

На правах рукописи



Орлова Ольга Игоревна

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

Специальность 02.00.02 – Аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Санкт-Петербург

2020

Работа выполнена в Федеральном государственном унитарном предприятии «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» Федерального медико-биологического агентства

Научный руководитель **Савельева Елена Игоревна** - доктор химических наук, заведующая лабораторией аналитической токсикологии ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России

Официальные оппоненты: **Рыбальченко Игорь Владимирович** – доктор химических наук, профессор, ведущий научный сотрудник 27 научного центра Минобороны РФ

Темердашев Азамат Зауалевич – кандидат химических наук, старший научный сотрудник ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет»

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»

Защита диссертации состоится 2 апреля 2020 г. в 14–00 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 Министерства науки и высшего образования РФ <http://vak.ed.gov.ru> и ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет» <http://www.kubsu.ru>.

Автореферат разослан « » 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Киселева
Наталья Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Молекулярные процессы взаимодействия ксенобиотиков с нуклеиновыми кислотами (ДНК, РНК) изучены далеко не в полной мере. Внедрение в практику биоаналитических исследований методов хроматомасс-спектрометрии и разработка на их основе аналитических методик позволяют на молекулярном уровне изучать образование, устойчивость и репарацию аддуктов химических соединений с ДНК. Современные аналитические методики определения аддуктов ксенобиотиков с ДНК в биообразцах необходимы для изучения механизмов мутагенного и канцерогенного эффектов.

Аддукты отравляющих веществ (ОВ) с ДНК входят в перечень аналитов, подлежащих определению в ходе международного инспекционного контроля за нераспространением оружия массового поражения в биомедицинских пробах (кровь, моча), взятых у пациентов, предположительно подвергнувшихся воздействию химического оружия. Однако до настоящего времени аналитические методики определения аддуктов ОВ с ДНК в достаточной степени не отработаны.

Иприты и, в частности, сернистый иприт, характеризуются наибольшей активностью в отношении алкилирующего воздействия на ДНК, что обуславливает актуальность разработки и оптимизации методик определения продуктов этого взаимодействия. Наряду с ДНК-аддуктами, аналитическому контролю в биомедицинских пробах подлежат и аддукты иприта с веществами, используемыми для терапии пораженных, так называемыми, протекторами или скавенджерами, вступающими с алкилирующим агентом в конкурирующее взаимодействие, и, таким образом защищающими ДНК от повреждения. Применение скавенджеров влияет на концентрации и формы существования аналитов, определяемых в биопробах, что необходимо учитывать при разработке аналитических методик.

Идентификация и определение аддуктов сернистого иприта с ДНК и скавенджерами позволят более достоверно оценивать степень повреждения генетического материала и устанавливать связи между образованием аддуктов и биологическими показателями.

Актуальной задачей является изучение степени и характера химических взаимодействий между алкилирующим агентом, протектором (скавенджером) и внутренними системами организма. Реализация этой задачи требует достоверного аналитического обеспечения. В качестве одного из наиболее эффективных и безопасных скавенджеров в настоящее время рассматривается ацетилцистеин (АЦЦ), аддукт которого с ипритом известен в качестве одного из характерных биомаркеров воздействия этого ОВ на организм. Можно полагать, что терапия пораженных с помощью АЦЦ будет влиять на образование и кинетику выведения аддукта

сернистого иприта с ДНК. Валидированные методики для определения аддуктов сернистого иприта с ДНК и АЦЦ в биопробах не были ранее разработаны.

Представляется важным формирование общего подхода к определению в биопробах, в частности в моче, аддуктов и других алкилирующих агентов с ДНК. Так, в терапии онкологических заболеваний широко применяется циклофосфамид (ЦФА), являющийся производным азотистого иприта (HN-2) и обладающий выраженным цитостатическим эффектом, который также явился объектом исследования в данной работе.

Цель работы - разработка аналитической схемы хроматомасс-спектрометрического анализа биологических образцов и методического обеспечения молекулярного биомониторинга генотоксического действия алкилирующих агентов на примере сернистого иприта в условиях терапии скавенджером (ацетилцистеином).

Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи:

1. Обоснование и выбор оптимального биомаркера в ряду аддуктов сернистого иприта с ДНК;
2. Изучение возможности синтеза стандартного образца выявленного биомаркера;
3. Разработка методики определения выявленного аддукта сернистого иприта с ДНК в моче и в крови - N7-(2-гидроксиэтилтиоэтил)-2'-гуанина (N7-НЕТЕГ);
4. Оценка возможности совместного определения выявленного аддукта сернистого иприта с ДНК и продукта взаимодействия сернистого иприта со скавенджером - 1,1'-сульфонилбис[2-S-(N-ацетилцистеинил)этан]а (СБАЦЭ) в оптимальной биоматрице;
5. Апробация разработанной методики при анализе мочи лабораторных животных, экспонированных сублетальной дозой сернистого иприта в условиях терапии скавенджером и в отсутствие терапии;
6. Изучение возможности применения разработанной аналитической схемы для целей биомониторинга воздействия других цитостатиков на примере циклофосфамида (ЦФА, 2-[бис-(2-хлорэтил)амино]-тетрагидро-2Н-1,3,2-оксазафосфорин-2-оксида).

Научная новизна

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

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

Практическая значимость работы

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

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

Положения, выносимые на защиту:

1. Методика определения N7-НЕТЕГ в моче и крови методом ВЭЖХ-МС/МС. Синтез образца сравнения. Подбор внутреннего стандарта
2. Методика совместного определения аддуктов сернистого иприта с ДНК и АЦЦ в моче и результаты ее валидационных испытаний.
3. Апробация разработанной методики в опытах *in vivo* на группах лабораторных животных, экспонированных сернистым ипритом и АЦЦ и только сернистым ипритом.
4. Применение разработанной методики определения аддуктов лекарственных препаратов с ДНК в биологических образцах на примере циклофосфамида.

Публикации и апробация работы.

Материалы диссертационной работы опубликованы в 6 статьях в журналах, рекомендованных ВАК, и 8 тезисах докладов. Результаты исследований представлены на международных и всероссийских конференциях.

Структура и объем работы.

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы (глава 1), экспериментальной части (глава 2), обсуждения полученных результатов (главы 3-5), выводов, заключения и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 105 страницах машинописного текста, содержит 27 рисунков и 6 таблиц, список использованных источников - 149 наименований

Личный вклад автора состоял в постановке и выполнении экспериментальных исследований, практической апробации полученных результатов, интерпретации данных, написании статей, подготовке докладов и их представлении на конференциях.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность и практическая значимость работы, сформулированы цели и задачи диссертационного исследования, отмечены его научная новизна и практическая значимость, сформулированы основные положения, выносимые на защиту.

1-я глава (обзор литературы) включает анализ литературных данных, посвященных проблемам определения известных метаболитов сернистого иприта и других алкилирующих агентов в биопробах с подробной характеристикой целевых аналитов – аддуктов с ДНК.

Сернистый иприт способен образовывать аддукты с ДНК, что объясняет его генотоксическое и канцерогенное действие. В настоящее время известны 4 типа аддуктов сернистого иприта с ДНК: N7-(2-гидроксиэтилтиоэтил)-2'-гуанин (**N7-НЕТЕГ**), бис-(2-этил-N7-гуанин)тиоэфир (**Bis-G**), N3 - (2-гидроксиэтилтиоэтил) - 2' -аденин (**N3-НЕТЕА**) и O6-(2-гидроксиэтилтиоэтил)-2'-гуанин (O6 - НЕТЕГ). Структурные формулы аддуктов приведены на рис. 1.

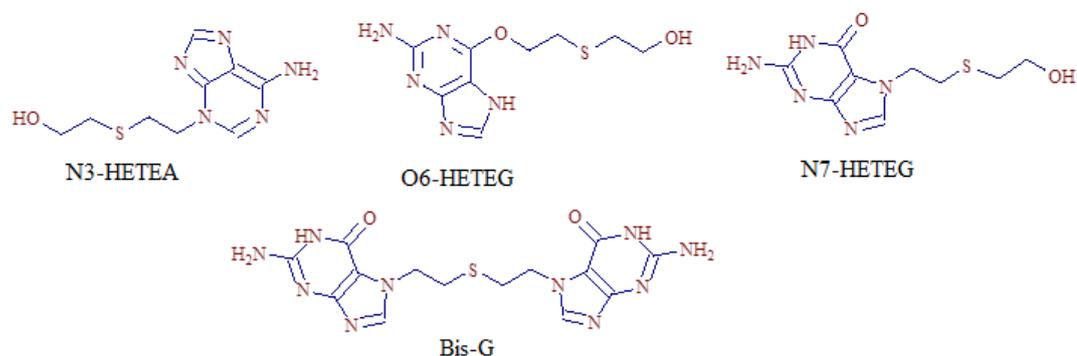


Рисунок 1 – Структурные формулы аддуктов СИ-ДНК

Рассмотрены существующие методы выделения и идентификации аддуктов с ДНК в биологических матрицах.

Согласно литературным данным, образование аддуктов протекает в соответствии со следующим процентным соотношением: по положению N7 гуанина (**N7-НЕТЕГ**) (61-67%), по

положению N3 аденина (N3-НЕТЕА) - (10-16%), по двум положениям N7 гуанина (Bis-G) (17-22%), по положению O6 гуанина (O7-НЕТЕГ) - (0.1%). Для идентификации образующихся аддуктов могут применяться различные аналитические методы: пост-введение радиоактивного изотопа ^{32}P (постлейблинг), иммуноанализ, газовая хроматомасс-спектрометрия (ГХ-МС), высокоэффективная жидкостная хроматомасс-спектрометрия (ВЭЖХ-МС). Аддукты высокотоксичных веществ с макромолекулами (белками, ДНК) являются более ретроспективными биомаркерами экспозиции живых систем отравляющими веществами, в сравнении с гидролитическими метаболитами.

Продукт взаимодействия сернистого иприта с белками и β -лиазой СБАЦЭ является биомаркером его воздействия на организм человека. Содержание этого аддукта в биологических жидкостях также зависит от факта, дозы и схемы использования скавенджеров (АЦЦ и других) при терапии отравлений, что необходимо учитывать при разработке соответствующих методик.

Разработанный на основе азотистого иприта ЦФА является одним из наиболее распространенных цитостатиков и входит в состав препаратов, используемых для химиотерапии. Поскольку ЦФА является пролекарством, для оценки токсических явлений правильнее использовать соотношение концентраций его активного метаболита фосфорамид-иприта и аддукта с ДНК. Несмотря на то, что структуры аддуктов многих алкилирующих агентов с ДНК известны, аналитические методики для их неинвазивного биомониторинга отсутствуют, чем обусловлен дефицит сведений о молекулярных механизмах терапии генотоксических эффектов с помощью скавенджеров.

По результатам проведенного анализа представлена концепция биомониторинга воздействия канцерогенов на организм путем определения продуктов их взаимодействия (аддуктов) с нуклеиновыми кислотами. Систематизированы различные аналитические методики, применяемые для биомониторинга воздействия цитостатиков.

Во 2-й главе (экспериментальная часть) рассмотрены объекты и методы исследования.

Объектами анализа являлись биологические жидкости лабораторных животных и человека, содержащие искусственные добавки определяемых соединений, а также образцы крови и мочи лабораторных животных, экспонированных алкилирующими агентами и скавенджерами, полученные в экспериментах *in vivo* и *in vitro*.

Инструментальные исследования проводили с использованием хроматомасс-спектрометрического приборного комплекса, состоящего из хроматографа модели Accela 1250 и масс-спектрометра LTQ Orbitrap Velos с электрораспылительной ионизацией при атмосферном давлении в режиме детектирования положительных ионов («Thermo», США). Разрешение по массам 60000.

Обоснован выбор стандартного образца N7-НЕТЕГ и описана методика его синтеза, очистки от примесей и выделения целевого вещества, установлены его хроматографические и масс-спектрометрические характеристики (время удерживания аналита, его молекулярный ион-предшественник и продукт-ион). Очистку синтезированного образца N7-НЕТЕГ от примесей проводили методом препаративной ВЭЖХ с использованием хроматомасс-спектрометра LCMS-2010 EV с масс-селективным детектором и детектором диодная матрица (SPD-M20A), фирмы «Shimadzu» (Япония).

Разработана методика определения N7-НЕТЕГ в моче, включающая внесение внутреннего стандарта, концентрирование и очистку аналитов из пробы мочи методом ТФЭ с последующим анализом методом ВЭЖХ-МС/МС.

При разработке методики определения N7-НЕТЕГ в крови включается дополнительная стадия извлечения ДНК из пробы экспонированной крови с применением специальных коммерческих наборов для выделения ДНК Экстран-1, далее следуют гидролиз полученного продукта, высушивание и перерастворение экстракта в 100 мкл подвижной фазы и анализ методом ВЭЖХ-МС/МС.

В 3-й главе (результаты и их обсуждение) представлены этапы разработки и апробации методики определения биомаркера генотоксического эффекта N7-НЕТЕГ в ряду аддуктов сернистого иприта с ДНК.

Обоснован выбор N7-НЕТЕГ в качестве основного биомаркера воздействия сернистого иприта, описан способ синтеза и процедура его очистки. Подобраны условия ВЭЖХ-МС/МС и ВЭЖХ-УФ анализа реакционной смеси и конечного продукта синтеза (*Синтез стандартного образца N7-НЕТЕГ проводился с участием к.х.н. В.В.Абзианидзе*). Схема синтеза N7-НЕТЕГ представлена на рис. 2, подробное описание методики синтеза приведено в диссертационной работе.

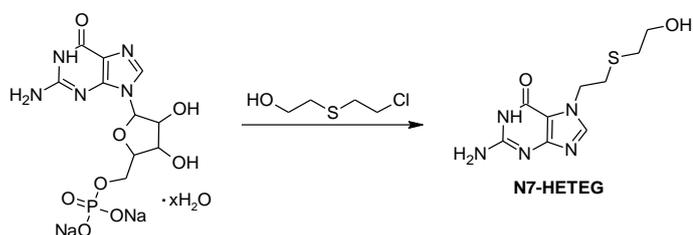


Рисунок 2 - Схема синтеза биомаркера воздействия сернистого иприта - N7-НЕТЕГ

По результатам проведенных исследований установлена стабильность выявленного аддукта в образцах мочи человека и крысы при прохождении двух циклов заморозки/разморозки и при температуре 4°C в течение 2-х суток. Оценена аналитическая чистота синтезированного стандарта.

Для подтверждения структуры и контроля чистоты синтезированный образец *N7-НЕТЕГ* растворяли в деионизованной воде до концентрации 1 мкг/мл и анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС высокого разрешения. Разделение выполняли на колонке Zorbax SB-C8, Agilent (150 мм × 4.6 мм × 1.8 мкм) в режиме изократического элюирования. Подвижная фаза: компонент А – 0,1% раствор муравьиной кислоты в деионизованной воде и компонент В – 0,1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (90/10 v/v). В результате сканирования в широком диапазоне масс в предлагаемых условиях анализа регистрируется пик соединения с точным значением m/z 256,08627, соответствующим иону $[M+H]^+$. Необходимая селективность при идентификации аналита в сложных биологических матрицах (моча, кровь) по точным значениям масс не обеспечивается, поэтому предпочтительно установить один или несколько продукт-ионов, по которым осуществляется его определение. Для этого в аналогичных условиях проводился ВЭЖХ-МС/МС анализ водного раствора синтезированного препарата *N7-НЕТЕГ*, в результате чего удалось установить используемый для идентификации характеристичный MRM переход (256,08627→105,03690).

Очистку синтезированного образца *N7-НЕТЕГ* от примесей проводили методом препаративной ВЭЖХ, идентификацию компонентов смеси проводили с помощью УФ-детектора и масс-спектрометра. Установлено, что целевое соединение *N7-НЕТЕГ*, m/z 256, элюируется с колонки в 7,75 мин, максимум поглощения был установлен при длине волны 260 нм. После подбора оптимальных условий разделения отключался масс-спектрометрический детектор, а объем аликвоты пробы, вводимой в хроматограф, увеличивался до 100 мкл, сбор очищенной фракции осуществляли вручную. Образец *N7-НЕТЕГ* после очистки высушивали в роторном испарителе и использовали в дальнейших исследованиях в качестве аналитического стандарта с установленным методом ЯМР содержанием основного вещества 90,0 %.

Раздел 3.2 посвящен разработке методик определения *N7-НЕТЕГ* в моче и крови. Выбор биоматрицы является важным этапом разработки методики. В случае аддуктов цитостатиков с ДНК в качестве матрицы может выступать либо цельная кровь, в таком случае требуется выделение и затем гидролиз ДНК с целью обнаружения аддуктов, либо моча, в которой аддукты находятся уже в депуринизированном состоянии, и достаточно их просто сконцентрировать. С целью выбора оптимальной матрицы, нами опробованы оба варианта. Схема подготовки проб для определения *N7-НЕТЕГ* в моче представлена на рис. 3.

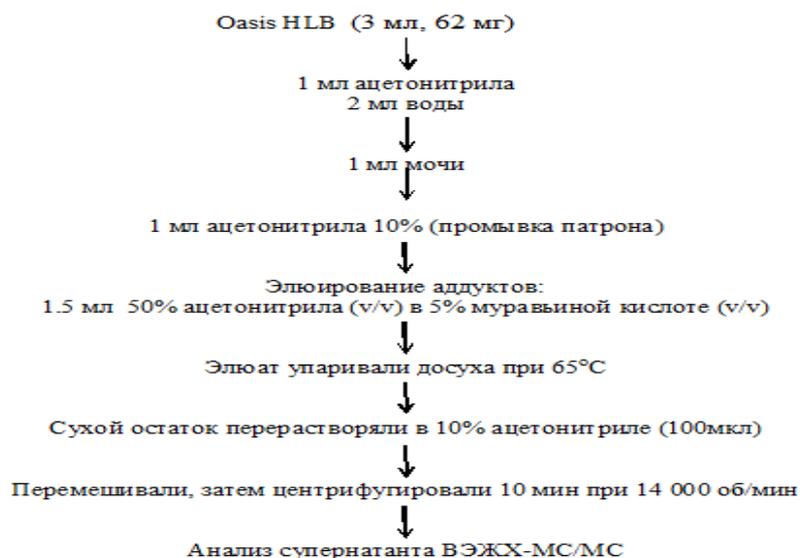


Рисунок 3 – Схема пробоподготовки мочи для определения N7-НЕТЕГ

В качестве внутреннего стандарта использовали 8-(1-гидроксипутан-2-иламино)-1,3,7-триметил-1-пурин-2,6(3Н,7Н), синтезированный в лаборатории химического моделирования ФГУП «НИИ ГПЭЧ», структурная формула которого приведена на рис. 4.

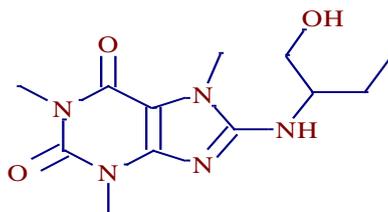


Рисунок 4 - Структурная формула внутреннего стандарта - 8-(1-гидроксипутан-2-иламино)-1,3,7-триметил-1-пурин-2,6(3Н,7Н)

На рис. 5 приведены масс-хроматограммы мочи крыс с внесением 100 нг N7-НЕТЕГ, реконструированные по m/z 256,08, характерному для иона-предшественника N7-НЕТЕГ (А), по выделенным ионам характерного для N7-НЕТЕГ MRM-перехода (256,08→105,0369) (Б) и по выделенным ионам характерного для внутреннего стандарта MRM-перехода (282,16→210,09855) (В). Как видно из рис.5, в моче крыс с высокими содержаниями N7-НЕТЕГ присутствует соединение, продуцирующее сигнал с m/z 256,08, которое при пробоподготовке элюируется с патрона вместе с аналитом и вызывает помехи при идентификации и оценке содержания N7-НЕТЕГ в пробе. В таком случае идентификацию аддукта целесообразно проводить только по продукт-иону и использовать нормировку по внутреннему стандарту.

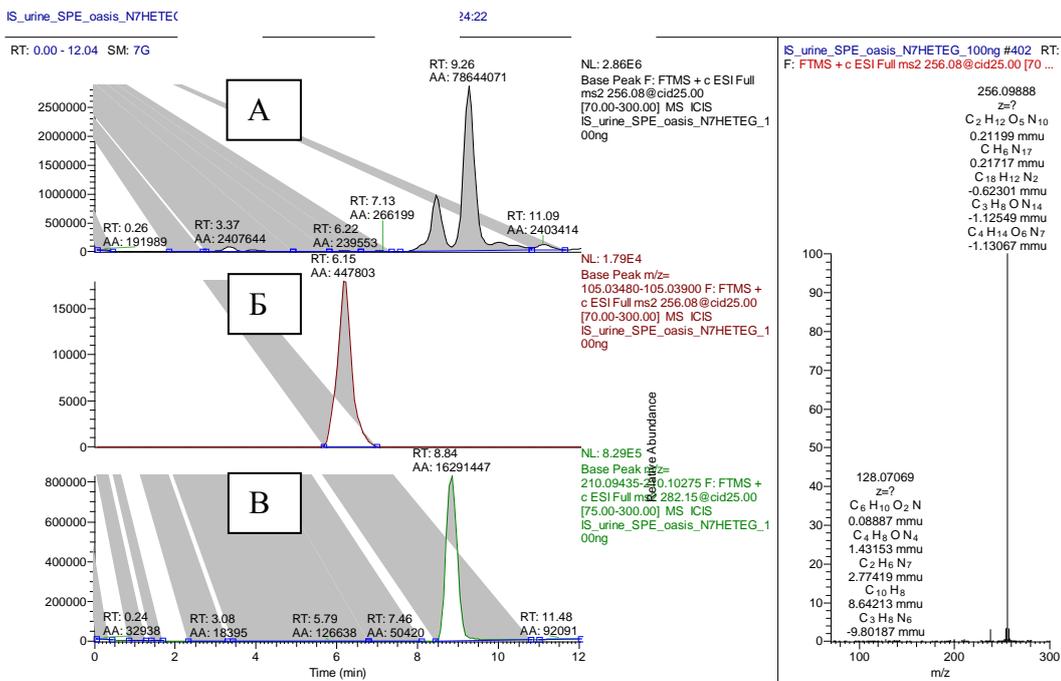


Рисунок 5 - Масс-хроматограммы проб мочи крыс, реконструированные по: m/z 256,08, характерному для иона-предшественника N7-НЕТЕГ (А); выделенным ионам характерного для N7-НЕТЕГ MRM-перехода (256,08→105,0369) (Б) и для внутреннего стандарта MRM-перехода (282,16→210,09855) (В)

Матричные эффекты снижаются лишь незначительно путем разбавления экстракта 100 мкл воды и подбором условий хроматографирования. Для получения градуировочной характеристики была приготовлена и проанализирована серия проб мочи крыс с внесением N7-НЕТЕГ в концентрациях 1, 10, 100 нг/мл и добавкой внутреннего стандарта в концентрации 1 нг/мл. На основании полученных данных вычисляли относительные площади пика N7-НЕТЕГ и строили график зависимости относительной площади пика от концентрации (рис. 6).

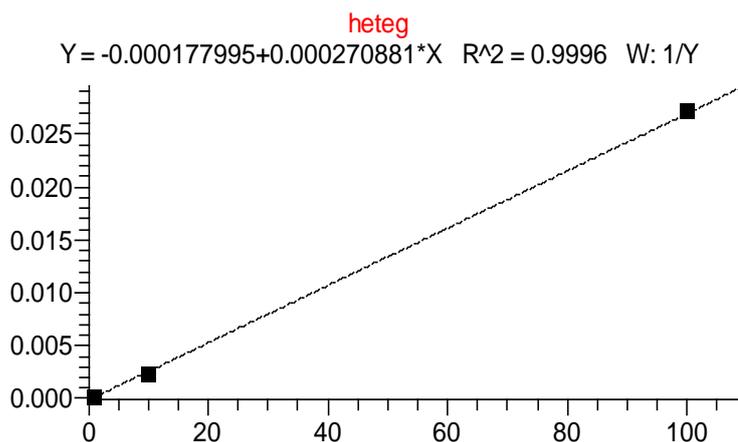


Рисунок 6 - Зависимость нормализованной площади пика N7-НЕТЕГ от концентрации в моче

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

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

Разработанная методика **определения N7-НЕТЕГ в крови** включает извлечение ДНК из 2 мл экспонированной крови с применением набора «Экстран-1», внесение внутреннего стандарта, гидролиз ДНК при добавлении 10 мкл 1% муравьиной кислоты и инкубировании в течение 1 часа при 80 °С, перерастворение в 100 мкл подвижной фазы и анализ методом ВЭЖХ-МС/МС. Эффективность гидролиза ДНК контролировали по площади пика гуанина. В качестве внутреннего стандарта использовали, как и в случае анализа мочи, 8-(1-гидроксипутан-2-иламино)-1,3,7-триметил-1-пурин-2,6(3Н,7Н). В эксперименте *in vitro* серию проб крови человека и крыс (1 мл) экспонировали раствором сернистого иприта с концентрациями 10 нг/мл, 50 нг/мл, 100 нг/мл, 1 мкг/мл и 10 мкг/мл. К 1 мл цельной крови добавляли раствор сернистого иприта, встряхивали на вортексе 10 мин и инкубировали 1 ч при температуре 37°С.

Было установлено, что N7-НЕТЕГ детектируется в крови только в режиме *in vitro* при внесении чрезвычайно высоких доз сернистого иприта (от 1 мг/мл). На рис. 7 приведена масс-хроматограмма пробы крови человека, экспонированной сернистым ипритом в концентрации 10 мг/мл.

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

Разработанные методики апробированы при анализе биообразцов, полученных в экспериментах *in vivo* (кровь, моча, раздел 3.2.3). В эксперименте *in vivo* анестезированным крысам подкожно вводили сернистый иприт в дозе 2 мг/кг. Мочу крыс отбирали с использованием метаболических камер через 2, 3, 7, 14 и 21 сутки после воздействия сернистого иприта. Кровь крыс отбирали через 1, 2, 3, 7, 14 и 21 сутки. В пробах мочи крыс, полученной в эксперименте *in vivo*, N7-НЕТЕГ успешно детектировался до 7-ми суток после введения сернистого иприта (табл. 1).

Ни в одной из проб крови, полученных в эксперименте *in vivo*, не удалось детектировать N7-НЕТЕГ, несмотря на присутствие пика гуанина, подтверждающего разложение ДНК. С учетом результатов токсикологического эксперимента в качестве перспективной биоматрицы для определения N7-НЕТЕГ была выбрана моча.

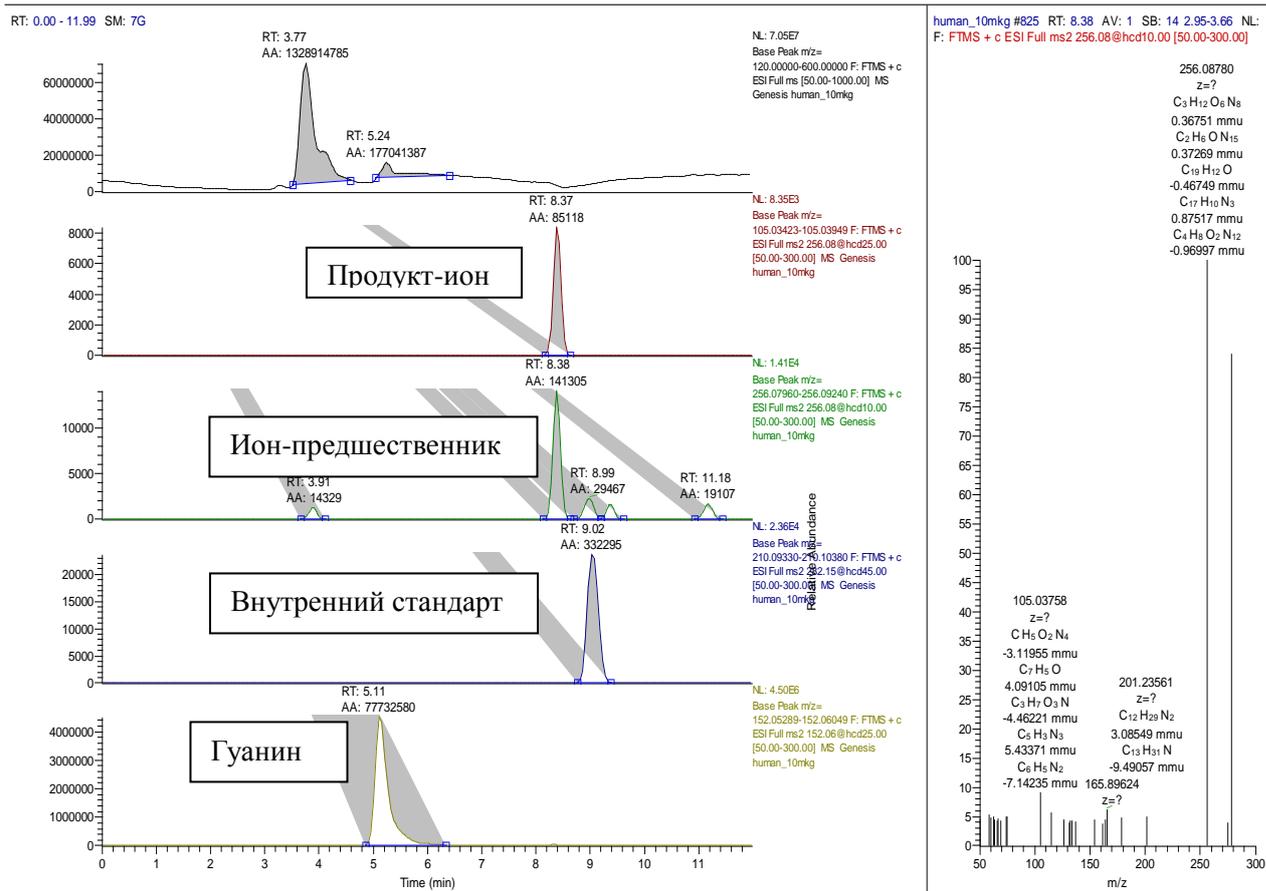


Рисунок 7 - Масс-хроматограмма пробы крови человека, экспонированной сернистым ипритом

Таблица 1 – Результаты определения N7-НЕТЕГ в моче крыс, экспонированных серным ипритом, доза 2 мг/кг

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

Успешное определение аддукта в моче обусловлено тем, что его экскреция с мочой происходит уже в депуринизированном виде, что создает благоприятные условия для анализа. Кроме того, для целей биомониторинга неинвазивный отбор мочи предпочтителен в сравнении с отбором крови. По этим причинам моча была выбрана в качестве исследуемой биоматрицы при разработке методического обеспечения для оценки эффективности АЦЦ в качестве сканенджера при поражениях сернистым ипритом. Основу методического обеспечения составляла методика совместного определения в моче аддуктов сернистого иприта с ДНК (N7-НЕТЕГ) и АЦЦ (СБАЦЭ).

В главе 4 представлены результаты разработки и апробации в токсикологическом эксперименте методики совместного определения аддуктов сернистого иприта с ДНК и АЦЦ в моче

Продукт взаимодействия сернистого иприта с белками и β-лиазой СБАЦЭ является экзогенным соединением, присутствие которого однозначно указывает на имевший место факт воздействия сернистого иприта на организм человека и животных. В то же время, профиль экскреции этого биомаркера в наибольшей степени должен испытывать влияние введения скавенджера (АЦЦ). Структурная формула СБАЦЭ приведена на рис. 8.

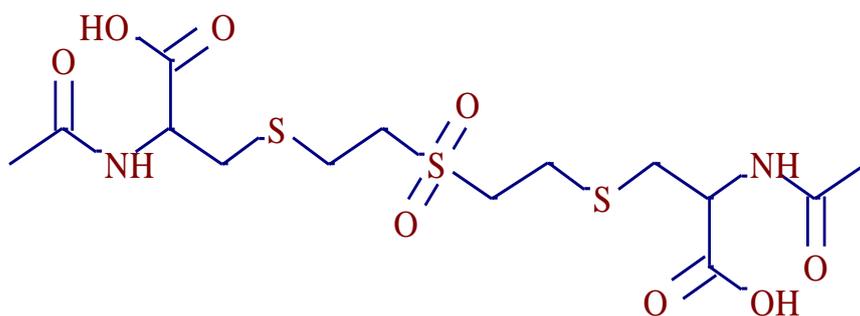


Рисунок 8 - Структурная формула СБАЦЭ

В разделе 4.1 рассмотрены этапы разработки методики совместного определения N7-НЕТЕГ и СБАЦЭ в моче. Определение двух аналитов в рамках одной методики потребовало переработки процедуры, разработанной ранее для определения N7-НЕТЕГ в моче. Сравнительный анализ двух методик приведен в табл. 2, а аналитические характеристики исследуемых соединений представлены в табл. 3.

Таблица 2 - Сравнительные характеристики методик определения N7-НЕТЕГ и совместного определения N7-НЕТЕГ и СБАЦЭ в моче

Элемент методики	N7-НЕТЕГ	N7-НЕТЕГ и СБАЦЭ
Картридж для ТФЭ	Oasis HLB (3 мл, 62 мг)	ENVI-8 (3 мл, 500 мг)
Кондиционирование	1 мл ацетонитрила, 2 мл воды	2x1 мл ацетонитрила, 3x1 мл воды
Загрузка образца	1 мл мочи с внутр. стандартом (10 нг/мл)	1 мл мочи с внутр. стандартом (10 нг/мл)
Промывка	1 мл 10% ацетонитрила в вде	-
Элюирование	Однократно 1,5 мл 50 % ацетонитрила в 5 % муравьиной кислоте	Двумя порциями по 1 мл 60 % ацетонитрила в 5 % муравьиной кислоте
Перерастворение сухого остатка элюента	100 мкл 10% ацетонитрила	100 мкл 10% ацетонитрила
Отделение осадка	Центрифугирование 10 мин. при 14 об/мин	Центрифугирование 10 мин. при 14 об/мин

Разбавление	-	100 мкл воды
ВЭЖХ, RT анализов	Режим элюирования: : 0 мин – 90% А, 2 мин – 90% А, 7 мин – 10% А, 9 мин – 10% А, 9,1 мин – 90% А, 12 мин – 90% А RT (N7-НЕТЕГ) 6,1±0,1	Режим элюирования: 0 мин – 80% А, 2 мин – 80% А, 7 мин – 10% А, 9 мин – 10% А, 9,1 мин – 80% А, 12 мин – 80% А. RT (N7-НЕТЕГ) 3,8±0,1
МС/МС сигналы регистрации анализов	256,07924→105.03690	256,07924→105.03690 445,07675→403.06454; 445,07675→357,0607

Таблица 3 - Идентификационные характеристики анализов

Аналит	Продукт-ион*	Характерные MRM-переходы	RT, мин
СБАЦЭ	357,0607	445,07675→403.06454; 445,07675→357,0607	4,8±0,1
N7-НЕТЕГ	105,03690	256,07924→105.03690	3,8±0,1
Внутренний стандарт	210,09855	282,15607→210,09855	7,5±0,1

*m/z для количественных определений

При разработке методики определения анализов проводилось сравнение эффективности методов ТФЭ (табл. 4) для извлечения и концентрирования N7-НЕТЕГ и СБАЦЭ из мочи крыс. Т.к. для анализа выбраны вещества с сильно различающимися свойствами, при разработке процедуры извлечения и концентрирования возникли значительные трудности. На основе разработанной схемы ТФЭ для N7-НЕТЕГ нами было опробовано несколько вариантов ее модификации, включая подбор патронов для ТФЭ и условий элюирования. Была приготовлена серия проб мочи крыс с внесением N7-НЕТЕГ и СБАЦЭ. Для разработки методики совместного определения аддуктов сернистого иприта с ДНК и АЦЦ требовалось подобрать способы их очистки и извлечения, оптимальные для обоих анализов. С этой целью были опробованы следующие виды коммерчески доступных картриджей ТФЭ: OASIS HLB, Supelco HLB, Supelclean ENVI-8, Supelco C18, Sep-Pack C18. На картриджи наносили по 1 мл пулированной мочи крыс, содержащей искусственные добавки обоих анализов в концентрации 100 нг/мл и внутренний стандарт в количестве 10 нг с последующей обработкой различными элюентами в разных режимах. Эффективность извлечения анализов оценивали по площадям пиков продукт-ионов N7-НЕТЕГ (m/z 105.03690) и СБАЦЭ (m/z 403.06454). В качестве элюентов были опробованы различные системы растворителей (метанол-вода, ацетонитрил-вода, подкисленные муравьиной кислотой в различных концентрациях) в разных объемных соотношениях.

Таблица 4 – Оптимизация условий ТФЭ при определении N7-НЕТЕГ и СБАЦЭ

Наименование	Площади пиков, тыс. у.е.			
	Загрузка	10% ацетонитрил	50% ацетонитрил	90% ацетонитрил
Supelco HLB				
N7-НЕТЕГ (105.03690)	62	6700	54	-
СБАЦЭ (403.06454)	3800	1100	16	-
ENVI-8				
N7-НЕТЕГ (105.03690)	-	3800	550	-
СБАЦЭ (403.06454)	-	-	6300	-
OASIS HLB				
N7-НЕТЕГ (105.03690)	-	7400	700	-
СБАЦЭ (403.06454)	230	7300	50	-
Diol				
N7-НЕТЕГ (105.03690)	500	3700	120	66
СБАЦЭ (403.06454)	1900	3500	200	34
Supelco C18				
N7-НЕТЕГ (105.03690)	2600	37	130	-
СБАЦЭ (403.06454)	1700	4500	230	32

Замена ацетонитрила на метанол в качестве составляющей элюента не дала выраженных преимуществ, равно как и варьирование pH элюента. После обобщения и анализа полученных данных для проведения экстракции было решено использовать патроны ENVI-8 фирмы Supelco. Стадией промывки патронов пришлось пренебречь, чтобы не допустить потерь аналита. Оптимальная схема подготовки проб к анализу включала предварительное кондиционирование патрона ENVI-8 (фирмы Supelco) двукратной промывкой 1 мл ацетонитрила с последующей трехкратной промывкой 1 мл воды, затем загрузку 1 мл содержащей 10 нг внутреннего стандарта мочи, элюирование аналитов двумя порциями по 1 мл 60 % ацетонитрила в 5 % муравьиной кислоте (v/v), перерастворение объединенного элюата в 100 мкл смеси равных объемов ацетонитрила и воды, центрифугирование и разбавление 100 мкл воды.

С использованием градуировочных характеристик была проанализирована серия проб мочи крыс с внесением N7-НЕТЕГ и СБАЦЭ с концентрациями 1, 10, 50, 100 и 200 нг/мл и добавкой внутреннего стандарта с концентрацией 10 нг/мл. Графики зависимости относительных площадей пиков от концентраций аналитов представлены на рис. 9.

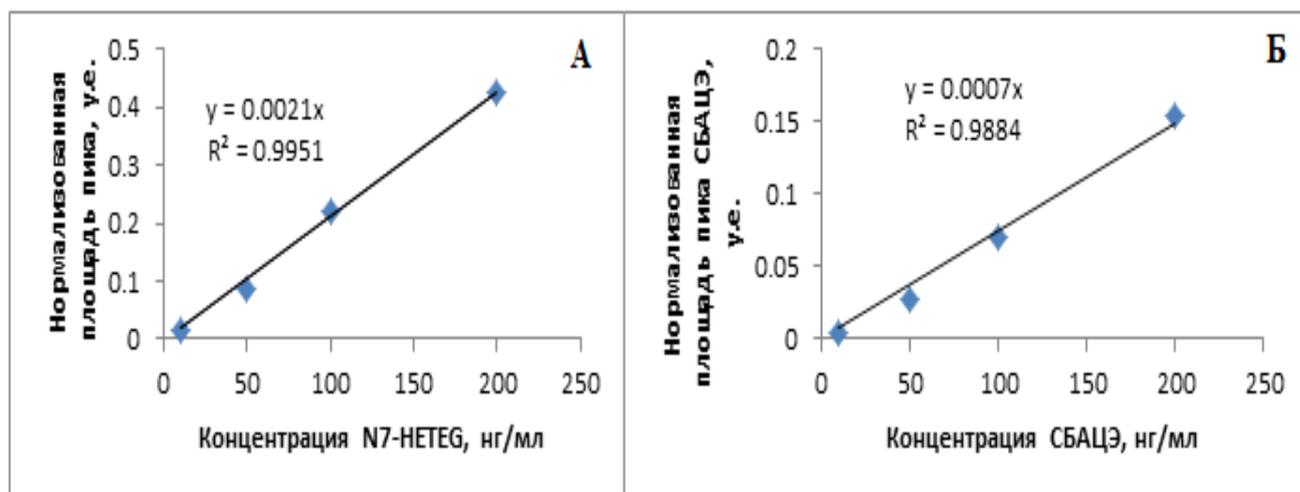


Рисунок 9 - Графики зависимости нормализованной площади пика от концентрации N7-НЕТЕГ (А) и СБАЦЭ (Б)

При большом количестве проведенных опытов и использовании внутреннего стандарта достигаются удовлетворительные значения коэффициента вариации (15%). Матричный фактор, оцененный для N7-НЕТЕГ, и нормализованный по внутреннему стандарту, составляет 15%. Для СБАЦЭ матричный фактор, нормализованный на внутренний стандарт, составил 136%. Степень извлечения N7-НЕТЕГ, нормализованная по внутреннему стандарту, составляет 17%, для СБАЦЭ - 120%.

В разделе 4.2 описана процедура апробации разработанной методики в опыте *in vivo* на группах лабораторных животных. Для апробации разработанной методики проводился токсикологический эксперимент с двумя группами по 5 анестезированных крыс, одна из которых получала внутривентриально серный иприт в дозе $\frac{1}{4}$ LD50 (2 мг/кг), другая – ту же дозу сернистого иприта в сочетании с терапией АЦЦ. Раствор АЦЦ вводили двукратно в дозе 200 мг/кг за 3 ч и за 0,5 ч перед введением сернистого иприта. Предварительно у всех задействованных в эксперименте крыс были взяты образцы мочи (холостая проба). Мочу крыс отбирали с использованием метаболических камер через 3 часа, 1, 2, 3, 7 сутки после экспозиции. Полученные пробы анализировали согласно разработанной методике. Мочу каждой крысы анализировали отдельно. Полученный результат усредняли. На основе собранных данных были построены диаграммы, графически иллюстрирующие кинетику выведения аддуктов с мочой.

На основе собранных данных были построены диаграммы, графически иллюстрирующие кинетику выведения аддуктов с мочой (рис. 10).

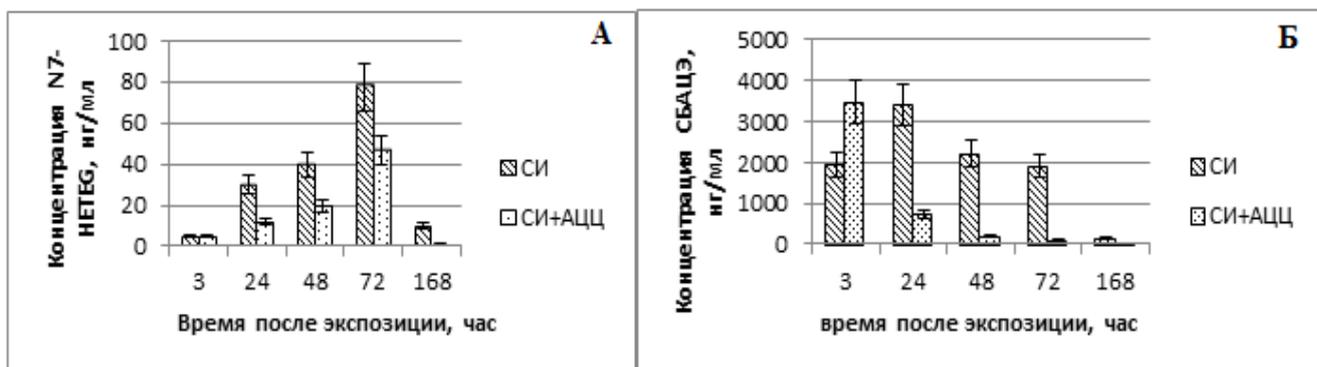


Рисунок 10 - Профили экскреции N7-НЕТЕГ (А) и СБАЦЭ (Б) при экспозиции сернистым ипритом (СИ) без введения скавенджера и с лечением АЦЦ

Как следует из диаграмм, в пробах мочи крыс, получавших терапию АЦЦ, содержание аддукта N7-НЕТЕГ значительно ниже, что свидетельствует о защитном действии скавенджера, препятствующем повреждению ДНК. При использовании скавенджера выведение сернистого иприта из организма в форме СБАЦЭ происходит более активно в быстрой фазе элиминации (в первые сутки после экспозиции), период его выведения у крыс, получавших лечение, значительно сокращен, по сравнению с особями, которым не вводили АЦЦ. Таким образом, разработанная методика позволила на молекулярном уровне продемонстрировать влияние скавенджера на скорость выведения токсиканта из организма и позволила сделать обоснованное предположение о защитном действии АЦЦ от повреждения ДНК, обусловленного воздействием сернистого иприта.

Раздел 5 посвящен оценке возможности адаптации разработанной методики для определения аддуктов ДНК с другими цитостатиками на примере циклофосфида (ЦФА), представляющего собой пролекарство, продукты метаболизма которого действуют как алкилирующие агенты по отношению к гуаниновому основанию ДНК, что влечет за собой ее повреждение и образование моно-аддукта *N*-[2-(*N*7-гуанинил)этил]-*N*-[2-гидроксиэтил]-амин (**G-NOR-OH**), образующегося из гидролитически нестабильного *N*-[2-(*N*7-гуанинил)этил]-*N*-[2-хлорэтил]-амин (**G-NOR**) и перекрестношитого аддукта *N,N*-bis[2-(*N*7-гуанинил)этил] амин

(G-NOR-G). Схема образования аддуктов ЦФА с ДНК представлена на рис. 11.

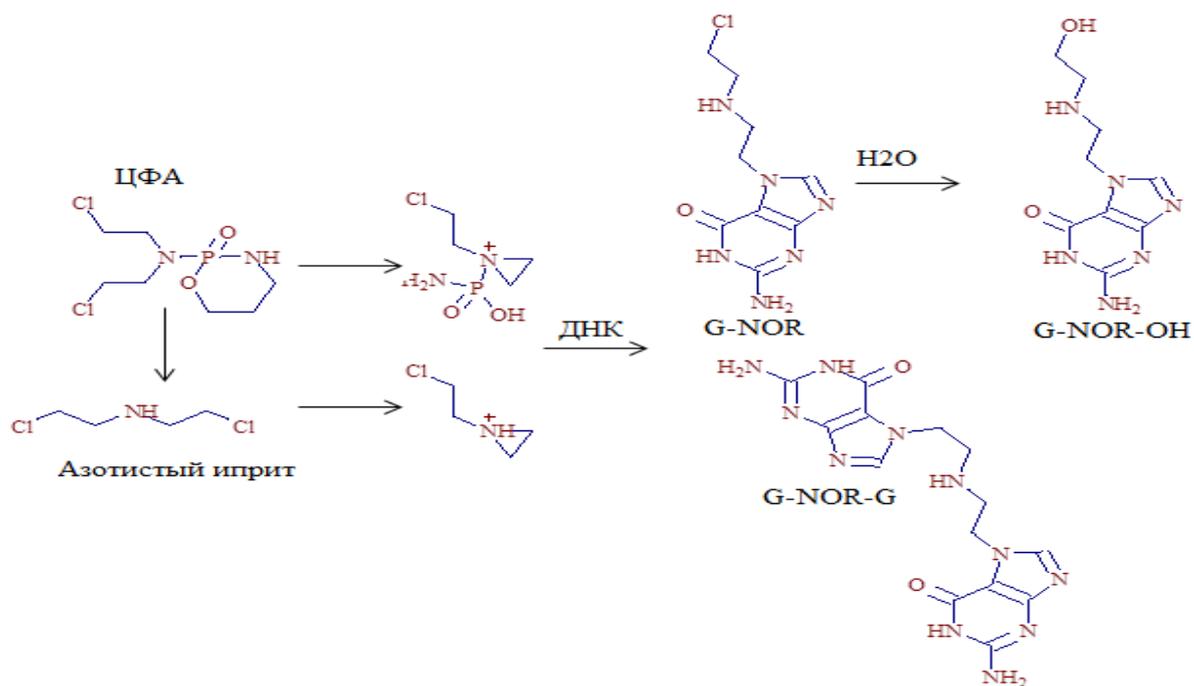


Рисунок 11 – Схема образования аддуктов ЦФА с ДНК

В отсутствие стандартных образцов аддуктов ДНК-ЦФА, исследование проводили исключительно в затравочном эксперименте *in vivo*, поставленном с целью выяснить степень влияния скавенджера (АЦЦ) на процесс элиминации из организма продуктов взаимодействия ЦФА и ДНК (G-NOR, G-NOR-OH, G-NOR-G). Опыт провели с двумя группами крыс, одна из которых получала внутривенно ЦФА в дозе 200 мг/кг, другая – ту же дозу ЦФА в сочетании с терапией АЦЦ. Раствор АЦЦ вводили двукратно за 3 ч и за 0,5 ч перед введением ЦФА в дозе 200 мг/кг. Схема отбора мочи была той же, что и в предыдущем эксперименте. Полученные пробы анализировали согласно разработанной для N7-НЕТЕГ методике с использованием идентификационных характеристик аддуктов ДНК с ЦФА. Из литературных данных известны основные продукты взаимодействия ЦФА с ДНК, которые и явились объектом исследования. Масс-спектральные характеристики исследуемых соединений представлены в таблице 5. На основе собранных данных были построены графики, иллюстрирующие кинетику выведения трех основных аддуктов ЦФА с ДНК. Установлено, что, как и ожидалось, количество G-NOR максимально в точке 3 часа и далее экспоненциально падает, выходя к точке 7 суток к значениям, близким к пределу обнаружения, в то время как содержание G-NOR-OH и G-NOR-G обнаруживает максимум в точке 1 сутки. Введение крысам АЦЦ вызывает резкое (приблизительно в 2-3 раза) повышение содержания всех трех аддуктов в моче, при этом сроки выведения меняются незначительно, а профиль экскреции имеет ту же форму. В ходе исследования ни в одной пробе мочи не был обнаружен описанный в литературе аддукт Sys-NOR-G.

Таблица 5 – Характеристики определяемых аддуктов ДНК с ЦФА

Аналит	Продукт-ион*	Характерные MRM-переходы	Время удерживания, мин
G-NOR	152.05669;	257.097121→152.05669 257.097121→178.07234	3.7±0,1
G-NOR-OH	152.05669	239.12510→152.05669; 239.12510→221.011454 239.12510→178.07234	3.7±0,1
G-NOR-G	221.11454	372.16395→221.11454; 372.16395→178.07234	4.0±0,1
Cys-NOR-G	-	342.13428→191.08487; 342.13428→152.05669	-

*m/z для количественных определений

На рис. 12 представлены профили экскреции всех трех аддуктов ЦФА с ДНК, полученных в эксперименте без введения скавенджера. Аддукт G-NOR сразу после введения ЦФА начинает выделяться с мочой в максимальном количестве, максимум экскреции G-NOR-OH регистрируется через сутки, а G-NOR-G – через двое суток.

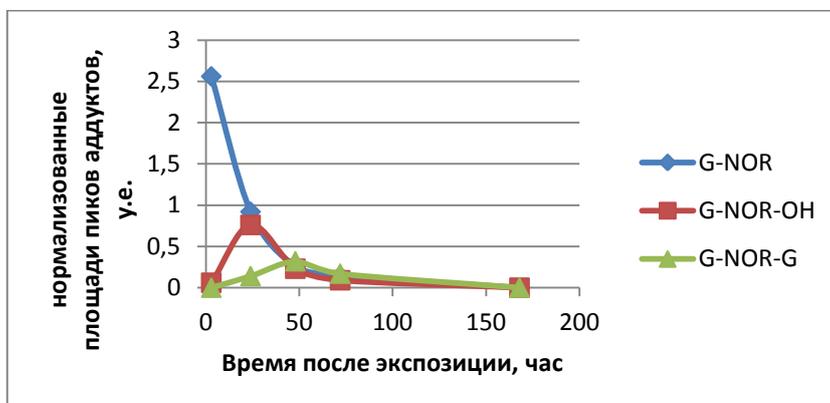


Рисунок 12 – Профили экскреции аддуктов ЦФА с ДНК

На рис. 13 представлены гистограммы, иллюстрирующие изменение кинетики выведения аддуктов ЦФА с ДНК в присутствии скавенджера.

Полученные данные свидетельствуют о том, что при выбранной схеме применения (режим введения, дозы) АЦЦ не оказывает протективного действия в отношении ЦФА, а напротив – усиливает его повреждающее воздействие на ДНК. Этот эффект может быть обусловлен тем известным обстоятельством, что АЦЦ способствует повышению биодоступности ЦФА, увеличивая его абсорбцию из системного кровотока в ткани. Важно отметить, что эффект, установленный на молекулярном уровне, подтверждается результатами

токсикологического эксперимента. Животные, получавшие ЦФА в сочетании с АЦЦ, погибли, а получавшие только ЦФА – преимущественно выжили. Эффект нельзя трактовать как заведомо негативный. Возможно, введение АЦЦ позволит снизить эффективную дозу ЦФА. Полученный результат относится к данному дизайну исследования и не может быть распространен на общие выводы о наличии или отсутствии протективного действия АЦЦ в отношении ЦФА.

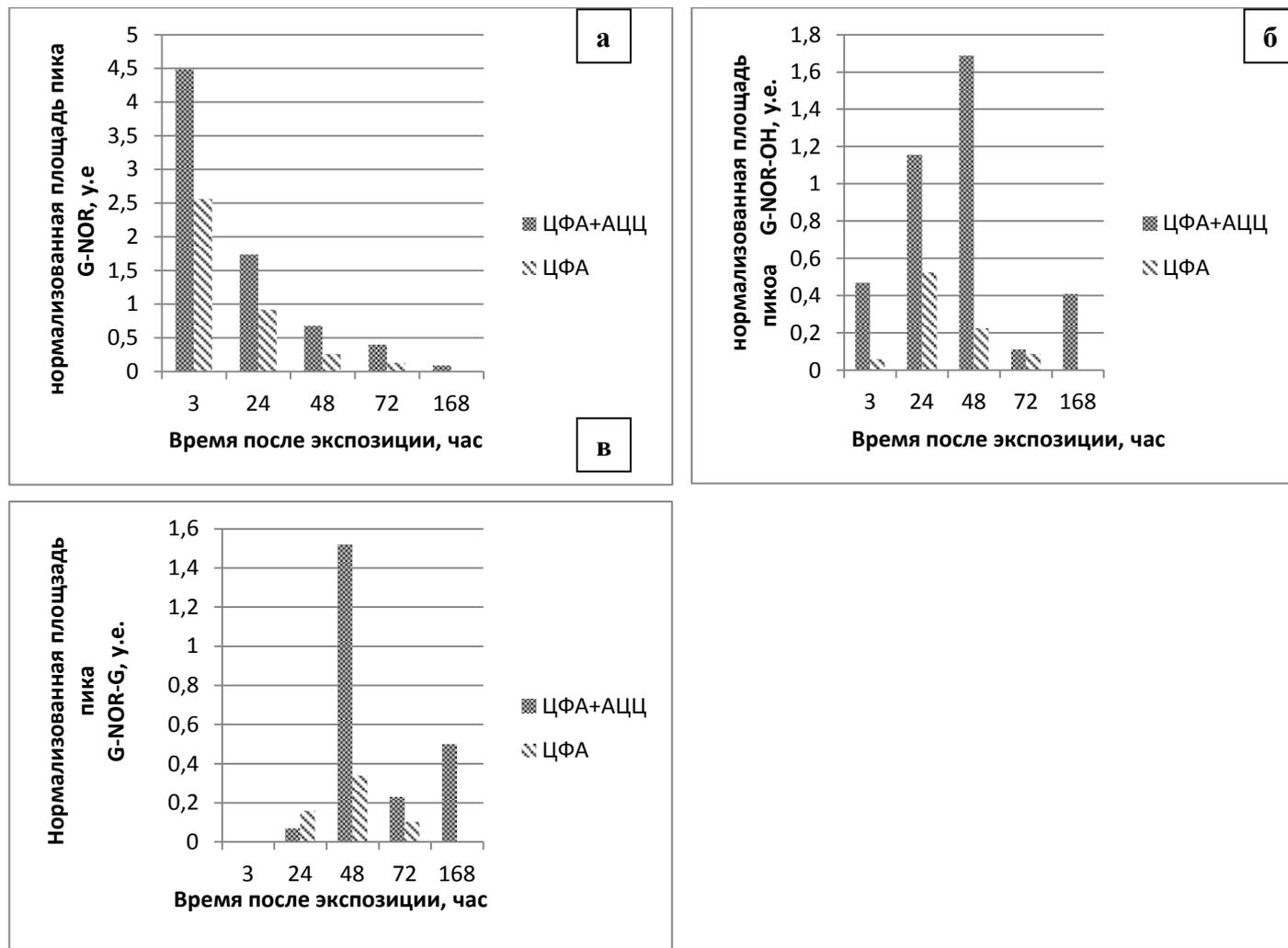


Рисунок 13- Гистограммы, демонстрирующие выведение аддуктов ЦФА с ДНК: (а) G-NOR, (б) G-NOR-OH, (в) G-NOR-G

С позиций аналитики важно отметить, что даже в отсутствие аналитических стандартов определяемых биомаркеров их соотношение позволяет характеризовать повреждающее воздействие цитостатиков на ДНК и целесообразность/эффективность схемы терапии сквенджерами.

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

ВЫВОДЫ

1. Разработана методика совместного ВЭЖХ-МС-МС определения аддуктов сернистого иприта с ДНК и белками на примере N7-НЕТЕГ и СБАЦЭ в моче лабораторных животных, позволяющая проводить определение аналитов на уровне от 5 нг/мл при относительной ошибке определения не более 15 %, идентифицировать биомаркеры воздействия сернистого иприта и оценить повреждения организма.

2. Обоснован выбор в качестве стандартного образца N7 - (2-гидроксиэтилтиоэтил)-2'-гуанина - N7-НЕТЕГ при определении аддуктов сернистого иприта с ДНК и белками, описана методика его синтеза, очистки от примесей и выделения целевого вещества, установлены его хроматографические и масс-спектрометрические характеристики (время удерживания аналита, его молекулярный ион-предшественник и продукт-ион). Установлена стабильность выявленного биомаркера при изучении кинетики экскреции N7-НЕТЕГ и СБАЦЭ *in vivo*.

3. Разработаны методики определения N7-НЕТЕГ в моче и крови методом ВЭЖХ-МС/МС. Установлено, что кровь может использоваться в качестве матрицы для определения аддуктов сернистого иприта с ДНК только при воздействии высоких доз. Моча, в которой аддукты цитостатиков с ДНК присутствуют в депуринизированном виде, является оптимальной матрицей для анализа и проведения биомониторинга.

4. Показана возможность определения аддуктов ДНК с лекарственными препаратами алкилирующего действия на примере ЦФА. Определены основные продукты взаимодействия ЦФА с ДНК, получены их масс-спектральные характеристики. Предложенная аналитическая схема анализа позволила в доклиническом эксперименте изучить кинетику выведения аддуктов ЦФА с ДНК в условиях терапии АЦЦ и в отсутствие терапии.

5. Показана возможность применения разработанных методик для изучения профилей экскреции аддуктов сернистого иприта с ДНК и АЦЦ и определения аддуктов ДНК с лекарственными препаратами, обладающими алкилирующим действием. Методики обеспечивают возможность персонализированного подхода к терапии и детоксикации. Установлена возможность адаптации разработанного подхода для аналитического мониторинга повреждающего воздействия других цитостатиков (на примере циклофосфида) на ДНК.

*Основное содержание диссертационной работы изложено
в следующих публикациях:*

1. Орлова О.И., Савельева Е.И., Каракашев Г.В. Методы определения аддуктов сернистого иприта с ДНК. // Журнал аналитической химии, 2017, Т 72, № 3, С. 209-217
2. Орлова О.И., Савельева Е.И., Хлебникова Н.С. Методы обнаружения метаболитов сернистого иприта в объектах биологического происхождения. Аналитический обзор // Журнал аналитической химии, 2013, Т. 68, № 1, С.4-14
3. О.И. Орлова, Г.В. Каракашев, В.И. Шмурак, В.В. Абзианидзе, Е.И.Савельева. Определение N7-[2-[(2-гидроксиэтил)-тио]-этил]-гуанина в моче крыс как маркера воздействия сернистого иприта // Вестник СПбГУ. Физика и химия, 2017, Т. 4 (62), Вып. 3, С. 313-325.
4. Орлова О.И, Савельева Е.И., Каракашев Г.В., Вивуланец Е.В. Исследование защитного действия N-ацетилцистеина при поражениях сернистым ипритом с учётом результатов биомониторинга // Медицина экстремальных ситуаций, 2019; Т. 21(1), С. 145-154.
5. Савельева Е.И., Корягина Н.Л., Орлова О.И. Определение аддуктов отравляющих веществ с биомолекулами как биомаркеров экспозиции/эффекта // Медицина экстремальных ситуаций, 2018. Т. 20, № 3, С. 451-463
6. Савельева Е.И., Сорокоумов П.Н., Орлова О.И., Корягина Н.Л. Метод кассетного дозирования при оптимизации токсико(фармако)кинетических исследований // Химико-фармацевтический журнал, 2016, Т. 50, № 8, С. 50-55.
7. Орлова О.И., Савельева Е.И., Радилов А.С. и др. Применение биомониторинга для оценки характера и тяжести воздействия химического фактора // Медицина труда и промышленная экология, 2010, № 12, С. 28-33
8. Орлова О.И., Каракашев Г.В., Савельева Е.И., Радилов А.С. Определение аддукта сернистого иприта с ДНК в моче и крови крыс методом тандемной жидкостной хроматомасс-спектрометрии. Сборник трудов VII Всероссийской конференции с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» 09-13 октября 2017 г., Москва, С.130.
9. Orlova O.I., Savelieva E.I., Karakashev G.V., Shmurak V.I., Orlova T. I., Khlebnikova N. S., Radilov A.S. New in vivo Data on the Excretion Kinetics of a DNA Adduct of Sulfur Mustard // Abstract Book “International workshop on analysis of chemical warfare agents to mark the 20th anniversary of the CWC”. 11 -13 December. 2017. P. 71.
10. Савельева Е.И., Орлова О.И., Каракашев Г.В., Радилов А.С. Определение аддуктов ксенобиотиков с ДНК как биомаркеров генотоксического эффекта при воздействии на организм алкилирующих агентов// Материалы XXXIII межведомственной военно-научной конференции

«Совершенствование системы радиационной, химической и биологической защиты войск и населения страны в мирное и военное время. Москва 31.10.17 – 01.11.17, С.60-61

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

12. Орлова О.И., Савельева Е.И., Радилов А.С., Корягина Н.Л., Орлова О.И. Современные хроматомасс-спектрометрические технологии определения биомаркеров высокотоксичных органических соединений в биопробах.// IV Международная конференция «Актуальные научные и научно-технические проблемы обеспечения химической безопасности» 17-18 октября 2018 г, Москва, С.43

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

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

15. Савельева И.И., Орлова О.И., Каракашев Г.В., Вивуланец Е.В. Оценка защитного действия ацетилцистеина при воздействии алкилирующих агентов путем мониторинга экскреции их депуринизированных аддуктов с ДНК // Тезисы докладов XXXV научной военно-исторической конференции «27 Научному центру Министерства Обороны Российской Федерации 45 лет» 5-6 декабря 2019 г, Москва. С.13-14.