

*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**

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени  
доктора химических наук

**Краснодар  
2019**

Диссертационная работа выполнена в Федеральном государственном унитарном предприятии "Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека" Федерального медико-биологического агентства

Научный консультант: **Радилов Андрей Станиславович**  
доктор медицинских наук, профессор,  
заведующий отделом токсикологии, и.о.  
директора ФГУП "НИИ ГПЭЧ" ФМБА России

Официальные оппоненты: **Шпигун Олег Алексеевич** –  
чл.-корр. РАН, доктор химических наук,  
профессор МГУ имени М.В. Ломоносова

**Карцова Людмила Алексеевна** –  
доктор химических наук, профессор, ФГБОУ  
ВО «Санкт-Петербургский государственный  
университет», профессор кафедры  
органической химии

**Савчук Сергей Александрович** –  
доктор химических наук, главный научный  
сотрудник отдела специальных и  
инновационных исследований Российского  
центра судебно-медицинской экспертизы

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное  
научное учреждение «**Институт  
экспериментальной медицины**»

Защита диссертации состоится "17" октября 2019 г. в 14 часов 00 минут на заседании диссертационного совета Д 212.101.16 при ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет» по адресу: 350040, Краснодар, ул. Ставропольская д. 149, ауд. 3030Л.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», на сайтах ВАК Минобрнауки РФ <http://vak.ed.gov.ru> и ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет» <http://www.kubsu.ru>.

Автореферат разослан " " 2019 г.

Ученый секретарь  
диссертационного  
совета



Киселева  
Наталья Владимировна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

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. 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").

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. 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. 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). 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. Принципы использования методов экстракционного вымораживания в химико-токсикологическом анализе разработаны В.Н. Бехтеревым.

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 ( $\text{NH}_2\text{OH}$ , 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.

Выявлению 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 углеводов, гидроксиламина (ГА), 1,4-дихлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутен-2(ДХГФ) и *O*-изобутил-*S*-(2-диэтиламиноэтил)-метилтиофосфоната (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. 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.

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

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 R1316, 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,  $\text{CH}_3\text{I}$ , ТФА, МТБСТФА и  $\text{As}_2\text{O}$  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, дисульфида углерода, метакрилонитрила, пентахлорэтана, аллилхлорида, акрилонитрила, бутилхлорида, хлорацетонитрила, этилметакрилата, диэтилового эфира, метилакрилата, метилметакрилата, нитробензола, 2-нитропропана и гексахлорэтана), а также гидроксилламина.

Разработана методика определения гидроксилламина 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

квадруполь (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 C<sub>4</sub>-C<sub>9</sub> в отличие от других изомеров образуют характеристические ионы [M+H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>.

С использованием разработанной методики определения свободных и этерифицированных жирных кислот выявлены механизмы действия RVX и низких концентраций алифатических углеводородов 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, глиоксалевой 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<sub>31</sub> 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)<sup>1</sup>, ЛФХ(18:0), ЛФХ(18:1), ЛФХ(18:2) и ЛФХ(20:5) в плазме крови. Отношение концентраций ЛФХ(18:1) и ГФХ<sup>2</sup> 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

---

<sup>1</sup>ЛФЭ – лизофосфатидилэтанолamины, ЛФХ – лизофосфатидилхолины. В скобках указаны количество атомов углерода в ацильных остатках и количество двойных связей C=C;

<sup>2</sup>Глицерофосфохолин.

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).

Результаты обнаружения и идентификации биомаркеров легли в основу обоснования предельно допустимых концентраций смесей алифатических углеводородов C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> и C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> (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. Показано, что биомаркеры ДХГФ, гидроксиламина 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 C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> в организм на уровне концентраций от 5.2 мг/м<sup>3</sup>, УВ C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> на уровне концентраций от 50.2 мг/м<sup>3</sup>, ДХГФ на уровне концентраций от 18.8 мг/м<sup>3</sup>;

- факт перорального поступления 22.6 мкг/кг гидроксиламина, летучих промышленных токсикантов в период от суток до 6 дней после отравления дозами 0.22 мг/кг, эквивалентными от 3×10<sup>-5</sup> DL<sub>50</sub> до 9×10<sup>-3</sup> DL<sub>50</sub>, фосфорорганических пестицидов (ФОП) - в течение 6 дней после отравления дозами 1-50 мг/кг, эквивалентными от 1/50 DL<sub>50</sub> до 1/10 DL<sub>50</sub>, а также RVX - в течение 7 дней после отравления дозами 9.6 мкг/кг, эквивалентными от 2×0.4 DL<sub>50</sub> 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 безэталонной 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.); "15<sup>th</sup> 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, 2 главы в монографиях, двое методических рекомендаций, 25 работ, опубликованных 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 — 545 наименований.

### **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Во введении** дано обоснование актуальности темы и сформулированы цели работы.

**1-я глава** (обзор литературы) включает разделы, посвященные характеристике методов токсиколого-аналитического скрининга, высокоселективных процедур определения ксенобиотиков и их метаболитов в биопробах, инструментальных методов метаболического профилирования биологических образцов и методов обработки данных в нецелевом анализе. Обоснованы концепции биомаркеров и биоаналитического мониторинга в химико-токсикологических исследованиях.

Во **2-й главе** (экспериментальная часть) рассмотрены объекты и методы исследования. *Хроматомасс-спектрометрический анализ* выполняли на газовых хроматомасс-спектрометрах QP5000 и QP2010Plus (Shimadzu, Япония), 5975C и 7000 – с тандемным детектированием (Agilent Technologies, США), высокоэффективных жидкостных хроматомасс-

спектрометрах высокого разрешения LTQ Velos и Q-Exactive (Thermo Scientific).

**Экспериментальное моделирование интоксикаций органическими соединениями** выполнено с использованием белых беспородных крыс-самцов и кроликов-самцов породы шиншилла (моделирование проведено коллективом лаборатории общей токсикологии НИИ ГПЭЧ). Условия содержания экспериментальных животных соответствовали "Правилам лабораторной практики в Российской Федерации (GLP)".

**Нецелевое метаболическое профилирование** включало следующие стадии: введение внутренних стандартов (3-фторбензойной, 4-диметиламиномасляной и пальмитиновой-d<sub>31</sub> кислот), депротеинизация метанолом, высушивание под током азота, метоксимирование раствором метоксиамин в пиридине и силилирование МСТФА с последующим ГХ-МС анализом. Для обработки результатов использовали подход, заключающийся в использовании разработанной автором и оптимизированной базы хроматомасс-спектрометрических характеристик эндогенных соединений и системы автоматической идентификации и деконволюции (AMDIS).

Подготовка проб для высокоэффективной жидкостной хроматомасс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС) заключалась в депротеинизации образцов метанолом в соотношении 1 к 4 и центрифугировании.

**Определение свободных и этерифицированных жирных кислот** в плазме крови и гомогенатах органов проводили в соответствии с разработанной Т.И. Орловой методикой. Остальные методы приведены в тексте диссертации, включая методики скрининга, количественного измерения концентраций рассматриваемых соединений, их метаболитов и пр.

В **3-й главе** (результаты и их обсуждение) 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 скрининга: методы выявления биомаркеров экспозиции в токсиколого-аналитическом скрининге дополнены методиками количественного анализа, а также методами выявления биомаркеров эффекта с помощью целевой и нецелевой метабономики. Общая схема представлена на рис. 1.

В **разделе 3.1** рассмотрены подходы к расширенному токсиколого-аналитическому скринингу для повышения эффективности выявления биомаркеров экспозиции. Отличительными особенностями используемого подхода является включение в скрининг стадии парофазного анализа для выявления легколетучих соединений, а также оптимизированные методы дериватизации аналитов после экстракционного вымораживания для повышения надежности их безэталонной идентификации. Ключевым моментом скрининга является совмещение высокой производительности за счет автоматизированной обработки результатов ГХ-МС анализа и надежности за счет снижения вероятности ошибок идентификации как I, так и II рода.

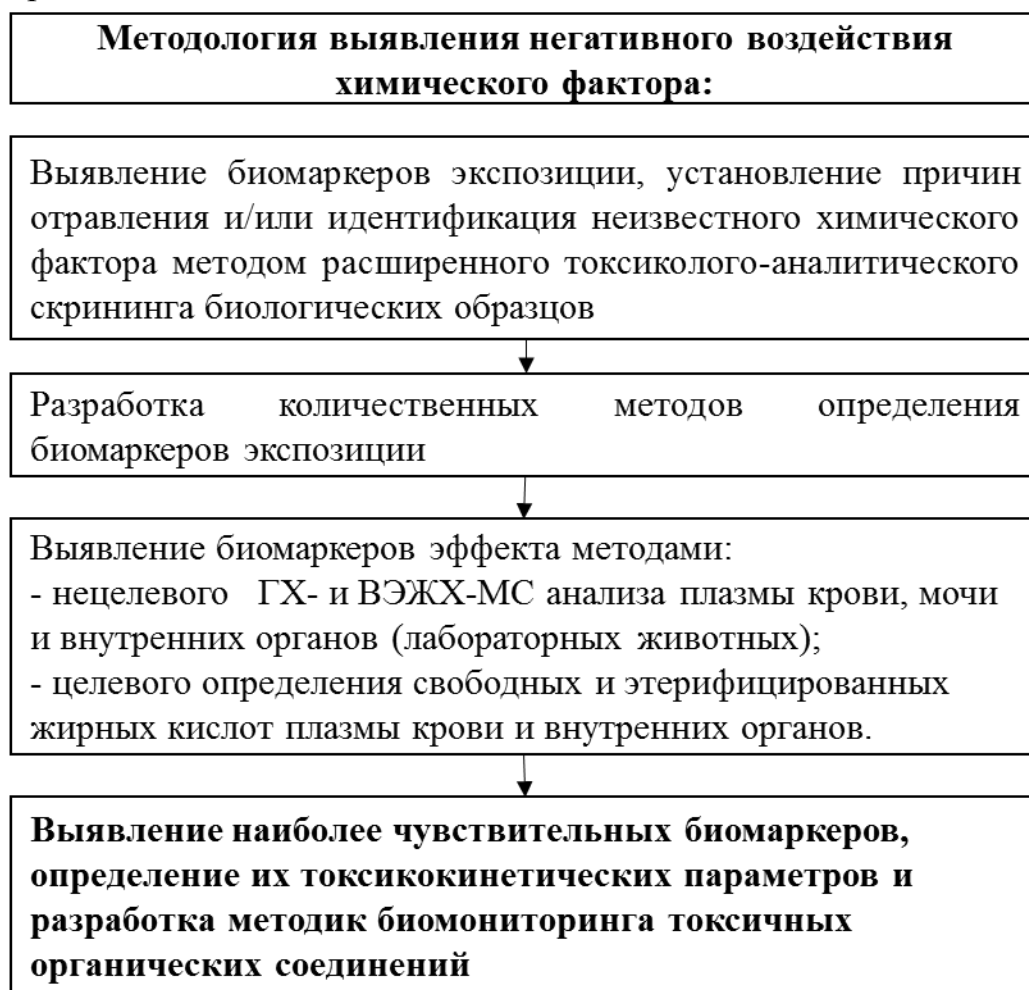


Рис. 1 - Принципиальная схема методологии выявления негативного химического фактора методами хроматомасс-спектрометрии

Для минимизации вероятности ложноотрицательных ответов предложен режим настройки автоматической интерпретации хроматомасс-

спектрометрических данных с получением условно ложноположительных ответов в каждом рапорте и их последующей экспертной проверкой.

В режиме безэталонной идентификации используются как коммерческие библиотеки масс-спектров большого объема, так и собственные библиотеки малого объема. Задаваемая величина фактора совпадения (P, %) тем выше, чем меньше объем библиотеки (70–95 %). Идентификация по индексам удерживания (ИУ) проводилась на этапе принятия или отклонения предварительного результата масс-спектрометрической идентификации. Из доступных справочных величин ИУ выбиралась наиболее близкая по фазе колонки, режиму хроматографирования и методу расчета. При отсутствии справочного значения ИУ ориентировочную оценку его значения проводили расчетным методом.

Экстракция наибольшего количества соединений различной химической природы достигается при различных значениях pH. Извлечение анализов ацетонитрилом (полярным растворителем) при pH 2 и pH 9, а также диэтиловым эфиром (слабополярным растворителем) в режиме экстракционного вымораживания позволяет выделять соединения кислотного, основного и нейтрального характера.

Анализ паровой фазы в режиме твердофазной микроэкстракции позволяет проводить идентификацию токсикологически актуальных легколетучих веществ: алкоголь, суррогаты алкоголя, технические жидкости. В **разделе 3.1.1** приведены результаты выявления неэтанольных маркеров алкогольной интоксикации. Преимуществом твердофазной микроэкстракции анализов из пара, находящегося в контакте с характеризуемым образцом, является отсутствие растворителя, перекрывающего область легколетучих биомаркеров и отсутствие ограничений, связанных с характером биоматрицы, что открывает возможность анализа таких проблемных биоматриц как цельная кровь и ее гемолизат, гомогенаты органов и тканей, экскременты и др.

Примеры, показывающие необходимость включения стадии твердофазной экстракции анализов из равновесного пара в скрининг, получены при апробации метода определения токсичных соединений в крови и моче пациентов отделения токсикологии НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе (**раздел 3.1.2**).

Из сравнения результатов стандартного химико-токсикологического анализа и результатов проведенного скрининга следует, что результаты анализов, проведенных методом ГХ-МС в режиме расширенного скрининга, существенно дополняют и корректируют сведения о причинах отравлений. Так, в крови одного из пациентов, помимо феназепама, благодаря



парофазному анализу был обнаружен толуол, при этом в моче пациента обнаружен метаболит толуола - *m*-крезол, что подтверждает факт отравления технической толуолсодержащей жидкостью.

В разделах 3.1.3 и 3.1.4 показаны примеры эффективного использования различных дериватирующих агентов и подтверждения результатов ГХ-МС скрининга с использованием tandemного детектирования (ГХ-МС/МС) или детектирования высокого разрешения.

Использование нескольких дериватирующих агентов, наряду с анализом экстрактов без дериватизации, позволяет значительно повысить эффективность обращения к базам данных в токсиколого-аналитическом скрининге. Поскольку искомое вещество заранее неизвестно, невозможно предсказать, какой способ дериватизации будет оптимален при его определении, а также в виде какого производного он окажется представленным в доступных базах данных, поэтому целесообразно на стадии подготовки проб алиquotировать экстракты и обрабатывать их разными дериватирующими агентами. При этом вероятность открытия и последующего подтверждения искомого ксенобиотика, либо его метаболита возрастает многократно. Так, масс-спектр триметилсилильного эфира *N,N*-диметиламинофенола не содержится ни в одной библиотеке масс-спектров, и только анализ ацетилированного и нативного экстрактов позволил установить структуру и обнаружить факт употребления пациентом сильнодействующего препарата – прозерина, что было подтверждено методами ВЭЖХ-МС с использованием стандарта аптечного препарата и совпало с клинической картиной отравления пациента, находившегося в коме.

Дополнительная апробация метода расширенного токсиколого-аналитического скрининга проводилась при выполнении межлабораторного сличительного эксперимента (раздел 3.1.5): в тестовой пробе, приготовленной организаторами эксперимента путем пулирования мочи нескольких пациентов, обнаружены пропофол, диазепам, хлорпромазин и два его метаболита, галоперидол и его метаболит, пировалерон и так называемый "AB-CHMINACA" – синтетический каннабиноид имидазольного ряда. Проверка полученных результатов автоматической интерпретации масс-спектров была выполнена путем сравнения экспериментально зарегистрированных газохроматографических линейных индексов удерживания с доступными библиотечными значениями. Подтверждение полученных результатов было выполнено путем определения точных масс аналитов методом ВЭЖХ-МС высокого разрешения, отклонения экспериментальных масс от теоретических составили не более 1 ppm. Несмотря на то, что анализ был

выполнен нами в отсутствие образцов сравнения определяемых веществ, все тестовые вещества были идентифицированы верно и ни одного ложноположительного результата получено не было.

Использование твердофазной микроэкстракции в режиме парофазного анализа в токсиколого-аналитическом скрининге позволяет не только выявлять отравление техническими жидкостями, но и проводить биоаналитический мониторинг низкоуровневого воздействия летучих органических соединений. Примеры определения биомаркеров после ингаляционного экспонирования лабораторных животных смесью углеводородов с числом атомов углерода от 1 до 5 методом ГХ-МС-ТФМЭ приведены в **разделе 3.2.3**. Показано дозозависимое увеличение концентраций ацетона и бутанола-1 в плазме крови крыс, экспонированных различными концентрациями смеси углеводородов. В плазме крови крыс обнаружены метаболиты трех основных углеводородов, составляющих 66% от массы всей смеси: ацетон, *трет*-бутанол, бутанон-2 и бутанол-1. Метаболиты пентана и изопентана не выявлены в крови, возможно, из-за крайне низких содержаний в смеси - 3% и 5%, соответственно. Неметаболизированные формы углеводородов в исследованных пробах обнаружены не были.

Показано, что непрерывное ингаляционное воздействие газовой смеси предельных углеводородов C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> с концентрацией 1250 ± 52 мг/м<sup>3</sup> приводит к достоверному повышению концентрации ацетона и *n*-бутанола в крови подопытных крыс. Воздействие смеси с концентрацией 256 ± 16 мг/м<sup>3</sup> приводит к достоверному повышению содержания в крови только ацетона. Концентрация смеси алифатических углеводородов в воздухе менее 50 ± 6 мг/м<sup>3</sup> при хроническом ингаляционном воздействии не вызывает напряжения механизмов биотрансформации и, следовательно, является недействующей. Ацетон и *n*-бутанол могут быть использованы в тестах экспозиции углеводородами для персонала и населения, проживающего вблизи нефтеперерабатывающих заводов.

По результатам мониторинга могут быть сформированы группы риска для углубленного обследования и подтверждения причинно-следственных связей в системе фактор-среда-здоровье человека.

Мониторинг воздействия летучих и газообразных химических соединений должен включать парофазный анализ в качестве обязательного модуля, что подтверждается примерами обнаружения летучих биомаркеров труднолетучих соединений. Так, в **разделе 3.2.1** показано, что факт экспозиция дихлофосом может быть установлен только при идентификации легколетучего 2,2-дихлорэтанола или его метаболитов II

фазы. Интактная форма дихлофоса не определяется в крови уже через 1 час после воздействия.

На примере разработанной процедуры мониторинга воздействия ФОП продемонстрирована эффективность методологии выявления биомаркеров экспозиции: определение нативной формы ксенобиотика с использованием образца сравнения и аттестованной методики, в сочетании с безэталонным определением метаболитов различными хромато-масс-спектрометрическими методами, включающими ГХ-МС паровой фазы и экстрактов, а также ВЭЖХ-МС биологических образцов. Показана эффективность сочетания методов расширенного токсиколого-аналитического скрининга и целевого биоаналитического мониторинга в рамках унифицированных процедур инструментального анализа.

Ранее в РФ отсутствовали методики оценки низкоуровневого воздействия пестицидов на человека. Экспозиция ФОП обычно выявляется через определение активности ацетилхолинэстеразы в крови, однако этот метод не обладает достаточной селективностью и чувствительностью для установления экспозиции низкими дозами. Интерпретация таких результатов невозможна без информации об исходном уровне активности фермента у данного человека и не позволяет идентифицировать вызвавший отравление ФОП. Между тем, идентификация конкретного соединения из широкого спектра возможных вариантов важна при выборе плана лечения.

Преимуществом используемого подхода является то, что модули идентификации и количественного определения охвачены одним алгоритмом, включающим унифицированную процедуру подготовки проб к последующим инструментальным исследованиям. Совместное определение целевых соединений и их метаболитов позволяет уменьшить объем анализируемых проб, сократить общее время исследования образца, а также существенно расширяет возможности трактовки полученных результатов.

В стандартных схемах ГХ-МС скрининга анализ образцов без дериватизации, как правило, не предусмотрен. При таком подходе некоторые ксенобиотики могут остаться невыявленными, поскольку их сигналы будут поглощены пиками дериватирующих агентов и производных брутто-компонентов биологических проб. Необходимость анализа экстрактов без дериватизации проиллюстрирована в **разделе 3.2.2** на примере выявления метаболитов углеводов с числом атомов углерода от 6 до 10 в плазме крови и внутренних органах крыс.

Предельные углеводороды являются традиционными загрязнителями воздушной среды. Считалось, что эти соединения малоопасны для человека, и различия в действии на организм отдельных

углеводородов с числом атомов углерода от 1 до 10 незначительны, что нашло отражение в методологии их гигиенического регламентирования.

При проведении хронического круглосуточного эксперимента нами показано, что смесь предельных углеводородов C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> в концентрации 160 мг/м<sup>3</sup> вызывает у подопытных животных нарушение функционального состояния ЦНС, изменения углеводного и жирового обменов, оказывает гепатотоксическое действие, вызывает нарушение развития эмбрионов. Пороговая концентрация смеси углеводородов C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> установлена на уровне 31.4 мг/м<sup>3</sup>, недействующая – 5.2 мг/м<sup>3</sup>, расчетная недействующая концентрация – 5.3 мг/м<sup>3</sup>.

В результате проведенного исследования биологических образцов выявлены метаболиты гексана, гептана и октана. Метаболиты нонана и декана не обнаружены, возможно, из-за крайне низкой их концентрации в смеси – 0.3 % каждого. Все обнаруженные биомаркеры, были выявлены в группе, получавшей максимальную концентрацию углеводородов во вдыхаемом воздухе (160 мг/м<sup>3</sup>).

Нами установлено, что непрерывное ингаляционное воздействие смеси предельных углеводородов C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> с концентрацией 160 ± 21 мг/м<sup>3</sup> 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 (6-амино-6-(2,5-диметил-1*H*-пиррол-1-ил)-гексановая кислота – селективный и специфичный биомаркер хронического воздействия *n*-гексана на центральную и периферическую нервную системы. Было установлено, что концентрации смесей алифатических углеводородов 31 ± 6 мг/м<sup>3</sup> и 5 ± 1 мг/м<sup>3</sup> при хроническом ингаляционном воздействии не приводят к накоплению метаболитов и по этому признаку были охарактеризованы как недействующие.

Использование предварительного эксперимента *in vitro* для формирования гипотезы *a priori* о структуре метаболитов токсичного соединения проиллюстрировано в **разделе 3.2.4** на примере выявления ранее неизвестных биомаркеров гидроксиламина.

Гидроксиламин (ГА) является реакционноспособным соединением, вступающим в различные реакции, среди которых с позиций токсикологии наиболее актуальны окислительно-восстановительные, а также реакции образования оксимов с альдегидами и кетонами, которые широко представлены в крови и моче. Основным механизмом действия гидроксиламина является образование метгемоглобина. При этом активным окислительным агентом в реакциях превращения гемоглобина в

метгемоглобин являются свободные радикалы, образующиеся как в процессе окисления производных гидроксилamina, так и в процессе восстановления нитрозогруппы в группу =N-OH.

Необходимость предварительного формирования гипотетической схемы метаболизма в режиме *in vitro* обусловлена тем, что оксимы, основные предполагаемые метаболиты гидроксилamina, недостаточно представлены в базах данных и не имеют характерных признаков в масс-спектрах ионизации электронами. Единственный характеристичный признак - нечетные массы молекулярных ионов, удается зарегистрировать достаточно редко. Предварительный эксперимент в режиме *in vitro* не только желателен с этических позиций, поскольку позволяет уменьшить количество животных в опытах *in vivo*, но и позволяет работать с высокими концентрациями токсикантов, не достижимыми физиологически, что обеспечивает возможность идентификации минорных метаболитов.

С учетом перечня выявленных *in vitro* возможных метаболитов был произведен их поиск в образцах крови и мочи после введения  $\frac{1}{2}DL_{50}$  раствора ГА. Структуры обнаруженных метаболитов приведены на рис. 2, а приблизительная количественная оценка их содержания в исследованных биожидкостях дана в табл. 1.

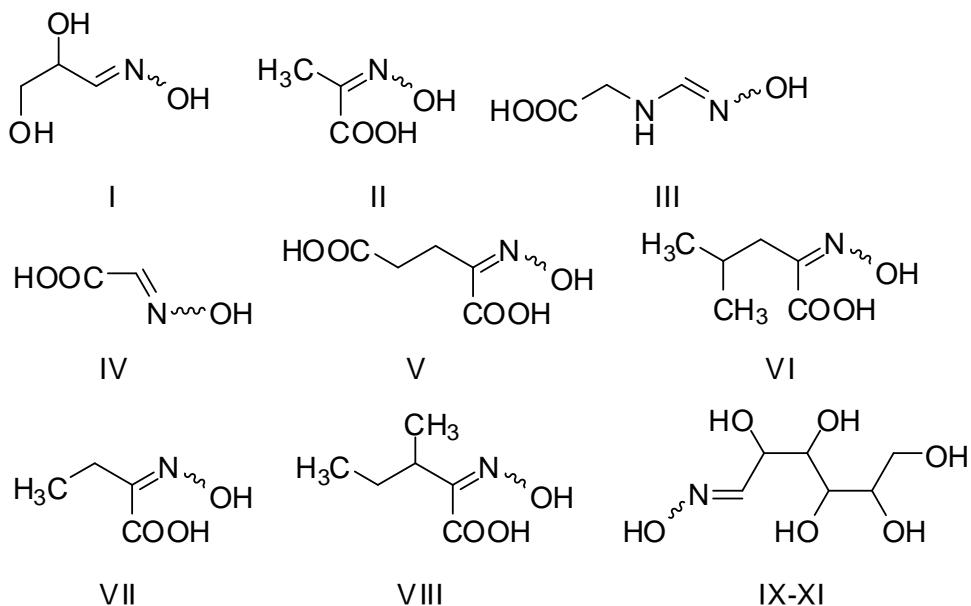


Рис. 2 – Структурные формулы идентифицированных метаболитов ГА в крови и моче

В моче, в отличие от крови, выявлены оксимы моносахаридов (соединения V-VII). Высокие концентрации оксимов моносахаридов в моче и низкие (ниже предела обнаружения) в плазме можно объяснить активной

экскреторной и/или метаболической функцией почек при трансформации и выведении ГА.

В эксперименте *in vitro* нами установлено, что оксимы IX-XI могут образовываться при взаимодействии ГА с сахарами крови. В моче приблизительная суммарная концентрация этих оксимов составляет более 0.5 мг/мл. Интересно отметить, что и *in vitro* и *in vivo* соответствующие аддукты образуются только с альдозами, а не кетозами.

Для выявления наиболее чувствительного биомаркера экспозиции ГА был выполнен скрининг аддуктов ГА в плазме крови и моче крыс, получавших раствор ГА перорально в течение 30 дней (табл. 1). Наиболее чувствительными биомаркерами экспозиции ГА оказались его неметаболизованная форма и аддукт с пировиноградной кислотой - пируватоксим (II), обнаруженный в моче крыс, получавших 22 мкг/кг ГА перорально.

Табл. 1 - Результаты выявления биомаркеров гидроксиламина в плазме крови и моче после поступления гидроксиламина *per os* в следующих дозах: 1 - 102 мг/кг, 2 - 565 мкг/кг, 3 - 113 мкг/кг, 4 - 23 мкг/кг ( $n = 8$ ).

Биомаркер	Концентрация*, мкг/мл			
	1	2	3	4
<b>Плазма крови</b>				
Гидроксиламин	0.42±0.13	0.30±0.15	0.012±0.008	0.008±0.004
О* . глицеральдегида***	следы	0.010±0.006	-	-
О. пировиногр. к-ты	0.26±0.17	-	-	-
О. N-формилглицина	0.029±0.008	-	-	-
О. глиоксалевой к-ты	0.038±0.028	-	-	-
<b>Моча</b>				
Гидроксиламин	29±7	35±6	0.10±0.03	0.034 ± 0.018
О. глицеральдегида	35±19	0.14±0.09	0.010±0.006	-
О. пировиногр. к-ты	100±80	0.14±0.07	Следы	Следы
О. 2-кетоглутар. к-ты	0.47±0.12	-	-	-
О. 2-кетозокапр. к-ты	1.4±0.2	-	-	-
О. 2-кетомасляной к-ты	0.4±0.1	-	-	-
О. 3-метил-2-кетопент. к-ты	0.08±0.02	-	-	-
О. моносахаридов	>500****	-	-	-

Примечание: \* — Концентрации обнаруженных метаболитов приведены относительно внутренних стандартов; \*\* — О. — оксимы; \*\*\* — для оксимов указана сумма E- и Z-изомеров; \*\*\*\* — точное количественное определение затруднительно, однако можно предположить, что суммарное содержание оксимов моносахаридов составляет более 0.5 мг/мл мочи.

Моча является наиболее перспективной матрицей для мониторинга низкоуровневого воздействия. Так, в крови оксим глицеральдегида (I)

можно обнаружить только у группы крыс, получавших высокую дозу ГА. Полученные результаты свидетельствуют о том, что ГА, несмотря на высокую реакционную способность, тем не менее, обнаруживается в крови и моче. Возможно, наличие ГА в крови даже при низкоуровневом воздействии объясняется тем, что, при утилизации повреждённых эритроцитов происходит высвобождение ГА и обратное поступление его в кровяное русло.

Учитывая тот факт, что все метаболиты ГА в крови и моче крыс были нами также обнаружены в образцах биологических жидкостей после внесения ГА *in vitro*, можно заключить, что образование идентифицированных оксимов не катализируется ферментами. Установленный факт позволяет не вносить изменений в список потенциальных биомаркеров экспозиции при его экстраполяции на человека.

Использование общих закономерностей метаболизма для формирования гипотезы *a priori* и последующей идентификации метаболитов показано в **разделе 3.2.5** на примере выявления биомаркеров после ингаляционного экспонирования хладомом RL316 - (*E*)-1,4-дихлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутена-2 (далее - ДХГФ).

К основным процессам превращений фторхлоралкенов в организме относятся: так называемый "восстановительный путь", гидролиз и образование конъюгатов с глутатионом. Образующиеся конъюгаты могут далее путем нескольких последовательных реакций образовывать цистеиновые и ацетилцистеиновые аддукты в почках (Рис. 3).

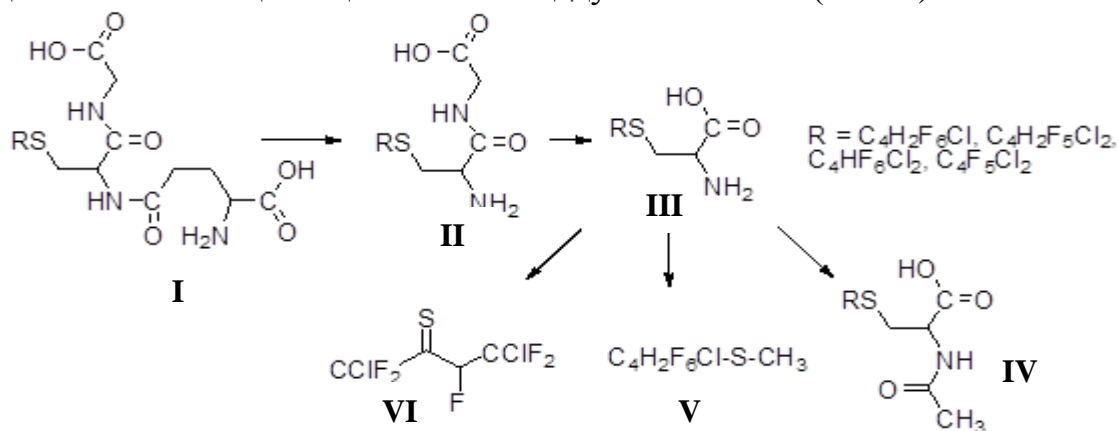


Рис. 3 – Схема деградации различных аддуктов ДХГФ с глутатионом (показаны обнаруженные метаболиты)

Считается, что нефротоксичность и нефроканцерогенность галогеналкенов обусловлены преимущественно образованием крайне реакционноспособных интермедиатов – тиокетенов, при воздействии β-

лиаз на цистеиновые аддукты. Тиокетены, крайне электрофильные соединения, способны образовывать ковалентные аддукты с протеинами и азотистыми основаниями ДНК, чем и обусловлена их мутагенность и канцерогенность. Нами проведена идентификация метаболитов ДХГФ. Для выявления метаболитов использовали сочетание: ГХ-МС паровой фазы, ГХ-МС экстрактов и ВЭЖХ-МС высокого разрешения. В паровой фазе обнаружено два метаболита. 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 (I) и их дальнейшая деградация до цистеиновых (III) и ацетилцистеиновых аддуктов (IV), с промежуточным образованием цистеинилглициновых аддуктов (II). Также среди продуктов распада аддуктов выявлены метилсульфид (V), метилсульфоксид и тиокетон – 1,1,3,4,4-пентафтор-1,4-дихлорбутантион-2 (VI), который оказался наиболее чувствительным биомаркером экспозиции и был обнаружен в крови при экспонировании крыс концентрацией ДХГФ 18.8 мг/м<sup>3</sup>. Не менее чувствительным биомаркером экспозиции ДХГФ является его неметаболизированная форма. Таким образом, при биоаналитическом мониторинге воздействия ДХГФ на человека следует в первую очередь в качестве целевых биомаркеров экспозиции рассматривать цистеиновые и ацетилцистеиновые аддукты ДХГФ.

Завершающим этапом разработки комплексной процедуры мониторинга биомаркеров экспозиции является создание высокочувствительных методик их определения. Основные результаты разработки этого этапа приведены в **разделе 3.3**. В табл. 2 приведен полный перечень соединений, рассматриваемых в данной работе.

Группа ксенобиотиков характеризуется физико-химическими характеристиками, варьирующими в широких диапазонах: летучесть, кислотность, гидрофобность и пр.; то же относится к диапазонам классов опасности: от чрезвычайно опасных до малоопасных соединений. Наряду с параметрами токсичности в табл. 2 приведены оптимальные методики определения биомаркеров экспозиции.

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 биомаркеров в образце. С учетом результатов токсикологического эксперимента список целевых аналитов может быть, как сокращен, так и расширен, а требования к пределам их обнаружения пересмотрены.



Табл. 2 - Полный перечень соединений, рассмотренных в данной работе

Химический фактор	Биомаркеры экспозиции	Метод определения
<b>Алифатические углеводороды</b>		
Смесь УВ C <sub>6</sub> -C <sub>10</sub> : гексан, гептан, октан, нонан и декан	ДМПН	ВЭЖХ-МС
	Гексанон-2	ГХ-МС
	Гептанон-2	
Смесь УВ C <sub>1</sub> -C <sub>5</sub> : метан, этан, пропан, бутан, изобутан, пентан, изопентан	Октанол-1	ГХ-МС-ТФМЭ
	Ацетон	
	Бутанол-1	
	<i>трет</i> -Бутанол	
Бутанон-2		
<b>Чрезвычайно опасные вещества</b>		
Зарин	Аддукты с АСhE и HAS	ВЭЖХ-МС и ГХ-МС
Зоман		
RVX		
Фторацетат натрия	Фторуксусная кислота	ГХ-МС
<b>Фосфорорганические пестициды</b>		
Дихлофос	Дихлорэтанол	ГХ-МС-ТФМЭ
Диметоат	Диметоат	ГХ-МС/МС
Диазинон	Пиримидиндиол	ГХ-МС
Метилпаратион	4-Нитрофенол	ГХ-МС
Хлорпирифос	Хлорпирифос	ГХ-МС/МС
Фозалон	Фозалон	ГХ-МС/МС
<b>Компоненты ракетного топлива</b>		
Гидроксиламин	Гидроксиламин	ГХ-МС/МС
	Пируватоксим	ГХ-МС
<b>Летучие промышленные загрязнители</b>		
ДХГФ	ДХГФ	ГХ-МС-ТФМЭ
Аллилхлорид	Аллилхлорид	
Акрилонитрил	Акрилонитрил	
Бутилхлорид	Бутилхлорид	
Дисульфид углерода	Дисульфид углерода	
Хлорацетонитрил	Хлорацетонитрил	
Гексахлорэтан	Гексахлорэтан	
Нитробензол	Нитробензол	
Метакрилонитрил	Метакрилонитрил	
Этилметакрилат	Этилметакрилат	
Метилакрилат	Метилакрилат	
Пентахлорэтан	Пентахлорэтан	
<i>E</i> -1,4-Дихлор-2-бутен	<i>E</i> -1,4-Дихлор-2-бутен	
Диэтиловый эфир	Диэтиловый эфир	
Метилметакрилат	Метилметакрилат	
2-Нитропропан	2-Нитропропан	
Тетрагидрофуран	Тетрагидрофуран	

Экспериментальная оценка токсикокинетических параметров позволяет не только математически описать зависимости концентраций биомаркеров в крови от времени, но и провести приблизительную оценку абсорбированных доз на основании измеренной концентрации биомаркера экспозиции в моче и/или крови. Ретроспективная оценка абсорбированной дозы возможна, если установлен характер ее зависимости от кажущейся начальной концентрации.

В **разделе 3.3.1** приведены результаты разработки методики определения ФОП на уровне 1 нг/мл в биологических образцах методом ГХ-МС/МС.

В качестве метода извлечения пестицидов из крови использовали метод жидкость-жидкостную экстракцию, ввиду возможности 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 нами показано, что пределы обнаружения в 1 нг/мл достигаются и в других матрицах. Пределы обнаружения ФОП в моче и крови составили от 0.1 до 1 нг/мл. Методика аттестована: свидетельство № 222.0320/01.00258/2013.

В **разделе 3.3.2** приведены результаты разработки методики определения летучих соединений в цельной крови и моче, включающая 16 летучих промышленных загрязнителей (аллилхлорид, акрилонитрил, бутилхлорид, дисульфид углерода, хлороацетонитрил, гексахлорэтан, нитробензол, метакрилонитрил, этилметакрилат, метилакрилат, пентахлорэтан, *транс*-1,4-дихлор-2-бутен, диэтиловый эфир, метилметакрилат, 2-нитропропан, тетрагидрофуран) в биологических пробах в диапазоне концентраций 1-20 нг/мл.

Отбор проб из равновесного пара проводили на микроволокно 85  $\mu\text{m}$  Carboxen/PDMS в течение 6 минут при постоянном перемешивании пробы при температуре 40°C. Термодесорбцию уловленных аналитов проводили в горячем инжекторе хроматографа. Для хроматографического разделения использовали полярную капиллярную колонку SPB-1701. В качестве внутренних стандартов использована смесь трех дейтерированных соединений: бензол-d<sub>6</sub>, ацетон-d<sub>6</sub> и хлороформ-d.

Методика апробирована при анализе образцов биологических жидкостей лабораторных животных, экспонированных модельной смесью летучих промышленных загрязнителей. Показана

эффективность методики для выявления факта воздействия летучих промышленных загрязнителей на организм. Кроме того, значительным преимуществом этой методики является возможность расширения списка анализируемых летучих соединений без значительных трудовременных затрат, так как сорбция компонентов из паровой фазы волокном Carboxen/PDMS является наименее селективной по отношению к химическому классу соединений, а естественным ограничением является только молекулярная масса целевых аналитов. Достигнутые пределы количественного определения составляют не более 1 нг/мл при пределе детектирования 0.2 нг/мл в крови и моче. Методика аттестована: свидетельство № 222.0319/01.00258/2013.

Разработанные высокочувствительные методики определения летучих промышленных загрязнителей (ЛПЗ) и ФОП в крови и моче использованы для определения количественных токсикокинетических параметров целевых соединений при экспериментальном моделировании интоксикаций (см. [раздел 3.3.3](#)). Стоит отметить, что для большинства соединений из групп ЛПЗ и ФОП экспериментальное исследование токсикокинетики проведено впервые.

Исследование токсикокинетики ЛПЗ и ФОП показало, что моча является наиболее показательной матрицей для установления факта воздействия ЛПЗ на организм, большая часть ЛПЗ детектируется в моче в течение 5 дней после отравления дозами 0.22 мг/кг, эквивалентными диапазоны от  $3 \times 10^{-5}$  DL<sub>50</sub> до  $9 \times 10^{-3}$  DL<sub>50</sub>. Достигнутые пределы обнаружения позволяют определять летучие промышленные загрязнители в период от суток до 6 дней. Достигнутые пределы обнаружения ФОП позволяют определять отравление дозами от 1 до 50 мг/кг, эквивалентными диапазоны от 1/10 DL<sub>50</sub>–1/50 DL<sub>50</sub> в течение 6 дней.

Установление зависимости концентрации биомаркера экспозиции от времени, прошедшего после экспозиции, позволяет провести приблизительную оценку абсорбированной дозы ксенобиотика. 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 в системный кровоток настолько высоки, что зарегистрировать максимум на токсикокинетической кривой не представляется возможным. Нами 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 в табл. 3). Вычисление токсикокинетических параметров остальных соединений было проведено с учетом фазы абсорбции по уравнению 3 или 4 (табл. 3).

Табл. 3 – Уравнения зависимости концентрации веществ в крови от времени

Модель	Уравнение зависимости концентрации ксенобиотика в крови от времени	
1 фаза элим. без абсорбции	$C = C_0 \times e^{-k_\alpha t}$	(1)
2 фазы элим. без абсорбции	$C = C_0 \times (P_f \times e^{-k_\alpha t} + (1 - P_f) \times e^{-k_\beta t})$	(2)
1 фаза элим. с абсорбцией	$C = C_0 \times (1 - e^{-k_{абс}t}) \times e^{-k_\alpha t}$	(3)
2 фазы элим. 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<sub>0</sub> – кажущаяся начальная концентрация ксенобиотика, нг/мл; P<sub>f</sub> – доля длительности быстрой фазы (альфа фазы); k<sub>α</sub> – константа элиминирования в быстрой фазе (альфа фазе) или константа элиминирования при однофазном выведении, мин<sup>-1</sup>; k<sub>β</sub> – константа элиминирования в медленной фазе (бета фазе), мин<sup>-1</sup>; k<sub>абс</sub> – константа абсорбции, мин<sup>-1</sup>.*

При моделировании токсикокинетики необходимо учитывать 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 чего моделирование токсикокинетики проводилось по одному из четырех уравнений (табл. 3).

Наименее смещенные оценки количества абсорбированного химического соединения на основе концентрации его биомаркера в крови возможно получить при условии линейной зависимости площади под токсикокинетической кривой (AUC) от дозы.

В работе нами представлены результаты разработки и апробации алгоритма 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 в крови. Далее вычисленные значения AUC были сравнены со значениями для известной дозы ФОП. Показано, 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<sub>50</sub> при отборе кинетических точек от 30 минут до 24 часов, а в среднем 0.11 DL<sub>50</sub> (истинная доза в эксперименте 0.1 DL<sub>50</sub>).

Трансляция количественных токсикокинетических параметров от животных к человеку необходима для разработки методик, применяемых в целях проведения биоаналитического мониторинга химических веществ (**раздел 3.3.4**). Основными стратегиями трансляции являются межвидовое аллометрическое масштабирование, физиологически обоснованные фармакокинетические модели или масштабирование с использованием экспериментов *in vitro*.

Необходимый набор токсикокинетических параметров, позволяющий воспроизвести зависимость концентрации ксенобиотика в крови от полученной дозы включает константы элиминирования и абсорбции для соединений со значимым периодом абсорбции, а также начальную или кажущуюся начальную концентрацию. В случае успешного масштабирования этих параметров удастся оценить период возможного обнаружения биомаркера в крови с использованием известной методики.

Масштабированные токсикокинетические параметры позволяют существенно повышать информативность результатов биоаналитического мониторинга. Алгоритм масштабирования основных токсикокинетических параметров включает:

1. Определение типа кинетического уравнения (внутри- или внесосудистое, одна фаза элиминирования или две).
2. Вычисление отношения площадей под кривыми для одинаковых доз ксенобиотика для человека и животного.
3. Масштабирование периода полувыведения для одной или нескольких фаз элиминирования.
4. При необходимости, масштабирование константы абсорбции.
5. Вычисление периода возможного обнаружения.

Результаты масштабирования токсикокинетических параметров для соединения из групп ФОП и ЛПЗ суммированы в табл. 4. В таблице также приведена оценка периодов возможного обнаружения биомаркеров экспозиции ФОП и ЛПЗ в крови человека при использовании разработанных методик количественного определения. Предложенный алгоритм масштабирования токсикокинетических параметров возможно

применять при условии близости биодоступности химических соединений для организма животного и человека, а также близкой к линейной зависимости от дозы площади под токсикокинетической кривой (AUC).

Табл. 4 — Масштабированные токсикокинетические параметры соединений из групп ЛПЗ и ФОП и периоды возможного обнаружения биомаркеров экспозиции в крови человека

Соединение	Масштабированные токсикокинетические параметры					
	$t_{1/2}$ , ч ( $\alpha$ ) <sup>1</sup>	$t_{1/2}$ , ч ( $\beta$ ) <sup>2</sup>	$C_0$ , нг/мл	$k_{абс}$ , мин <sup>-1</sup>	$T_{обн}$ <sup>3</sup> (кролик)	$T_{обн}$ <sup>3</sup> (человек)
E-1,4-Дихлор-2-бутен	1.3	12	303	- <sup>6</sup>	1 день	12 ч
Диазинон	3.4	27.0	204	-	3 дня	9 дней
Дисульфид углерода	4.5	14.1	4	-	2 дня	32 ч
Метакрилонитрил	2.8	9.3	7	-	1 день	2.2 дня
Метилпаратион	7.0	20.8	28	-	2 дня	4.1 день
Пентахлорэтан	2.9	18.3	3	-	1 день	9.5 ч
Акрилонитрил	0.9	- <sup>4</sup>	3	-	1 день	1.5 ч
Аллилхлорид	5.5	-	3	-	1 день	7 ч
Бутилхлорид	16.0	-	2	-	2 дня	19 ч
Диметоат	2.6	10.3	1027	-	3 дня	4.3 дня
Хлорацетонитрил	0.8	-	4	-	1 день	2 ч
Этилметакрилат	6.1	-	<1	-	1 день	- <sup>5</sup>
Диэтиловый эфир	2.3	4.8	37	0.040	5 дней	3.9 дней
Метилакрилат	2.1	8.4	102	0.018	2 дня	2.3 дня
Метилметакрилат	3.0	8.4	<1	0.028	1 день	-
Нитробензол	9.0	16.0	17	0.108	1 день	2.9 дня
Хлорпирифос	35.0	45.0	3	0.015	3 дня	4.4 дня
2-Нитропропан	3.4	-	26	0.027	1 день	16 ч
Гексахлорэтан	6.0	-	<1	0.063	1 день	-
Фозалон	44.0	-	2	0.010	5 дней	18 ч

Примечания: <sup>1</sup> – период полувыведения в быстрой фазе; <sup>2</sup> – период полувыведения в медленной фазе; <sup>3</sup> – период возможного обнаружения соединения в крови после введения данной дозы с использованием данной методики; <sup>4</sup> – медленная фаза выведения отсутствует; <sup>5</sup> – невозможно обнаружить факт введения указанной дозы с использованием данной методики; <sup>6</sup> – вычисление проведено без учета фазы абсорбции.

Масштабированные токсикокинетические параметры существенно повышают информативность результатов биоаналитического мониторинга, т.к. наличие информации о зависимости концентрации биомаркера от времени (т.е. токсикокинетические параметры) позволяет оценивать внутреннюю дозу веществ, что позволяет провести корректирование гигиенических нормативов с учетом соотношения внешней (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.

В **разделе 3.3.5** приведены результаты разработки методики количественного определения ГА в плазме крови и моче с использованием двойной дериватизации бензальдегидом и бис-триметилсилилтрифторацетамидом. Схемы образования различных производных ГА приведены на рис. 4. Время удерживания *Z*-изомера, ТМС-эфира оксима бензальдегида, относительно ТМС-эфира бензойной кислоты, составило 1.045, замена триметилсилильной группы на третбутилдиметилсилильную практически не изменила отношения времен удерживания ТБДМС-производных, которое составило в этом случае 1.041.

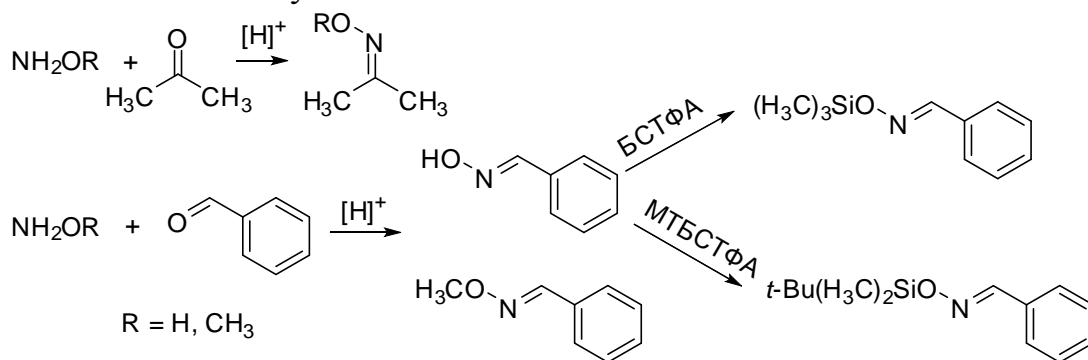


Рис.4 — Схема образования различных производных ГА и метоксиамин: с ацетоном, бензальдегидом, а также при силилировании

Таким образом, ТМС производные предпочтительнее за счет их меньших времен удерживания. Стоит отметить, что в данных условиях можно разделить *E*- и *Z*-изомеры ТМС-производных оксима бензальдегида. Предел обнаружения в условиях ГХ-МС анализа составил 30 нг/мл плазмы крови или мочи. Для повышения чувствительности нами было опробовано применение ГХ-МС/МС в режиме МРМ: 193→89 для количественного анализа и 178→75 в качестве подтверждающего. Напряжение в ячейке соударений для двух переходов 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 гидроксилamina до 0.1 нг/мл.

В **разделе 3.3.6** приведены результаты разработки хроматомасс-спектрометрической методики количественного определения ДХГФ в плазме крови и моче с использованием твердофазной микроэкстракции

аналитов из паровой фазы над образцом и разделением компонентов с использованием капиллярной газохроматографической колонки. Пределы обнаружения ДХГФ в плазме крови и моче составили 5 нг/мл. Количественное определение выполняли методом относительной градуировки с использованием 2-хлорпропана в качестве внутреннего стандарта. Такой предел обнаружения позволяет проводить определение ДХГФ при острых отравлениях ( $600 \text{ мг/м}^3$ ), а также подострых отравлениях в диапазоне концентраций от 19 до  $84 \text{ мг/м}^3$ .

Учитывая высокую летучесть и низкую температуру кипения ДХГФ,  $64\text{-}66^\circ\text{C}$ , наиболее предпочтительным способом подготовки проб для его определения 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 *post mortem*. Методика количественного анализа разработана при использовании плазмы крови и мочи в качестве матриц. В качестве внутреннего стандарта был использован 2-хлорпропан. Выбор обусловлен его высокой летучестью и близкими параметрами хроматографического удерживания. Температура кипения составляет  $35.7^\circ\text{C}$ . Выбор оптимального типа микроволокна проводили с использованием растворов ДХГФ и 2-хлорпропана в концентрации 30 нг/мл каждого. Установлено, что наиболее полное извлечение ДХГФ из паровой фазы достигается при использовании волокна с тройным покрытием из дивинилбензола, карбоксена и полидиметилсилоксана. Максимальная степень извлечения достигается при температуре экстракции  $35^\circ\text{C}$  и продолжительности экстракции 5 минут. Стоит отметить, что извлечение внутреннего стандарта в данных условиях коррелировало с извлечением ДХГФ.

В результате, для химико-аналитического исследования образцов крови и мочи крыс, подвергавшихся острому ингаляционному воздействию ДХГФ, была разработана методика определения целевого соединения методом ГХ-МС с твердофазной микроэкстракцией из паровой фазы, контактирующей с образцом. Достигнутые пределы обнаружения составили 5 нг/мл в крови и моче. Такой предел обнаружения позволяет проводить мониторинг ингаляционного воздействия ДХГФ на уровне  $19 \text{ мг/м}^3$ .



Потенциальным источником неопределенности является невозможность идентификации соединений с точностью до позиционного изомера на основании интерпретации масс-спектров ионизации электронами или газохроматографических индексов удерживания (см. **раздел 3.4**). Такая точность идентификации важна, например, при определении алкилфенолов – прекурсоров неионогенных поверхностно-активных веществ, широко применяющихся в промышленности, но обладающих свойствами экотоксикантов. Одной из причин интенсивного изучения этих соединений является их токсическое воздействие на эндокринные системы человека и животных. Действие алкилфенолов аналогично действию  $17\beta$ -эстрадиола, но выражено в меньшей степени, причем аффинность к эстрогенным рецепторам зависит от структуры и положения алкильных заместителей в молекуле. Так, алкилфенолы с третичными алкильными группами в *para*-положении, как правило, более токсичны по сравнению с изомерами, содержащими вторичные и первичные алкильные группы

Для повышения надежности идентификации позиционных изомеров алкилфенолов нами было предложено использовать масс-спектры диссоциации, индуцированной соударениями в условиях положительной химической ионизации: в отличие от масс-спектров ионизации электронами, в масс-спектрах диссоциации, индуцированной соударениями, протонированных молекул *para*-замещенных алкилфенолов  $C_4$ - $C_9$  присутствуют сигналы характеристических ионов  $[M+H-H_2O]^+$ , не характерные для других изомеров.

Исследование неспецифических физиолого-биохимических показателей, таких как биомаркеры эффекта, позволяет дополнить информацию о концентрациях ксенобиотиков и повысить надежность диагностики, получить дополнительные сведения о тяжести последствий и патогенезе отравлений. В результате исследователь может получать важнейшую информацию о проявлениях индивидуальной чувствительности к исследуемому агенту. Метаболическое профилирование позволяет выявлять ранее неизвестные механизмы токсического действия опасных химических соединений, и, что особенно важно - предлагать способы высокочувствительной диагностики отравлений.

Хроматоспектральные методы, наряду с ЯМР, являются основными инструментальными методами метаболического профилирования. Однако, несмотря на то, что ГХ-МС низкого разрешения является общепризнанным стандартом токсиколого-аналитического скрининга, этот метод имеет ряд существенных недостатков при нецелевом метаболическом

профилировании. Тем не менее, возможности идентификации метаболитов методом ГХ-МС значительно превосходят возможности других методов благодаря высокой воспроизводимости масс-спектров электронного удара и обширности баз данных масс-спектров и хроматографических параметров удерживания.

**Раздел 3.5** посвящен расширению аналитических возможностей метода ГХ-МС низкого разрешения при нецелевом метаболическом профилировании биологических образцов.

Для эффективного использования результатов, полученных с использованием газовых хроматомасс-спектрометров с одним квадрупольным масс-анализатором, в **разделе 3.5.1** предложен подход, заключающийся в создании оптимизированных библиотек хроматомасс-спектрометрических характеристик эндогенных соединений. При этом для обеспечения унифицированного подхода к выполнению различных процедур поиска биомаркеров экспозиции и эффекта предложено использовать систему автоматической идентификации и деконволюции АМДИС не только для обнаружения и идентификации ксенобиотиков и их метаболитов, но и для обработки результатов метаболического профилирования.

Для создания перечня метаболитов в биологических образцах лабораторных крыс (плазма крови, моча, гомогенаты головного мозга и печени), включенных в базу данных (БД), была произведена предварительная фильтрация и оптимизация. Оптимизация включала в себя следующие стадии:

1. Предварительная деконволюция масс-хроматограмм и "разметку" хроматографических пиков.
2. Исключение пиков по критериям отношения сигнал/шум и воспроизводимости площадей хроматографических пиков при анализе аликвот одного образца.
3. Исключение пиков по критериям отношения сигнал/шум и воспроизводимости площадей хроматографических пиков при анализе разных образцов внутри одной экспериментальной группы животных.
4. Идентификация эндогенных соединений, включенных в итоговую версию БД.

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 и при использовании меньшего количества лабораторных животных.

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 подготовленных и оптимизированных баз данных хроматоспектральных характеристик позволяет заранее произвести отнесение пиков и идентификацию компонентов метаболического профиля (см. раздел 3.5.2).

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. При использовании метода ГХ-МС многие сахара не «сахара», а «производные сахаров» имеют близкие времена удерживания и масс-спектры без характеристичных особенностей.

Оксимирование карбонильных групп, помимо защиты  $\alpha$ -кетокислот от декарбоксилирования, затрудняет возможность образования пиранозных и фуранозных форм, что значительно упрощает масс-хроматограммы, повышает чувствительность и уменьшает количество изомеров и пиков, в то же время образующиеся оксимы существуют в двух формах: *син*- (*E*) и *анти*- (*Z*).

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. В результате показано, что проведение первой стадии дериватизации при комнатной температуре в течение 16 часов позволяет снизить долю циклической формы моносахаридов в 4.5 раза.

Интерпретация газохроматографических индексов удерживания позволила произвести идентификацию 4-х моносахаридов, 11 полиатомных спиртов, 10 альдоновых кислот. Недостаточная разница в ИУ не позволила дифференцировать треитол и эритритол, а 3-дезоксипентитол был идентифицирован только с точностью до химического класса. 4 хроматографических пика остались неидентифицированными.

Важным этапом предварительной обработки хроматоспектральных данных являлась нормализация пиков (**раздел 3.5.3**). С учетом ориентирования разрабатываемых подходов на унификацию и создание единой химико-аналитической платформы для поиска всех типов биомаркеров, нами было принято решение использовать метод внутренних стандартов. Оптимальными внутренними стандартами, которые позволяют проводить нормализацию площадей пиков большинства аналитов при нецелевом метаболическом профилировании, оказались 4-диметиламиномасляная, 3-фторбензойная и пальмитиновая-d<sub>31</sub> кислоты.

Важный аспект дизайна эксперимента в токсикологических исследованиях выбор количеств животных в группах. Размер группы или выборки тесно связан с понятием статистической мощности и, соответственно, с вероятностью ошибок II рода.

В ходе выполнения настоящего исследования нами была оценена статистическая мощность нецелевого метаболического профилирования различных видов биологических образцов (**раздел 3.5.4**). Мощность эксперимента вычислена с помощью ПО G POWER v. 3.1 для двух групп животных (контрольной и экспериментальной) по 6 и 8 шт. 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. Обоснование размера выборки для нецелевого метаболического профилирования с позиций статистической мощности выполнено впервые.

Повышение статистической значимости результатов выявления биомаркеров эффекта (**раздел 3.6**) помимо повышения чувствительности метода может достигаться путем создания целевых методик профилирования. **Раздел 3.6.1** посвящен использованию методов количественного определения профилей свободных и этерифицированных жирных кислот для выявления новых биомаркеров эффекта токсичных химических соединений. Измерение профилей свободных и этерифицированных форм ЖК является важным инструментом для определения нарушений липидного обмена, а полученные данные позволяют более полно охарактеризовать состояние тканей и органов в период острой интоксикации и в отдаленные сроки после отравления.

Мы проследили динамику концентраций тридцати жирных кислот (ЖК) с длиной цепи от C<sub>11</sub> до C<sub>24</sub> в плазме крови при острой интоксикации

крыс отравляющим веществом из группы Vx (RVX), в результате было выявлено статистически значимое увеличение суммарных концентраций этерифицированных (на 30%) и свободных форм ЖК (на 81%) в плазме крови через неделю после введения RVX в дозе  $2 \times 0.4 \text{ DL}_{50}$  (9.6 мкг/кг). Такое значительное повышение уровней СЖК в крови в поздние сроки после отравления может служить одной из причин развития гипергликемии, инсулинорезистентности и метаболического синдрома.

Антидотная терапия купирует отставленные последствия отравления, но не купирует эффекты ФОВ в первые часы после отравления. Это потенциально позволяет использовать контроль метаболических профилей свободных и этерифицированных ЖК для мониторинга эффективности антидотной терапии при острых отравлениях ФОС.

Несмотря на то, что терапия отравлений RVX карбоксимом позволяет нормализовать концентрации СЖК и этерифицированных жирных кислот (ЭЖК) в плазме крови, такая антидотная терапия не оказывает влияния на повышенное содержание свободных полиненасыщенных ЖК. Так, через 7 дней данный индекс выше на 36% от контрольной группы, несмотря на терапию карбоксимом. Таким образом, отношения концентраций ненасыщенных и насыщенных СЖК являются чувствительным биомаркером эффекта RVX даже в условиях антидотной терапии.

Простота метода и отсутствие стадии выделения липидных фракций позволяют проводить профилирование состава СЖК и ЭЖК в образцах внутренних органов и тканей, вычислять количественные индексы и параметры ( $\Delta 5$ ,  $\omega-6/\omega-3$  и пр.), и таким образом характеризовать токсическое действие химических соединений на организм.

Использование разработанного нами метода определения жирнокислотного состава органов и тканей лабораторных животных позволило получить новые знания о воздействии углеводов с длиной цепи от 6 до 10 атомов на состав липидов головного мозга и печени лабораторных крыс (**раздел 3.6.2**).

Нами впервые исследовалось хроническое ингаляционное воздействие низких концентраций алифатических углеводов на профили свободных и этерифицированных жирных кислот, а также изучены метаболические профили низкомолекулярных соединений головного мозга и печени крыс. В головном мозге крыс обнаружено снижение суммарного содержания ЭЖК, в среднем в 2 раза. Достоверные изменения наблюдаются только в группе с максимальной дозой, однако

тенденция к снижению сохраняется и в других группах. В печени выявлено уменьшение относительной концентрации ненасыщенных жирных кислот.

Наиболее значимые результаты получены при нецелевом метаболическом профилировании биологических образцов, полученных из внутренних органов, с использованием газовой и высокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии: выявлено значительное повышение концентрации лизофосфолипидов, в основном лизофосфатидилхолинов, в экстракте из головного мозга и плазме крови. На рис. 5 приведены масс-хроматограммы экстрактов из гомогенатов тканей головного мозга крыс полученные методом ВЭЖХ-МС в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов. Повышение, преимущественно обусловлено значительным возрастанием концентраций одного лизофосфатидилэтаноламина: ЛФЭ(20:0) и четырех лизофосфатидилхолинов: ЛФХ(18:0), ЛФХ(18:1), ЛФХ(18:2) и ЛФХ(20:5).

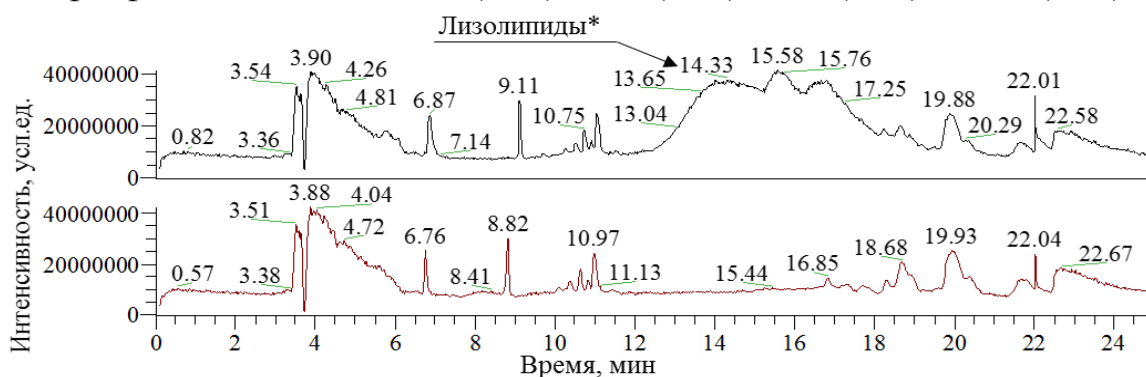


Рис. 5 – Масс-хроматограммы экстрактов из гомогенатов тканей головного мозга крыс, полученные методом ВЭЖХ-МС с регистрацией отрицательно заряженных ионов. Вверху хроматограмма образца, полученного из группы, экспонированной  $160 \text{ мг/м}^3$ , внизу – контрольной группы

Установлено, что содержание ЭЖК в экстрактах из гомогената тканей мозга крыс, экспонированных  $160 \text{ мг/м}^3$ , в два раза меньше по сравнению с контрольной группой. Повышенное содержание ЛФХ и ЛФЭ в головном мозге крыс, экспонированных УВ, приводит к повышению концентрации ЛФХ и ЛФЭ в системном кровотоке. Относительные концентрации лизолипидов в плазме крови и головном мозге имеют статистически значимые отличия по сравнению с контрольной группой только при концентрации смеси УВ  $\text{C}_6\text{-C}_{10}$   $160 \text{ мг/м}^3$ .

Высокое содержание лизофосфолипидов в гомогенате тканей головного мозга может являться признаком деструкции мембран клеток головного мозга, что является характерной особенностью нейродегенерации при острых или хронических неврологических

заболеваниях. Полученные нами данные показывают, что повышение концентрации ЛФХ в мозге сопровождается статистически значимым уменьшением концентрации глицерол-3-фосфата и не сопровождается изменениями концентраций глицерофосфохолина (ГФХ), холина, ацетилхолина, СЖК или лизофосфатидиновых кислот.

Таким образом, метаболическое профилирование образцов тканей головного мозга крыс позволило выявить потенциальные биомаркеры эффекта УВ в системном кровотоке.

Подробно результаты нецелевого метаболического профилирования плазмы крови крыс рассмотрены далее в **разделе 3.6.3**. На Рис. 6 приведены результаты 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. Овалами выделены метаболические профили одной группы животных. Выявлены дозозависимые изменения метаболических профилей у животных, экспонированных смесью УВ в концентрациях 50 и 5 мг/м<sup>3</sup> смеси УВ, в группе, экспонированной 160 мг/м<sup>3</sup>, при этом выявлены существенные отличия.

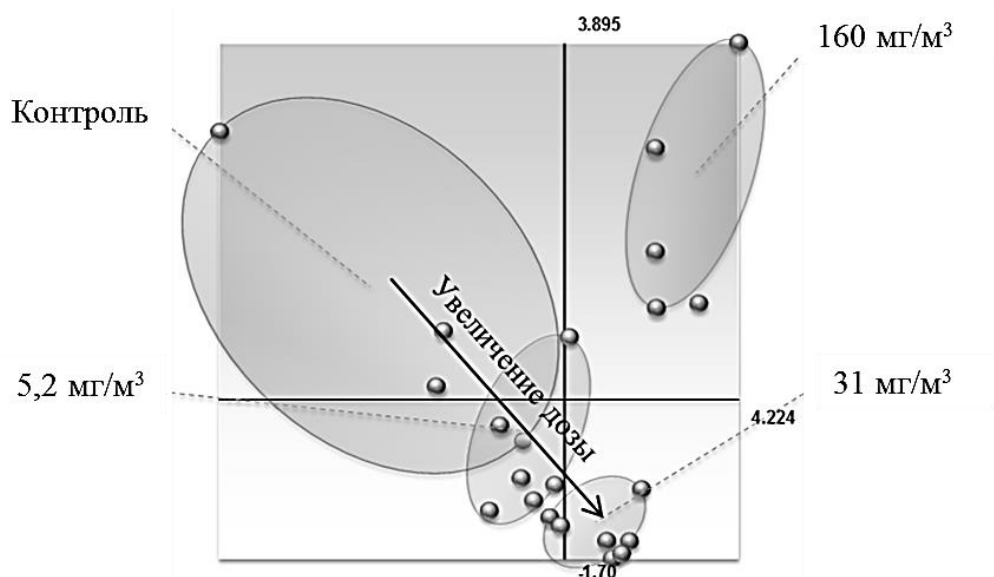


Рис. 6 - График "счетов" старших главных компонент построенный методом PLS-DA по результатам метаболического профилирования образцов плазмы крови после экспонирования различными концентрациями УВ С<sub>6</sub>-С<sub>10</sub>

Валидация построенной PLS-DA модели с помощью перестановочного теста (n = 20) показала, что достоверно отличить от контрольной можно только группу, экспонированную смесью УВ с

высокой концентрацией углеводов. С учетом ранее полученных нами данных, подтверждается гипотеза о ковалентном связывании метаболитов углеводов, т.к. в плазме крови крыс выявлен диметилпирролнорлейцин.

Отношение концентраций пиррофосфорной и щавелевой кислот в плазме крови различных групп животных является наиболее чувствительным биомаркером эффекта УВ. Изменения этого биомаркера имеют статистически значимый характер во всех группах животных, даже в группе, подвергавшейся экспонированию минимальной концентрацией УВ.

Далее, в **разделе 3.6.4** рассмотрено влияние хронического воздействия высоколетучих алифатических углеводов на метаболические профили плазмы крови крыс. Выявлены дозозависимые изменения метаболического профиля у животных, экспонированных средней и низкой концентрациями УВ С<sub>1</sub>-С<sub>5</sub> (255 и 50 мг/м<sup>3</sup>), в группе, экспонированной высокой концентрацией углеводов (1250 мг/м<sup>3</sup>). Выявлено повышение содержания лизолипидов в плазме крови крыс, экспонированных УВ С<sub>1</sub>-С<sub>5</sub>, которое может быть биомаркером эффекта УВ, и позволяет высказать предположение о некоторой общности с результатами, полученными для УВ С<sub>6</sub>-С<sub>10</sub>, и потенциально может являться универсальным биомаркером нейротоксического эффекта алифатических УВ.

Расширение аналитических возможностей и повышение статистической мощности экспериментов способствовало выявлению биомаркеров эффекта, что позволило расширить перечень видов биологических образцов. Например, в **разделе 3.6.5** показан пример удачного использования мочи для выявления биомаркеров эффекта гидроксилamina.

Нами было проведено нецелевое метаболическое профилирование образцов плазмы крови и мочи крыс, подвергавшихся острому и хроническому воздействию ГА. 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 при поступлении ГА в дозе 22.6 мкг/кг.

Сочетание определения биомаркеров экспозиции – пируватоксима и гидроксилamina с определением биомаркеров эффекта – профиля 2-кетокислот, а также пирувата и лактата позволит точнее оценивать дозы, полученные людьми, контактирующими с ГА. Стоит отметить, что такое



определение возможно объединить в рамки одной методики на газовом хромато-масс-спектрометре.

**Раздел 3.6.5** посвящен выявлению биомаркеров эффекта ДХГФ при нецелевом метаболическом профилировании образцов плазмы крови крыс.

Экспозиция крыс высокими концентрациями ДХГФ ( $600 \text{ мг/м}^3$ ) оказывает влияние на биосинтез изолейцина, цикл трикарбоновых кислот, метаболизм пировиноградной кислоты, гликолиз, а также метаболизм инозитолфосфата. В то же время, 30-дневное воздействие более низких концентраций ( $84 \text{ мг/м}^3$ ) приводит к меньшим изменениям в метаболизме плазмы крови: выявлено значительное уменьшение концентраций 3-фосфоглицерата в плазме крови. Также выявлено влияние ДХГФ на метаболические пути превращений гулоновая кислота  $\leftrightarrow$  глюкуроновая кислота  $\leftrightarrow$  *мио*-инозитол.

Концентрации гулоновой кислоты и *мио*-инозитола коррелируют друг с другом с  $p < 0.05$  в подостром опыте, в остром же опыте корреляция отсутствует. Между изменениями концентраций *мио*-инозитола и инозитолфосфата значимая корреляция не обнаружена. Отношение концентраций гулоновой кислоты и инозитолфосфата оказывается достаточно чувствительным биомаркером эффекта в первые часы после экспонирования концентрациями ДХГФ  $600$ ,  $84$  и  $19 \text{ мг/м}^3$ , однако через 24 часа статистическая значимость этого биомаркера ниже необходимой.

В **заклучении** диссертации резюмированы результаты и подведены итоги проведенного исследования.

## ВЫВОДЫ

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 рН, 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 количественном 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 гидроксиламина 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, арахиниллизофосфатидилэтаноламина, 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 гидроксиламина с 2-кетокислотами, глицеральдегидом, глиоксальной кислотой, *N*-формилглицином и несколькими моносахаридами в биологических средах. Таким образом, установлен основной механизм биотрансформации гидроксиламина 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 C<sub>4</sub>-C<sub>9</sub>, в условиях положительной химической ионизации регистрируются характеристические ионы [M+H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, не свойственные другим позиционным изомерам.

10. Разработанные аналитические подходы позволили создать методики, обеспечивающие чувствительность, достаточную для биоаналитического мониторинга пороговых концентраций алифатических углеводородов с числом атомов углерода от 1 до 10, 1,4-дихлоргексафторбутена-2 и гидроксилamina, а также для ретроспективной диагностики однократных отравлений максимально переносимыми дозами RVX и сублетальными дозами летучих промышленных загрязнителей и фосфорорганических пестицидов.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### *Монографии:*

1. Goncharov, N. Handbook of toxicology of chemical warfare agents. Chapter 8. Fluoroacetate / N. Goncharov, E. Savelieva, V. Zinchenko, S. Kuznetsov, I. Mindukshev, M. Vinokurov, P. Avdonin, N. Voitenko, A. Ukolov, T. Orlova, R. Jenkins, A. Kuznetsov; Ed.: R.C. Gupta. – London: Academic Press, 2015. – 1184 p.
2. Goncharov, N. Nutraceuticals. Efficacy, safety and toxicity. Chapter 41. Organosulfur compounds as nutraceuticals / N. Goncharov, A. Orekhov, N. Voitenko, A. Ukolov, R. Jenkins, P. Avdonin; Ed.: R.C. Gupta. – London: Academic Press, 2016. – 1102 p.

*Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК для группы научных специальностей 02.00.00*

3. Уколов, А.И. Хроматомасс-спектрометрическое определение свободных жирных кислот в плазме крови и моче с использованием экстрактивного алкилирования / А.И. Уколов, Т.И. Орлова, Е.И. Савельева, А.С. Радилев // Журн. аналит. химии. – 2015. – Т. 70. – № 9. – С. 968-975.

4. Орлова, Т.И. Определение свободных и этерифицированных жирных кислот в плазме крови методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием / Т.И. Орлова, А.И. Уколов, Е.И. Савельева, А.С. Радилов // Аналитика и контроль. – 2015. – Т. 19. – № 2. – С. 183-188.
5. Уколов, А.И. Влияние биологической матрицы и условий хранения на определение жирных кислот плазмы крови методом ГХ-МС / А.И. Уколов, Т.И. Орлова, А.С. Радилов // Вестник СПбГУ. Физика и химия. – 2015. – Т. 2 (60). Вып. 4. – С. 365-373.
6. Уколов, А.И. Систематический токсиколого-аналитический скрининг биологических образцов методом газовой хромато-масс-спектрометрии. Апробация метода идентификации токсичных органических соединений / А.И. Уколов, Е.С. Уколова, Е.И. Савельева, А.С. Радилов // Токс. вестн. – 2014. – № 2. – С. 39-45.
7. Уколов, А.И. Систематический токсиколого-аналитический скрининг биологических образцов методом хроматомасс-спектрометрии. Примеры обнаружения диазепама, трамадола и прозерина / А.И. Уколов, Г.В. Каракашев, Е.С. Уколова, Е.И. Савельева, А.С. Радилов // Масс-спектрометрия. – 2013. – Т. 10. – № 2. – С. 120-129.
8. Уколов, А.И. Определение дихлофоса, диметоата, хлорпирифоса, фозалона, диазинона и метилпаратиона в крови и моче методом газовой хроматографии с тандемным масс-селективным детектированием / А.И. Уколов, П.Н. Сорокоумов, Е.С. Уколова, Е.И. Савельева, А.С. Радилов // Аналитика и контроль. – 2014. – Т. 18. – №3. – С. 280-286.
9. 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.
10. Уколов, А.И. Изменения профилей жирных кислот плазмы крови крыс при введении сублетальных количеств фосфорорганических отравляющих веществ / А.И. Уколов, Т.И. Орлова, Е.И. Савельева, А.С. Радилов, Н.В. Гончаров // Токс. вестн. – 2015. – Т. 132. – № 3. – С. 2-11.
11. Корягина, Н.Л. Возможности химико-токсикологического анализа при моделировании острого отравления веществом VR и антидотной терапии карбоксимом / Н.Л. Корягина, Е.И. Савельева, Д.С. Прокофьева, Е.С. Уколова, Н.С. Хлебникова, Т.И. Орлова, А.И. Уколов, А.С. Радилов, Н.В. Гончаров // Токс. вестн. – 2016. – Т. 137. – № 2. – С. 8-18.
12. Гончаров, Н.В. О ферментативной активности альбумина / Н.В. Гончаров, Д.А. Белинская, А.В. Разыграев, А.И. Уколов // Биоорг. хим. – 2015. – Т. 41 (2). – С. 131-144.

13. Корягина, Н.Л. Хромато-масс-спектрометрическое исследование токсикологических профилей отравляющих веществ кожно-нарывного действия / Н.Л. Корягина, Е.И. Савельева, Е.С. Уколова, А.И. Уколов, Н.С. Хлебникова, Н.Г. Войтенко, А.С. Радилов // Токс. вестн. – 2013. – №3. – С. 21-29.
14. Корягина, Н.Л. Хроматомасс-спектрометрическое определение алкилметилфосфоновых кислот в моче / Н.Л. Корягина, Е.И. Савельева, Н.С. Хлебникова, А.И. Уколов, Е.С. Уколова, Г.В. Каракашев, А.С. Радилов // Масс-спектрометрия. – 2015. – Т. 12. – № 4. – С. 236-246.
15. Корягина, Н.Л. Определение конъюгированных с белками метаболитов фосфорорганических отравляющих веществ в плазме крови / Н.Л. Корягина, Е.И. Савельева, Г.В. Каракашев, В.Н. Бабаков, Я.А. Дубровский, Е.С. Уколова, Н.С. Хлебникова, Е.А. Мурашко, В.Ю. Конева, А.И. Уколов, В.А. Копейкин, А.С. Радилов // Журн. аналит. химии. – 2016. – Т. 71. – № 8. – С. 883-893.
16. 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. Радилов, Н.В. Гончаров // Токс. вестн. – 2017. – №3. – С. 31-41.
17. Уколов, А.И. Определение гидроксилamina в плазме крови и моче методом газовой хроматомасс-спектрометрии / А.И. Уколов, А.С. Радилов // Вестник СПбГУ. Физика и химия. — 2017. — Т. 4 (62). — Вып. 3. — С. 337–345.

*Методические рекомендации:*

18. Савельева, Е.И. Процедура проведения количественного хромато-масс-спектрометрического анализа токсичных и сильнодействующих веществ в биологических объектах. Методические рекомендации / Е.И. Савельева, А.И. Уколов, Е.С. Уколова, Г.В. Каракашев, В.А. Копейкин, Н.Л. Корягина // Издание официальное. © Федеральное медико-биологическое агентство, МР ФМБА России 4.1.23-2014 – Москва, 2014. – 103 с.
19. Савельева, Е.И. Подтверждение факта воздействия фосфорорганических отравляющих веществ на организм по результатам анализа биопроб. Методические рекомендации / Е.И. Савельева, Н.Л. Корягина, А.И. Уколов, Г.В. Каракашев, В.А. Копейкин, // Издание официальное. © Федеральное медико-биологическое агентство, МР ФМБА России 12.038-2016 – Москва, 2016. – 115 с.

*Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК для прочих групп научных специальностей*

20. 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. Радилев // Биомед. журн. Medline.ru. – 2015. – Т. 16. – С. 329-334.
21. 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. Радилев // Биомед. журн. Medline.ru. – 2015. – Т. 16. – С. 335-343.
22. Уколов, А.И. Метабомика: на пути интеграции биохимии, аналитической химии, информатики / А.И. Уколов, Т.И. Орлова, Е.Д. Мигаловская, Н.Г. Войтенко, Н.В. Гончаров // Успехи современной биологии. – 2015. – Т. 135. – № 1. – С. 3-17.
23. Уколов, А.И. Исследование энергетического метаболизма крыс при действии фторацетата / А.И. Уколов, Т.И. Орлова, Н.В. Гончаров, Н.Г. Войтенко // Вестн. Урал. мед. акад. науки. – 2014. – Т. 3. – № 49. – С. 64-66.
24. Уколов, А.И. Токсикометабомика: поиск маркеров хронического воздействия низких концентраций алифатических углеводов / А.И. Уколов, Е.Д. Кессених, А.С. Радилев, Н.В. Гончаров // Журн. эвол. биох и физиол. – 2017. – Т. 53. – № 1. – С. 23-32.
25. Уколов, А.И. Методология определения биомаркёров органических соединений с использованием хроматомасс-спектрометрии / А.И. Уколов, А.С. Радилев // Медицина экстремальных ситуаций. — 2018. — Т. 20 (3). — С. 439-450.
26. Уколов, А.И. Токсикометабомика гидроксиламина / А.И. Уколов, А.С. Радилев // Медицина экстремальных ситуаций. — 2019. — Т. 21 (1). — С. 184-192.
27. Уколов, А.И. Определение токсикокинетических параметров вредных химических соединений для повышения эффективности биомониторинга / А.И. Уколов, П.Н. Сорокоумов, А.С. Радилев // Медицина экстремальных ситуаций. — 2019. — Т. 21 (1). — С. 193-204.

#### **БЛАГОДАРНОСТЬ**

*Автор выражает особую благодарность профессору СПбГУ Зенкевичу Игорю Георгиевичу и заведующей лабораторией аналитической токсикологии Савельевой Елене Игоревне за множество ценных замечаний и рекомендации, способствовавшие улучшению изложения. Автор искренне признателен всему коллективу лаборатории аналитической токсикологии ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России за сотрудничество и поддержку.*