). — Вып. 3. — С. 337–345.
283. Разгоняев, А.О. Хроматомасс–спектрометрическая идентификация продуктов алкилирования фенолов в реакционных смесях с использованием хроматографических параметров удерживания // Дипломная работа / СПбГУ, химический факультет, кафедра органической химии, 2012 г.
284. Razgoniaev, A.O. Application of combined GC and MS data in GC–MS determining the structures of products of phenol alkylation by butyl alcohols / Razgoniaev A.O., Ukolov A.I., Zenkevich I.G. // Вестник Санкт–Петербургского университета. — 2012. — Т. 3. — Серия 4. — С. 120–127.
285. Stein, S.E. On the risk of false positive identification using multiple ion monitoring in qualitative mass spectrometry: large scale intercomparisons with a comprehensive mass spectral library / Stein S.E., Heller D.N.// J. Am. Soc. Mass Spec. — 2006. —V. 17. P. 823–885.
286. Aebi, B. Advances in the use of mass spectral libraries for forensic toxicology / Aebi B., Bernhard W. // J. Anal. Toxicol. — 2002. — V. 26. — P. 149–156.
287. Analytical Procedures Used in Examining Human Urine Samples / Koziowska K. [и др.] // Pol. J. Environ. Stud. — 2003. — V. 12. — N. 5. —P. 503–521.

-
288. Optimization of a Novel Procedure for Determination of VOCs in Water and Human Urine Samples Based on SBSE Coupled with TD–GC–HRMS / Jakubowska N. [и др.] // *J. Chromatogr. Sci.* — 2009. — V. 47. — P. 689–693.
289. Fatty Acid Ethyl Esters in Liver and Adipose Tissues as Postmortem Markers for Ethanol Intake / Salem R.O. [и др.] // *Clin.Chem.* — 2001. — V.47. — N. 4 — P. 722–725.
290. Современные лабораторные маркеры употребления алкоголя / Тарасова О.И. [и др.] // *Клиническая фармакология и терапия.* — 2007. — Т.16.– Вып.1. — С.1–5.
291. Pitfalls of toxicological analysis / Schutz H. [и др.] // *Legal Medicine* — 2003. — V.5. — P.S6–S19.
292. Sensitive method for the detection of 22 benzodiazepines by gas chromatography–ion trap mass–spectrometry / Pirnay S. [и др.] // *J. Chromatogr. A.* — 2002. — V. 954. — I. 1–2. — P. 235–245.
293. [Электронный ресурс] URL: <http://www.ehealthme.com/ds/diazepam/coma>.
294. Jatlow, P. Serum diazepam concentrations in overdose. Their significance / Jatlow P. // *Am.J.Clin.Pathol.* — 1979. — V. 72. — I. 4. — P. 571–577.
295. Fatal intoxication due to tramadol alone Case report and review of the literature / De Decker K. [и др.] // *Forensic Sci. Int.* — 2008. — V. 175. — N. 1. — P. 79–82.
296. Musshoff, F. Fatality due to ingestion of tramadol alone / Musshoff F., Madea B. // *Forensic Sci. Int.* — 2001. — V. 116. — N. 2–3. — P. 197–199.
297. Somani, S.M. Chemical Warfare Agents — Toxicity at Low Levels. / Somani S.M., Romano Jr J.A. UK: CRC Press. — 2001. — 447 p.
298. Davis, J.E. Minimizing occupational exposure to pesticides: personnel monitoring / Davis J.E. // *Residue Rev.* — 1980. — V. 75. — P. 33–50.
299. Fenske, R.A. Multi–route exposure assessment and biological monitoring of urban pesticide applicators during structural control treatments with chlorpyrifos / Fenske R.A., Elkner K.P. // *Toxicol. Ind. Health.* — 1990. — V. 6. — I. 3–4. — P. 349–371.
300. Kolmodin-Hedman, B. Studies on phenoxy acid herbicides. I. Field study. Occupational exposure to phenoxy acid herbicides (MCPA, dichlorprop, mecoprop and 2,4–d) in agriculture / Kolmodin-Hedman B., Höglund, S., Åkerblom M. // *Arch. Toxicol.* — 1983. — V. 54. — I. 4. — P. 257–265.
301. Studies on phenoxy acid herbicides. II. Field study. Oral and dermal uptake and elimination in urine of MCPA in humans / Kolmodin-Hedman B. [и др.] // *Arch. Toxicol.* — 1983. — V. 54. — I. 4. — P. 267–273.
302. Perez, J.J. Measurement of pyrethroid, organophosphorus, and carbamate insecticides in human plasma using isotope dilution gas chromatography–high resolution mass spectrometry / Perez J.J. // *J. Chromatogr. B.* — 2010. — V. 878. — N. 3–4. — P. 492–496.
303. Lauwerys, R.R. Biological monitoring of exposure to organic substances. In "Industrial chemical exposure; guideline for biological monitoring" / Lauwerys R.R., Hoe P. UK: CRC Press. — 1993. — P. 256–259.

-
304. Min, K.J. Determination of urinary metabolites of phosalone, methidathion, and IBP after oral administration and dermal application to rats / Min K.J., Cha C.G., Popendorf W. // *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* — 2005. — V. 74. — N. 5. — P. 809–816.
305. The rate of urinary excretion of phosalone residues in occupationally exposed persons / Drevenkar V. [и др.] // *Sci. Total Environ.* — 1979. — V. 13. — N. 3. — P. 235–243.
306. Gallo, M.A. Organic phosphorus pesticides. In: Hayes W.J. Jr, Laws E.R. Jr, eds. *Handbook of pesticide toxicology: classes of pesticides. Vol. 2* / Gallo M.A., Lawryk N.J. San Diego: Academic Press. — 1991. — P. 917–1123.
307. Di-alkyl phosphate biomonitoring data: assessing cumulative exposure to organophosphate pesticides / Duggan A. [и др.] // *Reg. Toxicol. Pharm.* — 2003. — V. 37. — I. 3. — P. 382–395.
308. Negative ion chemical ionization GC/MS–MS analysis of dialkylphosphate metabolites of organophosphate pesticides in urine of non-occupationally exposed subjects / Oglobline A.N. [и др.] // *Analyst.* — 2001. — V. 126. — I. 7. — P. 1037–1041.
309. Simultaneous determination of urinary dialkylphosphate metabolites of organophosphorus pesticides using gas chromatography–mass spectrometry / Ueyama J. [и др.] // *J. Chromatogr. B.* — 2006. — V. 832. — P. 58–66.
310. Simultaneous determination of six dialkylphosphates in urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry / Dulaurent S. [и др.] // *J. Chromatogr. B.* — 2006. — V. 831. — I. 1–2. — P. 223–229.
311. Hardt, J. Determination of Dialkyl Phosphates in Human Urine using Gas Chromatography–Mass Spectrometry / Hardt J., Angerer J. // *J. Anal. Tox.* — 2000. — V. 24. — P. 678–685.
312. Measurement of dialkyl phosphate metabolites of organophosphorus pesticides in human urine using lyophilization with gas chromatography–tandem mass spectrometry and isotope dilution quantification / Bravo R. [и др.] // *J. Expos. Anal.* — 2004. — V. 14. — P. 249–259.
313. Токсикометабономика: поиск маркеров хронического воздействия низких концентраций алифатических углеводов / А.И. Уколов [и др.] // *Журнал эволюционной биохимии и физиологии.* — 2017. — Т. 53. — № 1. — С. 24–32.
314. Cavanagh, J.B. On the pattern of changes in the rat nervous system produced by 2,5 hexanediol. A topographical study by light microscopy / Cavanagh J.B., Bennetts R.J. // *Brain.* — 1981. — V. 104. — P. 297–318.
315. The enlarging view of hexacarbon neurotoxicity / Spencer P.S. [и др.] // *Crit Rev Toxicol.* — 1980. — V. 7. — P. 279–356.
316. Уколов, А.И. Хроматомасс–спектрометрическое исследование биологических образцов крыс, подвергавшихся воздействию алифатических углеводов с числом атомов углерода от 6 до 10 / А.И. Уколов, Е.Д. Мигаловская, А.С. Радилов // *Биомедицинский журнал Medline.ru.* — 2015. — Т. 16. — С. 335–343.

-
317. Gobba, F. Color vision impairment in workers exposed to neurotoxic chemicals / Gobba F., Cavalleri A. // *Neurotoxicol.*— 2003. — V. 24. — P. 693–702.
318. Huang, C.C. Polyneuropathy induced by n-hexane intoxication in Taiwan/ Huang C.C. // *Acta Neurol. Taiwan.* — 2008. — V. 17. — P. 3–10.
319. Changes in autonomic function as determined by ECG R–R interval variability in sandal, shoe and leather workers exposed to n-hexane, xylene and toluene / Murata K. [и др.] // *Neurotoxicol.* — 1994. — V. 15. — P. 867–875.
320. An Experimental Study on the Neurotoxicity of n-Hexane Metabolites: Hexanol-1 and Hexanol-2 / Perbellini L. [и др.] // *Toxicol. Appl. Pharm.* — 1978. — V. 46. — P. 421–427.
321. Perbellini, L. Identification of the Metabolites of n-Hexane, Cyclohexane, and Their Isomers in Men's Urine / Perbellini L., Brugnone F., Pavan I. // *Toxicol. Appl. Pharm.* — 1980. — V. 53. — P. 220–229.
322. Abou-Donia, M.B. The Relative Neurotoxicities of n-Hexane, Methyl n-Butyl Ketone, 2,5-Hexanediol, and 2,5-Hexanedione following Oral or Intraperitoneal Administration in Hens / Abou-Donia M.B., Makkawy H.A., Graham D.G. // *Toxicol. Appl. Pharm.* — 1982. — V. 62. — P. 369–389.
323. Interactions of some organic solvents: hydrocarbons and chloroalkene / Skowron J. [и др.] // *Int. J. Occup. Saf. Ergon.* — 2001. — V. 7. — N. 1. — P. 35–47.
324. Probing Mechanisms of Axonopathy. Part II: Protein Targets of 2,5-Hexanedione, the Neurotoxic Metabolite of the Aliphatic Solvent n-Hexane / Tshala-Katumbay D. [и др.] // *Toxicol. Sci.* — 2009. — V. 107. — N. 2. — P. 482–489.
325. Lapadula, D.M. Evidence for multiple mechanisms responsible for 2,5-hexanedione-induced neuropathy / Lapadula D.M., Suwita E., Abou-Donia M.B. // *Brain Res.* — 1988. — V. 458. — P. 123–131.
326. Nervous system degeneration produced by industrial solvent methyl n-butyl ketone / Spencer P.S. [и др.] // *Arch. Neurol.* — 1975. — V. 32. — P. 219–222.
327. DeCaprio, A.P. Molecular mechanisms of diketone neurotoxicity / DeCaprio A.P. // *Chem.–Biol. Interact.* — 1985. — V. 54. — P. 257–270.
328. Graham, D.G. Hexane neuropathy: a proposal for pathogenesis of a hazard of occupational exposure and inhalane abuse / Graham D.G. // *Chem.–Biol. Interact.* — 1984. — V. 32. — P. 339–345.
329. Graham, D.G. Studies on the molecular pathogenesis of hexane neuropathy. I. Evaluation of the inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by 2,5-hexanedione / Graham D.G., Abou-Donia M.B. // *J. Toxicol. Environ. Health.* — 1980. — V. 6. — P. 623–631.
330. Studies on the molecular pathogenesis of hexane neuropathy. II. Evidence that pyrrole derivatization of lysyl residues leads to protein crosslinking / Graham D.G. [и др.] // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* — 1982. — V. 64. — P. 415–422.
331. Cross-linking of neurofilament proteins of rat spinal cord in vivo after administration of 2,5-hexanedione / Lapadula D.M. [и др.] // *J. Neurochem.* — 1986. — V. 46. — P. 1843–1850.

-
332. Sabri, M.I. Studies on the biochemical basis of distal axonopathies—I. Inhibition of glycolysis by neurotoxic hexacarbon compounds / Sabri M.I., Moore C.L., Spencer P.S. // *J. Neurochem.* — 1979. — V. 32. — P. 683–689.
333. Lycklama, J. Giant axonal degeneration: determination of essential glycolytic enzymes / Lycklama J., Nijeholt A. // *Clin. Neurol. Neurosurg.* — 1992. — V. 94. — P. 161–164.
334. Spencer P.S., Sabri M.I., Schaumburg H.H. Does a defect of energy metabolism in the nerve fibre underlie axonal degeneration in the polyneuropathies? / Spencer P.S., Sabri M.I., Schaumburg H.H. // *Ann. Neurol.* — 1979. — V. 5. — P. 501–507.
335. Giant axonal neuropathy: acceleration of neurofilament transport in optic axons / Monaco S. [и др.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 1985. — V. 82. — P. 920–924.
336. Cavanagh, J.B. The pattern of recovery of axons in the nervous system of rats following 2,5-hexanediol intoxication: a question of theology / Cavanagh J.B. // *Neuropath. Appl. Neurobiol.* — 1982. — V. 8. — P. 19–34.
337. DeCaprio, A.P. Covalent binding of a neurotoxic n-hexane metabolite: conversion of primary amines to substituted pyrrole adducts by 2,5-hexanedione / DeCaprio A.P., Olajos E.J., Weber P. // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* — 1982. — V. 65. — P. 440–450.
338. Sayre, L.M. Pathogenesis of experimental giant neurofilamentous axonopathies: a unified hypothesis based on chemical modification of neurofilaments / Sayre L.M., Autilio-Gambetti L., Gambetti P. // *Brain Res. Rev.* — 1985. — V. 10. — P. 69–83.
339. Commercial-Grade Methyl Heptyl Ketone (5-Methyl-2-octanone) Neurotoxicity: Contribution of 5-Nonanone / Donoghue J.L. [и др.] // *Toxicol. Appl. Pharm.* — 1982. — V. 62. — P. 307–316.
340. Abou-Donia, M.B. Cytoskeletal proteins as targets for organophosphorus compound and aliphatic hexacarbon-induced neurotoxicity / Abou-Donia M.B., Lapadula D.M., Suwita E. // *Toxicology.* — 1988. — V. 49. — P. 469–477.
341. Alternative biomarkers of n-hexane exposure: Characterization of aminoderived pyrroles and thiol-pyrrole conjugates in urine of rats exposed to 2,5-hexanedione / Torres M.E. [и др.] // *Toxicol. Lett.* — 2014. — V. 224. — N. 1. — P. 54–63.
342. Уколов, А.И. Хроматомасс-спектрометрическое исследование плазмы крови крыс, подвергавшихся воздействию алифатических углеводов с числом атомов углерода от 1 до 5 / А.И. Уколов, Е.Д. Мигаловская, А.С. Радилов // *Биомедицинский журнал Medline.ru.* — 2015. — Т. 16. — С. 329–334.
343. Александров, В.Ю. Экологические проблемы автомобильного транспорта / Александров В.Ю., Кузубова Л.И., Яблокова Е.П. // *Экология. Серия Аналитических Обзоров Мировой Литературы.* — 1995. — №34. — С. 1–113.

-
344. Lewis, R.J. Sr. (ed) *Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials*. 11th Edition / Lewis, R.J. Sr. // Hoboken, NJ: Wiley-Interscience. — 2004. — 2331 p.
345. *Clinical Toxicology* / Ford M.D. [и др.] Philadelphia, PA: W.B. Saunders Company. — 2001. — 789p.
346. Rom, W.N. (ed.). *Environmental and Occupational Medicine*. 2nd ed. / Rom W.N. // Boston, MA: Little, Brown and Company. — 1992. — 536 p.
347. Snyder, R. (ed.) *Ethyl Browning's Toxicity and Metabolism of Industrial Solvents*. 2nd ed. Volume 1: *Hydrocarbons* / Snyder, R. Amsterdam: Elsevierю. — 1987. — 259 p.
348. Bingham, E. *Patty's Toxicology Volumes 1–9* 5th ed. / Bingham E., Cohn B., Powell C.H. New York: John Wiley & Sons. — 2001. — 487 p.
349. Haq, M.Z. A death involving asphyxiation from propane inhalation / Haq M.Z., Hameli A.Z. // *J Forensic Sci.* — 1980. — V. 25. — N. 1. — P. 25–28.
350. [Электронный ресурс] <http://esis.jrc.ec.europa.eu/> European Chemicals Bureau; IUCLID Dataset, Propane (74–98–6) (обращение октябрь 2013).
351. Красовицкая, М.Л. О пороговых концентрациях парафинов при кратковременном и длительном вдыхании. Биологическое действие и гигиеническое значение атмосферных загрязнений. / Красовицкая М.Л., Малярова Л.К. // Пермь: Пермское кн. Изд-во. — 1968. — Вып. 11. — С. 73.
352. Study on the metabolism of volatile hydrocarbons in mice—propane, n-butane, and iso-butane / Tsukamoto S. [и др.] // *J. Toxicol. Sci.* — 1985. — V. 10. — N. 4. — P. 323–332.
353. Clayton, G.D. (eds.). *Patty's Industrial Hygiene and Toxicology: Volume 2A, 2B, 2C: Toxicology*. 3rd ed. / Clayton G.D., Clayton F.E. New York: John Wiley Sons. — 1981–1982. — 3183p.
354. Solid-phase microextraction: investigation of the metabolism of substances that may be abused by inhalation / Walker R. [и др.] // *J. Chromatogr. Sci.* — 2006. — V. 44. — N. 7. — P. 387–393.
355. Uptake of 19 hydrocarbon vapors inhaled by F344 rats / Dahl A.R. [и др.] // *Fundam Appl. Toxicol.* — 1988. — V. 10. — N. 2. — P. 262–269.
356. Subchronic Inhalation Toxicity Study of n-pentane in Rats / Kim J.K. [и др.] // *Saf. Health Work.* — 2012. — V. 3. — P. 224–234.
357. Prager, J.C. *Environmental contaminant reference databook, volume 2* / Prager, J.C. New York: Van Nostrand Reinhold. — 1996. — 685p.
358. [Электронный ресурс] Hazardous Substances Data Bank (PENTANE). Bethesda (MD): National Library of Medicine. URL: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/-sis/htmlgen?HSDB> (обращение ноябрь 2011).
359. One-generation reproductive toxicity study of 2-methylbutane in Sprague-Dawley rats / Yu W.J. [и др.] // *Regul. Toxicol. Pharm.* — 2011. — V. 60. — N. 1. — P. 136–143.
360. Gasoline vapor exposures. Part II. Evaluation of the nephrotoxicity of the major C4/C5 hydrocarbon components / Halder C.A. [и др.] // *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* — 1986. — V. 47. — N. 3. — P. 173–175.

-
361. Absence of hydrocarbon-induced nephropathy in rats exposed subchronically to volatile hydrocarbon mixtures pertinent to gasoline / Aranyi C. [и др.] // *Toxicol Ind Health*. — 1986. — V. 2. — N. 1. — P. 85–98.
362. Terelius, Y. Ingelman-Sundberg M. Metabolism of n-pentane by ethanol-inducible cytochrome P-450 in liver microsomes and reconstituted membranes / Terelius Y., Ingelman-Sundberg M. // *Eur. J. Biochem*. — 1986. — V. 161. — N. 2. — P. 303–308.
363. Hydrocarbon nephropathy in male rats: identification of the nephrotoxic components of unleaded gasoline / Halder C.A. [и др.] // *Toxicol. Ind. Health*. — 1985. — V. 1. — N. 3. — P. 67–87.
364. Acute and subchronic toxicity of hydroxylammonium nitrate in Wistar rats / Hui A. [и др.] // *J. Med. Colleg. of PLA*. — 2008. — V. 23. — P. 137–147.
365. Gross, P. Biologic activity of hydroxylamine: a review / Gross P. // *Crit. Rev. Toxicol*. — 1985. — V. 14. — N. 1. — P. 87–99.
366. General toxicity and reproductive screen of liquid propellant XM46 administered in the drinking water of Sprague-Dawley rats / Kinkead E.R. [и др.] // *Toxicol. Ind. Health*. — 1995. — V. 11. — N. 2. — P. 199–215.
367. Bazylnski, D.A. Decomposition of hydroxylamine by hemoglobin / Bazylnski D.A., Arkowitz R.A., Hollocher T.C. // *Arch. Biochem. Biophys*. — 1987. — V. 259. — P. 520–526.
368. The effects of ethanol on the hematotoxicity of twelve pharmaceutical and environmental agents / Calabrese J. [и др.] // *J. Environ. Sci. Health*. — 1988. — V. A23. — P. 359–367.
369. Cranston, R.D. Some aspects of the reactions between hydroxylamine and hemoglobin derivatives / Cranston R.D., Smith R.P. // *J. Pharmacol. Exp. Ther*. — 1971. — V. 177. — P. 440–446.
370. Colter, J.S. Catalytic decomposition of hydroxylamine by hemoglobin / Colter J.S., Quastel J.H. // *Arch. Biochem*. — 1950. — V. 27. — P. 368–389.
371. Stolze, K. Detection of free radicals as intermediates in the methemoglobin formation from oxyhemoglobin induced by hydroxylamine / Stolze K., Nohl H. // *Biochem. Pharm*. — 1989. — V. 38. — P. 3055–3059.
372. Hydroxylamine and Phenol-induced formation of methemoglobin and free radical intermediates in erythrocytes / Stolze K. [и др.] // *Biochem. Pharm*. — 1996. — V. 52. — P. 1821–1829.
373. Новые аспекты механизма токсического действия гидроксиламина / Г.М. Проданчук [и др.] // *Современные проблемы токсикологии*. — 2006. — № 1. — С. 37–46.
374. Sinha, D. Experimental production of Heinz Bodies in the pig / Sinha D., Sleigh S.D. // *Toxicol. Appl. Pharmacol*. — 1986. — V. 12. — P. 435–439.
375. Smith, R.P. A comparison of the lethal effects of nitrite and hydroxylamine in the mouse / Smith R.P., Layne W.R. // *J. Pharmacol. Exp. Ther*. — 1969. — V. 165. — P. 30–35.

-
376. Two Mechanisms for Toxic Effects of Hydroxylamines in Human Erythrocytes: Involvement of Free Radicals and Risk of Potentiation / Evelo T.A. [и др.] // *Chris. Blood Cell. Mol. Dis.* — 1998. — V. 24. — N. 13. — P. 280–295.
377. Adams, D.H. The action of some chemical substances on mouse liver catalase activity in vivo / Adams D.H., Roe F.J. // *Br. J. Cancer.* — 1953. — V. 7. — P. 509–518.
378. Investigation of in vivo toxicity of hydroxylamine sulfate 4 and the efficiency of intoxication treatment by a-tocopherol 5 acetate and methylene blue / Prodanchuk M.G. [и др.] // *Food Chem. Toxicol.* — 2013. — V. 61. — P. 227–232.
379. Toxicity of cyclohexanone oxime. I. Hematotoxicity following subacute exposure in rats / Derelanko M.J. [и др.] // *Fundam. Appl. Toxicol.* — 1985. — V. 5. — N. 1. — P. 117–127.
380. Toxicity of cyclohexanone oxime. II. Acute dermal and subchronic oral studies / Gad S.C. [и др.] // *Fundam. Appl. Toxicol.* — 1985. — V. 5. — N. 1. — P. 128–136.
381. Parmar, D. Metabolism and disposition of cyclohexanone oxime in male F-344 rats / Parmar D., Burka L.T. // *Drug Metab. Dispos.* — 1991. — V. 19. — N. 6. — P. 1101–1105.
382. Miller, R.R. Identification of a hydroxylamine glucuronide metabolite of an oral hypoglycemic agent / Miller R.R., Doss G.A., Stearns R.A. // *Drug Metab. Dispos.* — 2004. — V. 32. — N. 2. — P. 178–185.
383. Проданчук, Г.Н. Окислительный стресс в формировании гемолитической анемии при токсическом воздействии соединений гидроксилamina (обзор) / Г.Н. Проданчук, Г.М. Балан // *Современные проблемы токсикологии.* — 2005. — №1. — С. 4–10.
384. Experimental study of the toxicity of a fluoroalkene derivative, the hexafluorodichlorobutene (HFCB) / Truhaut R. [и др.] // *Fluoride.* — 1972. — V. 5. — N. 1. — P. 4–14.
385. Corrigan, D.S. Halothane and Dichlorohexafluorobutene / Corrigan D.S., McHattie G.V., Reventos J. // *Brit. J. Anesthesia.* — 1963. — V. 35. — P. 824–825.
386. Грушко, Я.М. Вредные органические соединения в промышленных выбросах в атмосферу / Я.М. Грушко. Л.: Химия. — 1986. — 143 с.
387. Муравьева, С.И. Справочник по контролю вредных веществ в воздухе / Муравьева С.И., Казнина Н.И., Прохорова Е.К. М.: Химия. — 1988. — 143 с.
388. Филов, В.А. Вредные химические вещества. Углеводороды, галогенпроизводные углеводородов: справ. / Филов В.А.Л.: «Химия». — 1990. — 732 с.
389. Лазарев, Н.В. Вредные химические вещества. Органические вещества: справ. / Лазарев Н.В. Л.: «Химия». — 1976. — Т. 1. — С. 300.
390. Hayden, P.J. Cysteine conjugate toxicity, metabolism, and binding to macromolecules in isolated rat kidney mitochondria / Hayden P.J., Stevens J.L. // *Mol. Pharm.* — 1990. — V. 37. — P. 468–476.
391. Dekant, W. Toxicology of Chlorofluorocarbon Replacements / Dekant W. // *Environ. Health Perspect.* — 1996. — V. 104. — N. 1. — P. 75–83.

-
392. Anders, M.W. Metabolism and Toxicity of Hydrochlorofluorocarbons: Current Knowledge and Needs for the Future / Anders M.W. // *Environ. Health Perspect.*— 1991. — V. 96. — P. 185–191.
393. Bacterial-lyase mediated cleavage and mutagenicity of cysteine conjugates derived from the nephrocarcinogenic alkenes trichloroethylene, tetrachloroethylene and hexachlorobutadiene / Dekant W. [и др.] // *Chem.-Biol. Interact.* — 1986. — V. 60. — P. 31–45.
394. Biosynthesis and bioansformation of glutathione S–conjugates to toxic metabolites / Ander M.W. [и др.] // *CRC Crit. Rev. Toxicol.* — 1988. — V. 18. — P. 311–341.
395. Dreehen, B. Mutagenicity of the glutathione and cysteine S–conjugates of the haloalkenes 1,1,2-trichloro-3,3,3-trifluoro-1-propene and trichlorofluoroethene in the Ames test in comparison with the tetrachloroethene–analogues / Dreehen B., Westphal G. // *Mut. Res.* — 2003. — V. 539. — P. 157–166.
396. Lock, E.A. Studies on the Mechanism of Nephrotoxicity and Nephrocarcinogenicity of Halogenated Alkenes / Lock E.A., Berndt W.O. // *CRC Crit. Rev. Toxicol.* — 1988. — V. 19. — N. 1. — P. 23–42.
397. MacNichol, D.D. New and unexpected reactivity of saturated fluorocarbons / MacNichol D. D., Robertson D.D. // *Nature.* — 1988. — V. 332. — P. 59–61.
398. Wkelman, C. Recent advances in the chemistry of halogenofluorocarbons / Wkelman C., Kazis C. // *J. Fluorine Chem.* — 1986. — V. 33. — P. 347–359.
399. Blair, I.A. Analysis of endogenous glutathione-adducts and their metabolites / I.A. Blair // *Biomed. Chromatogr.* — 2010. — V. 24. — N. 1. — P. 29–38.
400. Blair, I.A. Endogenous glutathione adducts / I.A. Blair // *Curr. Drug Metab.* — 2006. — V. 7. — N. 8. — P. 853–872.
401. Awasthi, Y.C. The non-ABC drug transporter RLIP76 (RALBP-1) plays a major role in the mechanisms of drug resistance / Awasthi Y.C., Sharma R., Yadav S., Dwivedi S., Sharma A., Awasthi S. // *Curr. Drug Metab.* — 2007. — V. 8. — N. 4. — P. 315–323.
402. Green, T. Assessing the health risks following environmental exposure to hexachlorobutadiene / Green T., Lee R., Farrar D., Hill J. // *Toxicol Lett.* — 2003. — V. 138. — N. 1–2. — P. 63–73.
403. Poet, T.S. In vitro glutathione conjugation of methyl iodide in rat, rabbit, and human blood and tissues / Poet T.S., Wu H., Corley R.A., Thrall K.D. // *Inhal. Toxicol.* — 2009. — V. 21. — N. 6. — P. 524–530.
404. European Commission Council Directive 1999/13/EC of 11 March 1999 on the limitation of emissions of volatile organic compounds due to the use of organic solvents in certain activities and installations // *Official Journal L 085.* — 1999. — P. 1–22.
405. Biological monitoring for exposure to volatile organic compounds (VOCs) / Heinrich-Ramm R. [и др.] // *Pure Appl. Chem.* — 2000. — V. 72. — N. 3. — P. 385–436.
406. Kavvalakis, M.P. The atlas of dialkylphosphates; assessment of cumulative human organophosphorus pesticides' exposure / Kavvalakis M.P., Tsatsakis A.M. // *Forensic Sci. Int.* — 2012. — V. 218. — N. 1–3. — P. 111–122.

-
407. Garfitt, S.J. Exposure to the organophosphate diazinon: data from a human volunteer study with oral and dermal doses / S.J. Garfitt, K. Jones, H.J. Mason, J. Cocker // *Toxicology Letters*. – 2002. – V. 134. – P. 105–113.
408. Nolan, R.J. Chlorpyrifos: Pharmacokinetics in Human Volunteers' / R.J. Nolan, D.L. Rick, N.L. Freshour, J.H. Saunders // *Toxicology and applied pharmacology*. – 1984. – V. 73. – P. 8-15.
409. Colovic, M.B. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology / M.B. Colovic, D.Z. Krstic, T.D. Lazarevic-Pactic, A.M. Bondcic, V.M. Vasic // *Current Neuropharmacology*. – 2013. – V. 11. – P. 315-335.
410. Griffin, P. Oral and dermal absorption of chlorpyrifos: a human volunteer study / P. Griffin, H. Mason, K. Heywood, J. Cocker // *Occup. Environ. Med.* – 1999. – V. 56. – P. 10–13.
411. ГОСТ 12.1.007–76 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности.
412. Bachmann, K. Scaling Basic Toxicokinetic Parameters from Rat to Man / Bachmann K., Pardoe D., White D. // *Environ. Health Perspect.* –1996. – V. 104. – N. 4. – P. 400–407.
413. Allometric Species Comparison of Toluene and n-Hexane Metabolism: Prediction of Hepatic Clearance in Man from Experiments with Rodent Liver S9 in a Head Space Vial Equilibration System Bjarte Mortensen and Odd G. Nilsen *Pharmacology & Toxicology*. – 1998. – V. 82. – P. 183-188.
414. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А.Н. Миронова. — М.: Гриф и К, 2012. — 944 с.
415. C.R. Kirman, L.M. Sweeney M.E. Meek and M.L. Gargas Assessing the dose-dependency of allometric scaling performance using physiologically based pharmacokinetic modeling *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 38 (2003) 345–367
416. ГН 1.1.701-98 Гигиенические критерии для обоснования необходимости разработки ПДК и ОБУВ (ОДУ) вредных веществ в воздухе рабочей зоны, атмосферном воздухе населенных мест, воде водных объектов / сост.: проф. Б.А. Курляндский [и др.]. – М., 1998. – 44 с.
417. Методические указания по установлению ориентировочных безопасных уровней воздействия в воздухе рабочей зоны / сост.: И.В. Саноцкий [и др.]. – М., 1985. – 34 с.
418. Applications of Human Pharmacokinetic Prediction in First-in-Human Dose Estimation / Zou P. [и др.] // *The AAPS Journal*. — 2012. — V. 14. — N. 2. — P.262-281.
419. Estimating Xenobiotic Half-Lives in Humans from Rat Data: Influence of log P / Sarver J.G. [и др.] // *Env. Health Persp.* — 1997. — V. 105. — N. 11. — P. 1204-1209.
420. Tang, H. Controversies in Allometric Scaling for Predicting Human Drug Clearance: An Historical Problem and Reflections on What Works and What Does Not / Tang H., Mayersohn M. // *Curr. Topics in Med. Chem.* — 2011. — V. 11. — P. 340-350.

-
421. Mechanistic Determinants of Biotherapeutics Absorption Following SC Administration / Richter W.F. [и др.] // *The AAPS J.* — 2012. — V. 14. — N. 3. — P. 559-570.
422. Prediction of Human Pharmacokinetics from Preclinical Information of Rhein, an Antidiabetic Nephropathy Drug, Using a Physiologically Based Pharmacokinetic Model / Hao K. [и др.] // *Basic & Clin. Pharm. & Tox.* — 2014. — V. 114. — P. 160–167.
423. Kagan, L. Interspecies Pharmacokinetic Modeling of Subcutaneous Absorption of Rituximab in Mice and Rats / Kagan L., Zhao J., Mager D.E. // *Pharm Res.* — 2014. — V. 12. — P. 3265–3273.
424. Woo, S. Interspecies Comparisons of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Recombinant Human Erythropoietin / Woo S., Jusko W.J. // *Drug metabolism and disposition.* — 2007. — V. 35. — N. 9. — P. 1672-1678.
425. Tanii, H. Studies on the mechanism of acute toxicity of nitriles in mice / Tanii H., Hashimoto K. // *Arch Toxicol.* — 1984. — V. 55. — N. 1. — P. 47-54.
426. [электронный ресурс] US EPA; Estimation Program Interface (EPI) Suite. Ver.3.11. June 10, 2003. Available from, as of July 19, 2005.
427. Verschueren, K. Handbook of Environmental Data of Organic Chemicals. 2nd ed. New York, NY: Van Nostrand Reinhold Co., 1983., p. 315
428. Hansch, C., Leo, A., D. Hoekman. Exploring QSAR - Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants. Washington, DC: American Chemical Society., 1995., p. 15
429. Sangster J; LOGKOW Database. A databank of evaluated octanol-water partition coefficients (Log P). Available from, as of April 2, 2014.
430. Chemicals Inspection and Testing Institute; Biodegradation and Bioaccumulation Data of Existing Chemicals Based on the CSCL Japan ISBN 4-89074-101-1 p. (1992)
431. Lombardi, F. Determination of Hydroxylamine Traces in Propionohydroxamic Acid Bulk Drug and Pharmaceutical Preparations by Capillary Gas Chromatography / Lombardi F., Crolla T. // *J. Pharm. Sci.* — 1988. — V. 77. — N. 8. — P. 711–714.
432. Guzowski, J.P. A gas chromatographic method for the indirect determination of hydroxylamine in pharmaceutical preparations: conversion into nitrous oxide / Guzowski J.P., Golanoski C., Montgomery E.R. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* — 2003. — V. 33. — N. 5. — P. 963–974.
433. A simple and sensitive method for the determination of hydroxylamine in fresh-water samples using hypochlorite followed by gas chromatography / Seike Y. [и др.] // *Anal. Sci.* — 2004. — V. 20. — N. 1. — P. 139–142.
434. Crafts, R.C. Investigations into the Determination of Hydroxylamine in Viscosity-stabilised Natural Rubber / Crafts R.C., Davey J.E. // *J. Nat. Rubb. Res.* — 1996. — V. 11. — N. 1. — P. 1–8.

-
435. Fernando, P.N. Ion chromatographic determination of trace hydroxylamine in waste streams generated by a pharmaceutical reaction process / Fernando P.N., Egwu I.N., Hussain M.S. // *J. Chromatogr. A.* – 2002. — V. 956. — N. 1–2. — P. 261–270.
436. Deepa, B. Spectrophotometric Determination of Hydroxylamine and Its Derivatives / Deepa B., Balasubramanian N., Nagaraja K.S. // *Chem. Pharm. Bull.* — 2004. — V. 52. — N. 12. — P. 1473–1475.
437. Gupta, V.K. Simultaneous Determination of Hydroxylamine, Phenol and Sulfite in Water and Waste Water Samples Using A Voltammetric Nanosensor / Gupta V.K., Karimi–Maleh H., Sadegh R. // *Int. J. Electrochem. Sci.* — 2015. — V. 10. — P. 303–316.
438. Afkhami, A. Spectrophotometric determination of hydroxylamine and nitrite in mixture in water and biological samples after micelle-mediated extraction / Afkhami A., Madrakian T., Maleki A. // *Anal. Biochem.* — 2005. — V. 347. — P. 162–164.
439. Darke, D.J. Method for the measurement of hydroxylamine in colonic fluid using derivatization and gas chromatography / Darke D.J. // *J. Chromatogr.* – 1980. — V. 181. — P. 449–452.
440. Gas chromatographic–mass spectrometric analysis of hydroxylamine for monitoring the metabolic hydrolysis of metalloprotease inhibitors in rat and human liver microsomes / Peng S.X. [и др.] // *J. Chromatogr. B.* — 1999. — V. 724. — P. 181–187.
441. Gas Chromatography — Mass Spectrometric Determination of Unsymdimethylhydrazine in Soil and Water by Derivatization with Aromatic Aldehydes / Cathum S. [и др.] // *Can. J. Chem. Eng.* — 1998. — V. 76. — P. 680–685.
442. Gas chromatography–mass spectrometry analysis of alkylphenols in cod (*Gadus morhua*) tissues as pentafluorobenzoate derivatives / Meier S. [и др.] // *J. Chromatogr. A.* – 2005. — V. 1062. — N. 2. — P. 255–268.
443. Mueller, G.C. Displacement of Estradiol from Estrogen Receptors by Simple Alkyl Phenols / Mueller G.C., Kim U. // *Endocrinology.* — 1978. — V. — 102. — N. 5. — P. 1429–1435.
444. p-Nonylphenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene / Soto A.M. [и др.] // *Environ. Health Perspect.* — 1991. — V. 92. — P. 167–173.
445. Jobling, S. Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: An in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes / Jobling S., Sumpter J.P. // *Aquat. Toxicol.* – 1993. — V. 27. — I. 3–4. — P. 361–372.
446. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic / White R. [и др.] // *Endocrinology.* – 1994. — V. 135. — N. 1. — P. 175–182.
447. Уколов, А.И. Особенности фрагментации протонированных молекул изомерных алкилфенолов в условиях диссоциации, индуцированной соударениями / А.И. Уколов, И.Г. Зенкевич // *Масс-спектрометрия.* — 2014. — Т. 11. — № 1. — С. 29–35.

-
448. Routledge, E.J. Estrogenic activity of phenolic additives determined by an in vitro yeast bioassay / Routledge E.J., Sumpter J.P. // *J. Biol. Chem.* – 1997. — V. 272. — N. 6. — P. 3280–3288.
449. Tollefsen, K.E. Binding of alkylphenols and alkylated non-phenolics to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatic estrogen receptors / Tollefsen K.E., Nilsen A.J. // *Ecotoxicol. Environ. Safety.* – 2008. — V. 69. — N. 2. — P. 163–172.
450. De Nola, G. Determination of ortho-cresyl phosphate isomers of tricresyl phosphate used in aircraft turbine engine oils by gas chromatography and mass spectrometry / De Nola G., Kibby J., Mazurek W. // *J. Chromatogr. A.* – 2008. — V. 1200. — N. 2. — P. 211–216.
451. Sparling, J. The effects of ortho chloro substituents on the retention of PCB isomers in rat, rabbit, Japanese quail, guinea pig and trout / Sparling J., Safe S. // *Toxicol. Lett.* – 1980. — V. 7. — N. 1. — P. 23–28.
452. Analysis of non-ortho polychlorinated biphenyls and polychlorinated naphthalenes in Swedish dioxin survey samples / Asplund L. [и др.] // *Chemosphere.* — 1990. — V. 20. — N. 10–12. — P. 1481–1488.
453. Polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and non-ortho-PCBs in eggs of white-tailed sea eagles collected along the Swedish coast in the Baltic Sea / Nordlöf U. [и др.] // *Sci. Total Environ.* — 2012. — V. 438. — N. 1. — P. 166–173.
454. Rappoport, Z. *The Chemistry of Phenols* / Rappoport Z. New York: John Wiley & Sons, Ltd. – 2003. – 1506 p.
455. Уколов, А.И. Особенности фрагментации протонированных молекул изомерных алкилфенолов в условиях диссоциации, индуцированной соударениями / А.И. Уколов, И.Г. Зенкевич // *Масс-спектрометрия.* – 2014. – Т. 11. – № 1. – С. 29–35.
456. Уколов, А.И. Совершенствование безинкрементной аддитивной схемы оценки индексов удерживания для хромато-масс-спектрометрической идентификации продуктов регионеселективных органических реакций: дис. ... канд. хим. наук: 02.00.02 / Уколов Антон Игоревич. — СПб, 2012. — 185 с.
457. Development of quantitative structure gas chromatographic relative retention time models on seven stationary phases for 209 polybrominated diphenyl ether congeners / Wang Y. [и др.] // *J. Chromatogr. A.* — 2006. — V. 1103. — I. 2. — P. 314–328.
458. Breckler, P.N. Relative retention time changes with temperature for the gas chromatographic identification of volatile oil components / Breckler P.N., Betts T.J. // *J. Chromatogr. A.* — 1970. — V. 53. — I. 2. — P. 163–170.
459. Extraction of Mass Spectra Free of Background and Neighboring Component Contributions from Gas chromatography / Dromey R.G. [и др.] // *Mass Spectrom. Data. Anal. Chem.* — 1976. — V. 48. — I. 9. — P. 1368–1375.

-
460. An Evaluation of Automated Spectrum Matching for Survey Identification of Wastewater Components by Gas Chromatography–Mass Spectrometry / Shackelford W.M. [и др.] // *Anal. Chim. Acta.* — 1983. — V. 146. — P. 25–27.
461. Mallard W. G., Reed J. AMDIS — USER GUIDE. U.S. Department of Commerce. Technology Administration. National Institute of Standards and Technology (NIST). Standard Reference Data Program. Gaithersburg, MD 20899.
462. Systems biology investigation to discover metabolic biomarkers of acetaminophen–induced hepatic injury using integrated transcriptomics and metabolomics / Sun J. [и др.] // *J. Mol. Biomark. Diagn.* — 2013. — V. S1. — P. 1–11.
463. Comprehensive analysis of alterations in lipid and bile acid metabolism by carbon tetrachloride using integrated transcriptomics and metabolomics / Sun J. [и др.] // *Metabolomics.* — 2014. — V. 10. — N. 6. — P. 1293–1304.
464. Michell, R.H. Inositol and its derivatives: their evolution and functions / Michell R.H. // *Adv. Enzyme Regul.* — 2011. — V. 51. — N. 1. — P. 84–90.
465. Lentner, C. Geigy Scientific Tables, 8th Rev edition / Lentner C., Cadwell W. Basel, Switzerland: Ciba–Geigy Corp. — 1985. — 295 p.
466. D-chiro-inositol metabolism in diabetes mellitus / Ostlund R.E. [и др.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1993. — V. 90. — N. 21. — P. 9988–9992.
467. Garcia-Bunuel, L. Cerebrospinal fluid levels of free myoinositol in some neurological disorders / Garcia-Bunuel L., Garcia-Bunuel V.M. // *Neurology.* — 1965. — V. 15. — P. 348–350.
468. Clement, R. Diabetes Mellitus and Obesity. in B. Brodoff and S. Bleicher (Editors) / Clement, R. Baltimore: Williams and Wilkins. — 1982. — 117 p.
469. Smith, S.L. Elevation of certain polyols in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis / Smith S.L., Novotny M., Karmen A. // *J. Chromatogr.* — 1984. — V. 336. — P. 351–355.
470. Heimark, D. Decreased myo–inositol to chiro–inositol (M/C) ratios and increased M/C epimerase activity in PCOS theca cells demonstrate increased insulin sensitivity compared to controls / Heimark, D., McAllister J., Lerner J. // *Endocr. J.* — 2014. — V. 61. — N. 2. — P. 111–117.
471. Determination of Urinary Myo–/Chiro–Inositol Ratios from Korean Diabetes Patients / Jung T.S. [и др.] // *Yonsei Med. J.* — 2005. — V. 46. — N. 4. — P. 532–538.
472. Quantitative analysis of polyols in human plasma and cerebrospinal fluid / Kusmierz J. [и др.] // *J. Chromatogr.* — 1989. — V. 497. — P. 39–48.
473. Ethoximation–silylation approach for mono– and disaccharide analysis and characterization of their identification parameters by GC/MS / Becker M. [и др.] // *Talanta.* — 2013. — V. 115. — P. 642–651.
474. Gas Chromatographic Retention of Carbohydrate Trimethylsilyl Ethers. III. Ketohexoses / García-Raso A. [и др.] // *J. Chromatogr. A.* — 1989. — V. 471. — P. 205–216.

-
475. Andrews, M.A. Capillary gas-chromatographic analysis of monosaccharides: improvements and comparisons using trifluoroacetylation and trimethylsilylation of sugar O-benzyl- and O-methyl-oximes / Andrews M.A. // *Carbohydr. Res.* — 1989. — V. 194. — P. 1–19.
476. Amelung, W. Neutral and acidic sugars in soil as determined by capillary gas liquid chromatography after trifluoroacetic acid hydrolysis / Amelung W., Cheshire M.V., Guggenberger G. // *Soil Biol. Biochem.* — 1996. — V. 28. — P. 1631–1639.
477. Rumpel, C. Gas chromatographic analysis of monosaccharides in a forest soil profile: Analysis by gas chromatography after trifluoroacetic acid hydrolysis and reduction–acetylation / Rumpel C., Dignac M.F. // *Soil Biol. Biochem.* — 2006. — V. 38. — P. 1478–1481.
478. Blau, K. *Handbook of Derivatives for Chromatography* / Blau K., Halket J.M. New York: Wiley. — 1993. — 392 p.
479. Mason, B.S. A gas chromatographic method for determination of sugar in foods / Mason B.S., Slover H.T. // *J. Agric. Food Chem.* — 1971. — V. 19. — P. 551–554.
480. Патент № WO 2016123565 A1, 30.01.2015. N-acetyl glucosamine as a biomarker of ms disease course // Патент № PCT/US2016/015807. 2015 / Demetriou M., Brandt A., Friedmann P., Dennis J.
481. Blaise, B.J. Data-Driven Sample Size Determination for Metabolic Phenotyping Studies / Blaise B.J. // *Anal. Chem.* — 2013. — V. 85. — P. 8943–8950.
482. Eng, J. Sample size estimation: how many individuals should be studied? / Eng J. // *Radiology.* — 2003. — V. 227. — N. 2. — P. 309–313.
483. Dell, R.B. Sample Size Determination / Dell R.B., Holleran S., Ramakrishnan R. // *Inst. Lab. Anim. Res. J.* — 2002. — V. 43. — P. 207–213.
484. A Guideline to Univariate Statistical Analysis for LC/MS-Based Untargeted Metabolomics-Derived Data / Vinaixa M. [и др.] // *Metabolites.* — 2012. — V. 2. — P. 775–795.
485. Data-processing strategies for metabolomics studies / Hendriks M.M.W.B. [и др.] // *TrAC Trends Anal. Chem.* — 2011. — V. 30. — P. 1685–1698.
486. Уколов, А.И. Влияние хронического ингаляционного воздействия малых доз алифатических углеводов С6-С10 на метаболические профили головного мозга и печени крыс / А.И. Уколов, Е.Д. Кессених, Т.И. Орлова, Е.И. Савельева, А.С. Радиков, Н.В. Гончаров // *Токсикологический вестник.* — 2017. — №3. — С. 31–41.
487. Орлова, Т.И. Совершенствование двухстадийной методики хроматомасс-спектрометрического определения свободных и этерифицированных жирных кислот в биологических образцах: дис. ... канд. хим. наук: 02.00.02 / Орлова Татьяна Игоревна. — СПб, 2016. — 119 с.
488. Bhatt, A. Effect of Hexacarbons on Selected Lipids in Developing Rat Brain and Peripheral Nerves / Bhatt A., Khan S., Pandya K.P. // *J. Appl. Toxicol.* — 1988. — V. 8. — N. 1. — P. 53–57.

-
489. Gillies, P.J. Inhibition of sterologenesiс but not glycolyсiс in 2,5-hexanedione induced distal axonopathy in the rat / Gillies P.J., Norton R.M., Bus J.S. // *Toxicol. Appl. Pharm.* — 1981. — V. 9. — P. 287–292.
490. Taranova, N.P. Intensity of acetate-2-¹⁴C incorporation into brain and spinal cord phospholipids and cholesterol of healthy guinea pigs and those poisoned with Tri-o-cresylphosphate / Taranova N.P. // *Bull. Exp. Biol. Med.* — 1976. — V. 85. — P. 427–429.
491. Sodium arsenate induce changes in fatty acids profiles and oxidative damage in kidney of rats / Kharroubi W. [и др.] // *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* — 2014. — V. 20. — P. 12040–12049.
492. Cocchi, M. Fatty Acids, Membrane Viscosity, Serotonin and Ischemic Heart Disease / Cocchi M., Tonello L., Lercker G. // *Lipids in Health and Disease.* — 2010. — V. 9. — P. 97–100.
493. Damiano, F. Functional analysis of rat liver citrate carrier promoter: differential responsiveness to polyunsaturated fatty acids / Damiano F., Gnoni G.V., Siculella L. // *Biochem. J.* — 2009. — V. 417. — N. 2. — P. 561–571.
494. Effects of hydrogen peroxide on membrane fluidity and Ca(2+)–transporting ATPase activity of rabbit myocardial sarcoplasmic reticulum / Su Z. [и др.] // *Acta Pharmacol. Sinica.* — 1993. — V. 14. — N. 5. — P. 393–396.
495. The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane / Yehuda S. [и др.] // *Neurobiol. Aging.* — 2002. — V. 23. — N. 5. — P. 843–853.
496. Long-term treatment with 2,5-hexanedione has no effect on the specific activity of some brain and liver glycolytic enzymes of adult rats / Pereira M.E. [и др.] // *Braz. J. Med. Biol. Res.* — 1991. — V. 24. — N. 7. — P. 735–740.
497. Goel, S.K. Hepatotoxic effects elicited by n-hexane or n-heptane / Goel S.K., Rao G.S., Pandya K.P. // *J. Appl. Toxicol.* — 1988. — V. 8. — N. 2. — P. 81–84.
498. Fatty acid analysis of blood serum, seminal plasma / Conquer J.A. [и др.] // *Lipids.* — 1999. — V. 34. — P. 793–799.
499. Dotan, Y. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress / Dotan Y., Lichtenberg D., Pinchuk I. // *Prog. Lipid. Res.* — 2004. — V. 43. — P. 200–227.
500. Acetaminophen-induced liver injury: implications for temporal homeostasis of lipid metabolism and eicosanoid signaling pathway / Suci M. [и др.] // *Chem.-Biol. Interact.* — 2015. — V. 242. — P. 335–344.
501. Al-Assaf, A.H. Preventive Effect of Corosolic Acid on Lipid Profile Against Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxic Rats / Al-Assaf A.H. // *Pakistan J. Nutrition.* — 2013. — V. 12. — N. 8. — P. 748–752.
502. Kosicek, K. Phospholipids and Alzheimer's Disease: Alterations, Mechanisms and Potential Biomarkers / Kosicek K., Hecimovic S. // *Int. J. Mol. Sci.* — 2013. — V. 14. — P. 1310–1322.
503. Effects of chronic ethanol administration on rat brain phospholipid metabolism / Sun G.Y. [и др.] // *J. Neurochem.* — 1987. — V. 48. — P. 974–980.

-
504. Morell, P. Characteristic Composition of Myelin. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, et al., editors. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th edition / Morell P., Quarles R.H. Philadelphia: Lippincott–Raven. — 1999. — 365 p.
505. Klein, J. Membrane breakdown in acute and chronic neurodegeneration: focus on choline-containing phospholipids / Klein J. // *J. Neural. Transm.* – 2000. - V. 107. - P. 1027–1063.
506. Alterations in cerebrospinal fluid glycerophospholipids and phospholipase A2 activity in Alzheimer's disease / Fonteh A.N. [и др.] // *J. Lipid. Res.* — 2013. — V. 54. — N. 10. — P. 2884–2897.
507. Lysophosphatidic Acid signaling in the nervous system / Yung Y.C. [и др.] // *Neuron.* — 2015. — V. 85. — N. 4. — P. 669–682.
508. Steroid binding to Autotaxin links bile salts and lysophosphatidic acid signaling / Matas-Rico E. [и др.] // *Nat. Commun.* — 2016. — V. 7. — N. 11248. — P. 1–10.
509. Divecha, N. Phospholipid signaling / Divecha N., Irvine R.F. // *Cell.* — 1995. — V. 80. — P. 269–278.
510. O'Regan, M.H. Phospholipase A2–evoked destabilization of planar lipid membranes / O'Regan M.H., Alix S., Woodbury D.J. // *Neurosci. Lett.* – 1996. — V. 202. — P. 201–203.
511. Apoptotic Cells Induce Migration of Phagocytes via Caspase–3–Mediated Release of a Lipid Attraction Signal / Lauber K. [и др.] // *Cell.* — 2003. — V. 113. — I. 6. – P. 717–730.
512. Lysophosphatidylcholine (lysolecithin) and its synthetic analogues. Immunomodulating and other biologic effects / Munder P.G. [и др.] // *Springer Seminars in Immunopathology.* — 1979. — V. 2. — I. 2. — P. 187–203.
513. Bazan, N.G. Mediators of injury in neurotrauma: intracellular signal transduction and gene expression / Bazan N.G., de Turco R., Allan G. // *J. Neurotrauma.* — 1995. — V. 12. — P. 791–814.
514. Lysophosphatidylcholine and Carotid Intima–Media Thickness in Young Smokers: A Role for Oxidized LDL–Induced Expression of PBMC Lipoprotein–Associated Phospholipase A2? / Pasini A.F. [и др.] // *PLoS One.* — 2013. — V. 8. — N. 12. — P. e83092.
515. Bazan, N.G. Effects of ischemia and electroconvulsive shock on free fatty acid pool in the brain / Bazan N.G. // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1970. — V. 218. — P. 1–10.
516. Fatty acid composition of brain phospholipids in aging and Alzheimer's disease / Söderberg M. [и др.] // *Lipids.* — 1991. — V. 26. — P. 421–425.
517. Significance of plasma lysolecithin in patients with multiple sclerosis: a longitudinal study / Andreoli V.M. [и др.] // *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* — 1973. — V. 36. — P. 661–667.
518. Evaluation of Serum Bile Acid Profiles as Biomarkers of Liver Injury in Rodents / Luo L. [и др.] // *Toxicol. Sci.* — 2014. — V. 137. — N. 1. — P. 12–25.
519. Solca, C. Dietary xenosterols lead to infertility and loss of abdominal adipose tissue in sterolin–deficient mice / Solca C., Tint G.S., Patel S.B. // *J. Lipid Res.* — 2013. — V. 54. — № 2. — P. 397–409.

-
520. Devkota, S. Interactions between Diet, Bile Acid Metabolism, Gut Microbiota, and Inflammatory Bowel Diseases / Devkota S., Chang E.B. // *Dig. Dis.* — 2015. — V. 33. — № 3. — P. 351–356.
521. The influence of amylin on the bile acid spectrum in rats / Vasheka I.P. [и др.] // *Fiziol. Zh.* — 2014. — V. 60. — № 3. — P. 46–53.
522. Bradlow, H.L. Obesity and the gut microbiome: pathophysiological aspects / Bradlow H.L. // *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* — 2014. — V. 17. — № 1. — P. 53–61.
523. Vitvitsky, V. Taurine biosynthesis by neurons and astrocytes / Vitvitsky V., Garg S.K., Banerjee R. // *J. Biol. Chem.* — 2011. — V. 286. — № 37. — P. 32002–32010.
524. Banerjee, R. The undertow of sulfur metabolism on glutamatergic neurotransmission / Banerjee R., Vitvitsky V., Garg S.K. // *Trends Biochem. Sci.* — 2008. — V. 33. — P. 413–419.
525. Altered taurine release following hypotonic stress in astrocytes from mice deficient for GFAP and vimentin / Ding M. [и др.] // *Mol. Brain Res.* — 1998. — V. 62. — № 1. — P. 77–81.
526. Antinociceptive effect of intrathecal administration of taurine in rat models of neuropathic pain / Terada T. [и др.] // *Can. J. Anaesth.* — 2011. — V. 58. — № 7. — P. 630–637.
527. Enhancement of cysteine catabolism into taurine impacts glutathione homeostasis in rats challenged with ethanol / Ahn C.W. [и др.] // *Amino Acids.* — 2015. — V. 47. — № 6. — P. 1273–1277.
528. Central Role of Pyrophosphate in Acellular Cementum Formation / Foster B.L. [и др.] // *PLoS One.* — 2012. — V. 7. — № 6. — P. e38393.
529. Central role of pyrophosphate in acellular cementum formation / Nadel Y. [и др.] // *J. Med. Chem.* — 2014. — V. 57. — № 11. — P. 4677–4691.
530. Токсические и сигнальные эффекты активных форм кислорода / Надеев А.Д. [и др.] // *Токсикол. Вестн.* 2014. Т. 2. С. 22–27.
531. Белова, М.В. Окислительный стресс в неотложной токсикологии / Белова М.В., Ильяшенко К.К., Лужников Е.А. // *Общая реаниматология.* - 2009. — Т. 6. — С. 40–44.
532. Landaas, S. Clinical conditions associated with urinary excretion of 2-hydroxybutyric acid / Landaas S., Pettersen J.E. // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* — 1975. — V. 35. — № 3. — P. 259–266.
533. Alpha-hydroxybutyrate is an early biomarker of insulin resistance and glucose intolerance in a nondiabetic population / Gall W.E. [и др.] // *PLoS One.* — 2010. — V. 5. — № 5. — P. e10883.
534. Effects of Hypoxia on Urinary Organic Acid and Hypoxanthine Excretion in Fetal Sheep / Walker V. [и др.] // *Pediatric Res.* — 1996. — V. 40. — P. 309–318.
535. Hu, J. Polyamines inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum / Hu J., Mahmoud M.I., El-Fakahany E.E. // *Neurosci. Lett.* — 1994. — V. 175. — P. 41–45.
536. Reddy, G.S. Calcitroic acid, end product of renal metabolism of 1,25-dihydroxyvitamin D3 through C-24 oxidation pathway / Reddy G.S., Tserng K.Y. // *Biochemistry.* — 1989. — V. 28. — № 4. — P. 1763–1769.

-
537. 24-Hydroxylase in cancer: impact on vitamin D-based anticancer therapeutics / Luo W. [и др.] // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* — 2013. — V. 136. — P. 252–257.
538. Petkovich, M. CYP24A1 and kidney disease / Petkovich M., Jones G. // *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* — 2011. — V. 20. — № 4. — P. 337–344.
539. Mydlík, M. Vitamin B6 and oxalic acid in clinical nephrology / Mydlík M., Derzsiová K. // *J. Ren. Nutr.* — 2010. — V. 20. — № 5. — P. S95–S102.
540. Taurine reverses neurological and neurovascular deficits in Zucker diabetic fatty rats / Li F. [и др.] // *Neurobiol. Dis.* — 2006. — V. 22. — № 3. — P. 669–676.
541. Tandan, R. Giant axonal neuropathy: studies with sulfhydryl donor compounds / Tandan R., Bradley W.G., Fillyaw M.J. // *J. Neurol. Sci.* — 1990. — V. 95. — P. 153–162.
542. Effects of Lipoic Acid in Hexacarbon-Induced Neuropathy / Altenkirch H. [и др.] // *Neurotoxicol. Teratol.* — 1990. — V. 12. — P. 619–622.
543. Jones, D.P. Redox sensing: orthogonal control in cell cycle and apoptosis signaling / Jones D.P. // *J. Intern. Med.* — 2010. — V. 268. — № 5. — P. 432–448.
544. The hemodynamic effects of methylene blue when administered at the onset of cardiopulmonary bypass / Maslow A. [и др.] // *Anesth Analg.* — 2006. — V. 103.— P. 2–8.