

УДК: 543.544:543.51:615.91

ИДЕНТИФИКАЦИЯ БИОМАРКЕРОВ ЭКСПОЗИЦИИ И ЭФФЕКТА 1,4-ДИХЛОРГЕКСА- ФТОРБУТЕНА-2

А.И. Уколов, М.Д. Шачнева,
А.С. Радиллов

ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, 188663 Ленинградская область, Всеволожский район, г.п. Кузьмоловский, Российская Федерация

С использованием газовой и высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием (ГХ-МС и ВЭЖХ-МС, соответственно) установлен метаболизм не изученного ранее хладона RL 316 (1,4-дихлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутена-2, далее – ДХГФ). В образцах крови и мочи крыс обнаружены и идентифицированы два летучих метаболита, являющихся 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. Всего в результате исследований выявлено и идентифицировано 15 различных ранее неизвестных метаболитов. Установлено, что основным направлением метаболизма ДХГФ является образование аддуктов с глутатионом, и их дальнейшая деградация до цистеиновых и ацетилцистеиновых аддуктов. Также, среди продуктов распада аддуктов выявлены 4-метилсульфил-1-хлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутен-2, 4-метил-сульфинил-1-хлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутен-2 и 1,1,3,4,4-пентафтор-1,4-дихлор-бутантион-2 который оказался наиболее чувствительным биомаркером. Показано, что при поступлении ДХГФ в организм не происходит его биоактивация с образованием лабильных тиокетенов которые являются основной причиной мутагенного и канцерогенного действия некоторых галогенуглеводородов.

Метаболическое профилирование плазмы крови позволило выявить потенциальные метаболические маркеры воздействия ДХГФ в концентрации 18.8 мг/м³: отношение концентраций гулоновой кислоты и мио-инозитолфосфата. Сочетание определения химических маркеров – неметаболизированной формы ДХГФ и 1,4-дихлор-1,1,3,4,4-бутантиона-2 с определением обнаруженных метаболических маркеров позволит более точно оценивать полученную дозу или уровень воздействия ДХГФ на организм людей контактирующих с ним.

Ключевые слова: 1,4-дихлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутен-2, хладон RL316, кровь, моча, хромато-масс-спектрометрия.

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

ДХГФ предназначен для использования в качестве растворителя, теплоносителя, реагента при производстве перфторбутанадиена. В настоящее время известно, что смешанные галогенпроизводные непредельных углеводородов являются высокотоксичными и опасными соединениями. Однако, токсичность ДХГФ не изучена. У ДХГФ известен еще один изомер, 2,3-дихлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбут-2-ен, который попал в сферу внимания токсикологов как примесь в галотане (фторотане) [2]. Описание токсического действия 2,3-ДХГФ включает: поражение респираторно-

го тракта (раздражение легких, пневмония, отек легких), изменения в почечных канальцах, дегенеративные изменения нейронов, хроматоз, гиперкалемия и гипонатремия, образование геморрагических зон в селезенке [3].

Тем не менее, имеющиеся в литературе сведения о токсичности 2,3-ДХГФ трудно отнести к 1,4-ДХГФ, так как многие симптомы, в частности дистрофические изменения в легких, печени и мозге [4,5] обусловлены образованием трифторуксусной кислоты в ходе метаболизма [6,7], а образование трифторуксусной кислоты из 1,4-ДХГФ невозможно, так как в структуре отсутствует трифторметильная группа.

Токсическое действие фторуглеводородов значительно отличается в зависимости от структуры [7], так, фторэтилен не оказывают вообще токсического действия, в то время как перфторизобу-

Уколов Антон Игоревич (Ukolov Anton Igorevich), кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории аналитической токсикологии ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, AntonUkolov@gmail.com
Шачнева Мария Дмитриевна (Shachneva Maria Dmitrievna), младший научный сотрудник лаборатории аналитической токсикологии ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, shachneva_mariya@mail.ru
Радиллов Андрей Станиславович (Radilov Andrey Stanislavovich), доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом токсикологии, и.о. директора ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, radilov@rihophe.ru

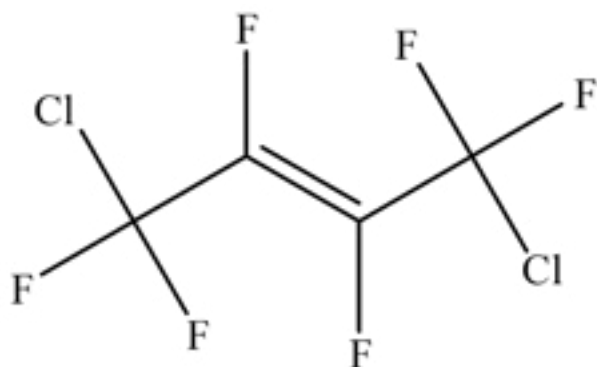


Рис.1. Структурная формула ДХГФ

тилен – крайне токсичен. Замена атомов фтора на хлор значительно повышает токсичность.

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

Несмотря на то, что метаболизм галогенированных углеводородов изучен достаточно хорошо, в литературе содержится крайне мало информации о токсичности высших галогеналкенов с числом атомов углерода более трех. При этом пути их биоактивации могут значительно отличаться в зависимости от структуры и, соответственно, могут отличаться токсическое действие, канцерогенность, мутагенность и пр. Так, например, при переходе от гексахлоробутадиена к перфторпропилену, токсические концентрации (в опытах *in vitro*) падают на два порядка [8].

Цель настоящего исследования – исследование путей химических превращений ДХГФ в организме при ингаляционном поступлении, разработка хроматомасс-спектрометрической методики определения ДХГФ в моче и крови, оценка возможностей методики при мониторинге острого и подострого воздействия ДХГФ. Нецелевое метаболическое профилирование плазмы крови и мочи [9] было проведено с целью выявления новых метаболических маркеров ингаляционного воздействия ДХГФ, а также получения новых сведений о возможном механизме его токсического действия.

Материалы и методы исследования. Для оценки токсических свойств ДХГФ был проведен эксперимент с однократным и многократным экспонированием крыс-самцов ДХГФ. Однократное экспонирование ДХГФ было проведено в течение 4-х часов при концентрации 600 мг/м³. При многократном ингаляционном эксперименте крысы подвергались воздействию ДХГФ в течение 30 суток по 4 часа в день, кроме выходных дней, в концентрациях: 84.4 ± 6.52 мг/м³ (1 группа подопыт-

ных крыс), 18.8 ± 0.6 мг/м³ (2 группа крыс) и 4.7 ± 0.2 мг/м³ (3 группа крыс), 4 группа крыс служила контролем.

Эксперименты проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 180-230 г. Условия содержания экспериментальных животных соответствовали «Правила лабораторной практики в Российской Федерации (GLP)» (утв. Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 1 апреля 2016 г. 199н). Для получения плазмы кровь, отобранную после декапитации крыс в пробирки с ЭДТА-К3, центрифугировали 15 мин при 4000 g.

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

Образцы плазмы крови каждой исследуемой группы крыс объединяли таким образом, чтобы полученный объем пулированного образца составлял 3 мл, и помещали в вials для парового анализа объемом 10 мл с завинчивающимися крышками и тефлоновыми прокладками. Перед отбором паровой фазы проводили термостатирование проб в течение 10 минут при температуре 40 °С. Затем в паровую фазу над пробой вводили микроволокно и проводили концентрирование летучих компонентов паровой фазы в течение 10 минут. По окончании периода сорбции волокно вводили в инжектор хроматографа и проводили термодесорбцию сконцентрированных соединений в хроматографическую колонку в течение 1 минуты. Температурный режим термостата колонки: 2 минуты при температуре 40°C, затем подъем до 200°C со скоростью 5 °С/мин до 280 °С. Ионизация электронами с энергией 70 эВ. Температура источника ионов: 280°C. Температура квадруполя: 150°C. Температура интерфейса: 280°C. Масс-селективное детектирование в режиме мониторинга избранных ионов (SIM): m/z 147, 197 для ДХГФ и 63, 78 – 2-хлорпропан, 151 и 178 метаболиты L-I и L-II.

Масс-спектр ионизации электронами ДХГФ: 69 (10), 81 (3), 85 (8) [CF₂Cl]⁺, 87 (3), 93 (37), 109 (8), 111 (3), 112 (9), 131 (16), 147 (85) [M-CF₂Cl]⁺, 149 (31), 162 (6), 163 (25), 165 (16), 167 (3), 197 (100) [M-Cl]⁺, 198 (5), 199 (37), 232 (7) [M]⁺, 234 (5) [M+2]⁺, 236 (0.7) [M+4]⁺

Определение нелетучих метаболитов ДХГФ

методом высокоэффективной жидкостной хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения, нецелевое метаболическое профилирование, и определение жирных кислот крови выполняли в соответствии с опубликованными ранее процедурами [10-12].

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с помощью прикладного пакета программ «STATISTICA» (версия 6.0, StatSoft Inc, 2001) и Microsoft Excel 2013 с дополнением Multibase 2015. В случае трех и более выборок различия по анализируемым показателям оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим попарным межгрупповым сравнением величин по критерию Фишера. Для всех видов анализа статистически значимыми по сравнению с контролем считали значения с $p < 0.05$.

Результаты и обсуждение.

Количественное определение ДХГФ в плазме крови и моче

Для количественного определения ДХГФ в крови и моче лабораторных животных была разработана хромато-масс-спектрометрическая методика. Определение проводили с помощью твердофазной микроэкстракции из паровой фазы над образцом и разделением компонентов на газовом хроматографе.

Твердофазная микроэкстракция из паровой фазы для извлечения ДХГФ позволяет использовать в качестве образцов кровь различного качества: цельную, плазму крови, сыворотку, размороженную и гемолизованную, что особенно актуально при определении причин отравления *postmortem*. Методика количественного анализа разработана при использовании плазмы крови и мочи в качестве матрицы.

Пределы обнаружения ДХГФ в плазме крови и моче составили 5 нг/мл (5 ppb). Количественное определение выполняли методом относительной градуировки с использованием 2-хлорпропана в качестве внутреннего стандарта. Такой предел обнаружения позволяет проводить определение ДХГФ при однократном воздействии 600 мг/м³, а также при многократных в диапазоне концентраций от 18.8 до 84.4 мг/м³.

Учитывая высокую летучесть и низкую температуру кипения (62 °С), наиболее очевидным способом подготовки проб для определения ДХГФ методом ГХ-МС, является твердофазная микроэкстракция из паровой фазы. В ходе разработки методики нами были установлены оптимальные условия экстракции и хроматографического анализа.

Твердофазная микроэкстракция из паровой фазы для извлечения ДХГФ позволяет использовать в качестве образцов кровь различного качества: цельную, плазму крови, сыворотку, разморожен-

ную и гемолизованную, что особенно актуально при определении причин отравления *post mortem*. Методика количественного анализа разработана при использовании плазмы крови и мочи в качестве матрицы. В качестве внутреннего стандарта был использован 2-хлорпропан. Выбор обусловлен его высокой летучестью и близкими параметрами хроматографического удерживания. Температура кипения составляет 35.7 °С.

Выбор оптимального типа микроволокна проводили с использованием растворов ДХГФ и 2-хлорпропана в концентрации 30 нг/мл каждый. Установлено, что наилучшее извлечение ДХГФ из паровой фазы достигается при использовании волокна с тройным покрытием из дивинилбензола, карбоксена и полидиметилсилоксана. Наибольшая степень извлечения достигается при температуре экстракции 35 °С и продолжительности экстракции 5 минут. 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 газовой хромато-масс-спектрометрии с твердофазной микроэкстракцией из равновесного пара. Достигнутые пределы обнаружения составили 5 нг/мл в крови и моче. Такой предел обнаружения позволяет проводить мониторинг ингаляционного воздействия ДХГФ на уровне 18.8 мг/м³.

Идентификация метаболитов ДХГФ в плазме крови и моче

В ходе выполнения работы нами были исследованы известные пути метаболизма фторхлоралкенов. К основным процессам их превращений в организме относятся: т.н. «восстановительный путь», гидролиз и образование конъюгатов с глутатионом [13]. Известный окислительный путь метаболизма в случае ДХГФ невозможен вследствие отсутствия связей С-Н в молекуле. Восстановительный путь детоксикации и биоактивации начинается с замещения одного или двух галогенов атомами водорода в цитохромах [14]. Образующиеся галогеналкены могут в дальнейшем активироваться за счет образования аддуктов с глутатионом в печени (рис. 6) [15]. Глутатионовые аддукты через несколько последовательных реакций образуют цистеиновые и ацетилцистеиновые аддукты в почках [16]. Многочисленные исследования указывают на то, что нефротоксичность и нефроканцерогенность галогеналкенов вызвана в основном за счет образования крайне реакционноспособных интермедиатов – тиокетенов, при воздействии β-лиаз на цистеиновые аддукты [17]. Тиокетены – крайне электрофильные соединения, они легко вступают в реакции нуклеофильного присоеди-

нения. В частности, способны образовывать ковалентные аддукты с протеинами и азотистыми основаниями ДНК, чем и обусловлена их мутагенность и канцерогенность [17].

Образование лабильных тиолов, предшественников тиокетенов, было доказано при введении в реакцию *in vitro* специальных ловушек-нуклеофилов [18].

Образование тиокетенов возможно при наличии галогена в α -положении к тиольной группе, структура же ДХГФ не обладает такой особенностью, поэтому образование тиокетенов из цистеиновых аддуктов ДХГФ без расщепления достаточно прочной связи С-С невозможно (рис. 2). Однако образование предшественников тиокетенов было нами показано, так нам удалось выявить стабильный тиокетон XIII в моче и плазме крови.

Идентификацию метаболитов проводили тремя различными способами: ГХ-МС паровой фазы, ГХ-МС экстрактов и ВЭЖХ-МС высокого разрешения. В паровой фазе обнаружено два метаболита (рис. 3).

Масс-спектры метаболитов с использованием доступных баз данных идентифицировать не удалось. Предположительные структуры приписаны на основании известных закономерностей фрагментации и интерпретации масс-спектров электронного удара. Метаболит с массой 198 а.е.м., изображенный на рисунке 3 справа (L-II), является продуктом восстановительного замещения атома хлора в CF_2Cl группе. Путь образования метаболита слева (L-I) предположить не удалось, однако, судя по структуре, он является продуктом восстановительного присоединения двух атомов фтора.

В таблице приведены приблизительные концентрации метаболитов L-I и L-II в образцах крови

и мочи крыс после экспонирования концентрацией 600 мг/м^3 . Приблизительные концентрации метаболитов определены методом абсолютной градуировки с использованием ДХГФ в качестве внешнего стандарта.

В ходе эксперимента были отобраны образцы крови сразу после окончания экспонирования (0 ч) и через 24 часа, мочу собирали в течение 24 часов после экспонирования. Стоит отметить, что потери летучих соединений из мочи предотвращены не были, так как мочу собирали в открытые емкости.

Оценка возможных путей метаболизма ДХГФ на основании известных закономерностей позволила нам предсказать структуры возможных метаболитов. Нами были выявлены продукты гидролиза ДХГФ: V и XIV (рис. 4).

Образование аддуктов ДХГФ с глутатионом может проходить по различным путям. Нами выявлено четыре различных направления (рис. 5): восстановительное присоединение глутатиона ($\text{GS-C}_4\text{HF}_6\text{Cl}_2$), винильное или аллильное замещение фтора ($\text{GS-C}_4\text{F}_5\text{Cl}_2$, два возможных изомера), нуклеофильное замещение фтора или хлора в восстановленной форме ДХГФ ($\text{GS-C}_4\text{H}_2\text{F}_5\text{Cl}_2$ или $\text{GS-C}_4\text{H}_2\text{F}_6\text{Cl}$, соответственно).

Интересно отметить, что в ДХГФ не происходит очевидного замещения атома хлора под действием GS- в группе CF_2Cl , то есть в невосстановленной форме не происходит аллильное замещение хлора. Необычным является тот факт, что продукт аллильного замещения фтора выявлен в моче крыс (X). Хотя хлор должен легче вступать в реакции аллильного нуклеофильного замещения, некоторые исследования [19,20] показывают, что фтор также является подходящей уходящей группой в реакциях замещения глутатионом под дей-

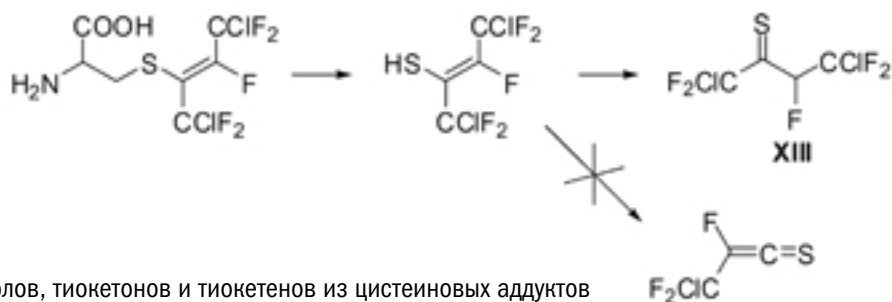


Рис. 2. Схема образования тиолов, тиокетенов и тиокетенов из цистеиновых аддуктов

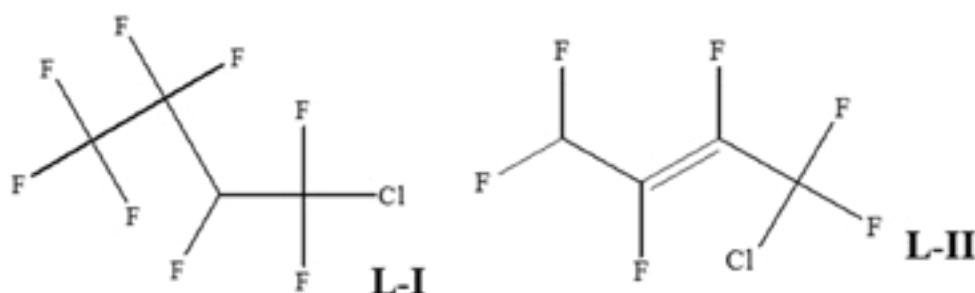


Рис. 3. Предполагаемые структурные формулы метаболитов ДХГФ обнаруженных в паровой фазе

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

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

ствием глутатион-S-трансферазы.

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

Ферментативный гидролиз аддуктов ДХГФ с глутатионом, а также некоторые их дальнейшие превращения показаны на рисунке 6.

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

более показательных метаболитов, в плазме падает в 20 раз за 24 часа.

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

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

Для выявления наиболее чувствительных биомаркеров экспозиции ДХГФ было проведено исследование образцов плазмы крови крыс, экспонированных концентрациями ДХГФ на уровне от 4.7 до 84.4 мг/м³. В результате, показано, что неметаболизированная форма ДХГФ была обнаружена в плазме крови всех групп животных. Концентрации не превышают следового уровня, однако носят дозозависимый характер. Метаболит L-I был обнаружен только в группе подвергавшейся экспонированию высокой концентрацией ДХГФ.

Образцы плазмы крови крыс были исследованы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией вы-

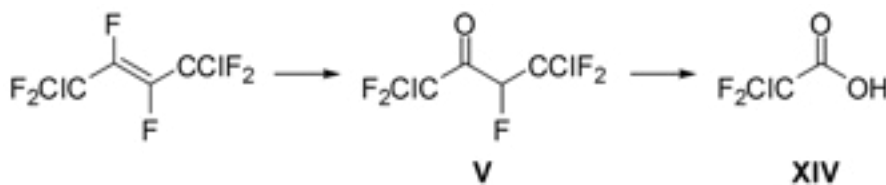


Рис. 4. Схема образования кетона и кислоты при гидролизе ДХГФ

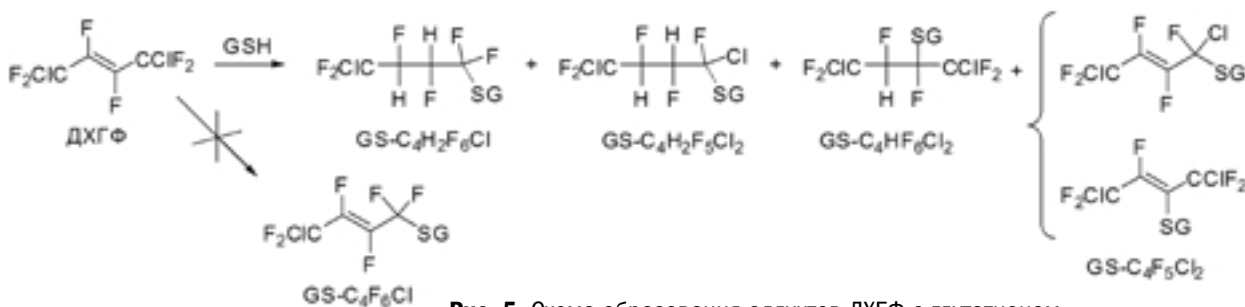


Рис. 5. Схема образования аддуктов ДХГФ с глутатионом

сокого разрешения. Поиск и идентификация метаболитов были выполнены на основании данных, полученных в ходе исследования образцов после острой интоксикации.

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

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

Рассмотрим далее возможность обоснования целевого списка биомаркеров экспозиции экстраполированного для биомониторинга воздействия ДХГФ на человека. Все обнаруженные метаболиты ДХГФ в крови являются продуктами образования и последующей деградации аддуктов ДХГФ с глутатионом. Реакция присоединения или замещения глутатиона к ДХГФ катализируется глутатион S-трансферазами (GST, КФ 2.5.1.18), которые представляют собой целое семейство ферментов играющих ключевую роль в обезвреживании ксенобиотиков. Образование аддуктов происходит в основном внутри клеток печени и почек [21], так как концентрация глутатиона в плазме крови составляет всего 2-20 мкМ в то время как, концентрация внутриклеточного глутатиона составляет 3-4 мМ [22], причем 85-90 % сосредоточено в цитозоле, а оставшиеся 10-15 % в митохондриях и пероксисомах. После образования, аддукты выводятся из клеток с использованием активного транспорта [23] и затем, под влиянием гамма-глутамилтрансферазы (КФ 2.3.2.2), от аддуктов отщепляется остаток глутаминовой

кислоты. Продуктами первой стадии гидролиза являются цистеилглициновые аддукты. Дальнейший гидролиз аддуктов катализируется дипептидазой (КФ 3.4.13.19), что приводит к цистеиновым аддуктам, которые в дальнейшем могут либо ацилироваться под действием специфичных к цистеиновым аддуктам ацетилтрансфераз (КФ 2.3.1.80), либо расщепляться по связи С-S в цистеине под действием β-лиаз (КФ 4.4.1.13) в почках с образованием тиолов или других реакционноспособных соединений [24]. Именно ацетилцистеиновые аддукты зачастую используют в качестве маркеров образования исходных аддуктов ксенобиотиков с глутатионом [22].

Межвидовые различия в активностях GST или ферментов, которые катализируют гидролиз аддуктов с глутатионом могут определять видовую чувствительность к токсическому действию ксенобиотиков. Оценка таких различий необходима для повышения точности экстраполяции при гигиеническом регламентировании, а также для создания физиологически обоснованных фармако- и токсикокинетических моделей. Сравнение активности GST между человеком и крысами проводилось неоднократно, однако есть основания полагать, что межвидовая чувствительность может отличаться по отношению к различным химическим веществам. Например, в работе [25] проведено межвидовое сравнение активности GST по отношению к йодистому метилу: активность GST по образованию аддуктов с СН₃I в печени крыс и человека оказалась сравнимой (40 и 47 нмоль/мин/мг гомогената), а у кроликов значительно меньше (10 нмоль/мин/мг гомогената). В почках разница в активности GST была приблизительно схожей: 15.0, 11.8 и 4.38 нмоль/мин/мг гомогената у крысы, человека и кролика, соответственно [22].

Наиболее близким по структуре к ДХГФ соединением для которого удалось обнаружить результаты межвидового сравнения активности GST это гексахлоробутадиен-1,3. Этот полихлорированный углеводород так же содержит в своей структуре четыре атома углерода, связи С=C и Сsp²-Cl, по-

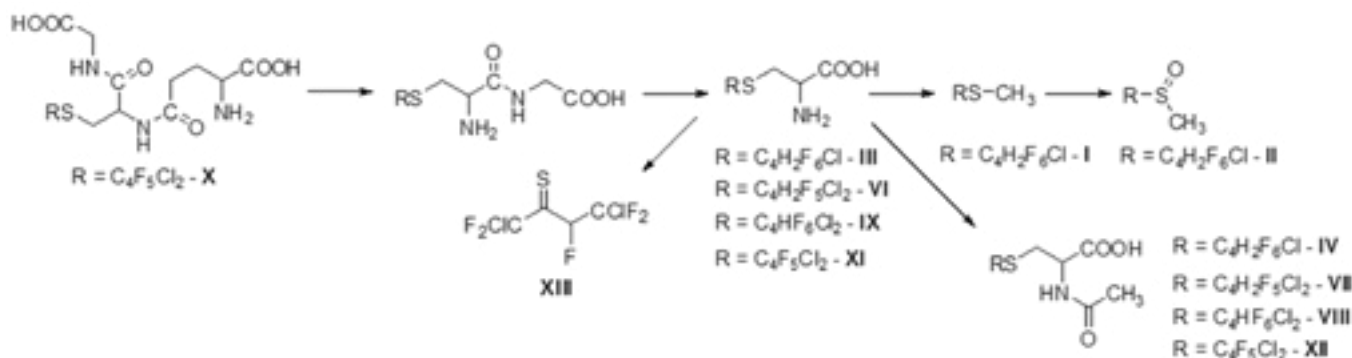


Рис. 6. Схема деградации различных аддуктов ДХГФ с глутатионом. Показаны различные обнаруженные метаболиты

этому можно сделать предположение о близкой субстратной специфичности рассматриваемых ферментов.

В отличие от CH_3I , конъюгация гексахлорбутадиена-1,3 с глутатионом в микросомальной фракции печени крыс была в 5 раз более интенсивной чем у человека [24]. При этом константа связывания была в 1.3 раза выше у крысы. Метаболизм цистеинового аддукта почечными β -лиазами был приблизительно в 23 раза менее интенсивным у человека, чем у крысы. Аналогичным образом отличались активности ацилазы в почках: 7.36 нмоль/мин/мг гомогената у крыс, против 0.1 нмоль/мин/мг гомогената у человека. В то же время, активность ацетилтрансфераз в почках крыс и человека отличалась значительно меньше и составила 144.9 и 40.8 нмоль/мин/мг гомогената, соответственно.

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

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

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

Так как активность почечных β -лиаз была приблизительно в 23 раза меньше у человека [24], то можно не рассматривать продукты расщепления цистеиновых аддуктов по связи C-S в качестве целевых биомаркеров экспозиции при биомониторинге воздействия ДХГФ на человека. К данному классу соединений относятся, обнаруженные в крови крыс – 4-метилсульфил-1-хлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутен-2, 4-метилсульфинил-1-хлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутен-2 и 1,1,3,4,4-пентафтор-1,4-дихлорбутантион-2, который оказался наиболее чувствительным биомаркером экспозиции ДХГФ у крыс.

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

Нецелелевое метаболическое профилирование

Для выявления метаболических маркеров ингаляционного воздействия ДХГФ на организм нами было проведено нецелелевое метаболическое про-

филирование образцов плазмы крови, подвергавшихся острому и подострому воздействию ДХГФ.

Для выявления биомаркеров эффекта ДХГФ при ингаляционном воздействии на организм, нами было проведено нецелелевое метаболическое профилирование образцов плазмы крови, подвергавшихся острому и подострому воздействию ДХГФ.

Для выявления возможных биомаркеров эффекта низких концентраций ДХГФ нами был оценена статистическая значимость отношений концентраций различных соединений, в частности показано, что отношение концентраций инозитолфосфат/инозитол дозозависимо изменяется. Однако значительное стандартное отклонение не позволяет говорить о достаточной статистической значимости ни в одной группе.

Отношение концентраций гулоновой кислоты и инозитолфосфата (рис. 7) оказывается достаточно чувствительным биомаркером эффекта концентрации ДХГФ 18.8 мг/м³, а также, в первые часы после воздействия концентрации 600 мг/м³. Однако после 24 часов или при меньших концентрациях и многократном экспонировании, выявленный маркер не носит статистически значимого характера ($p = 0.18$).

Сочетание определения биомаркеров экспозиции – ДХГФ и 1,4-дихлор-1,1,3,4,4-бутантиона-2 в крови с определением биомаркеров эффекта – отношением концентраций гулоновой кислоты и инозитолфосфата позволит более точно оценивать полученную дозу или уровень воздействия ДХГФ на организм людей, контактирующих с ним.

Заключение. Использование нецелевых методов метаболического профилирования позволило получить новые знания о метаболизме и механизмах действия не изученных ранее химических соединений. К таким соединениям относятся хладон RL 316 (1,4-дихлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутена-2, ДХГФ) и гидроксилламин. При экспериментальном моделировании интоксикации ДХГФ в образцах крови и мочи крыс обнаружены и идентифицированы два летучих метаболита, продукта восстановительного замещения атомов хлора: 1-хлор-1,1,2,3,3,4,4,4-октафторбутан и 1-хлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутен-2. Всего в результате исследований выявлено и идентифицировано 15 различных ранее неизвестных метаболитов. Установлено, что основным путем превращений ДХГФ в организме является образование аддуктов с глутатионом и их дальнейшая деградация до цистеиновых и ацетилцистеиновых аддуктов. Также, среди продуктов распада аддуктов выявлены 4-метилсульфил-1-хлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутен-2, 4-метилсульфинил-1-хлор-1,1,2,3,4,4-гексафтор-бутен-2 и – 1,1,3,4,4-пентафтор-1,4-дихлорбутантион-2, который оказался наиболее чувствительным маркером у крыс. Показано, что

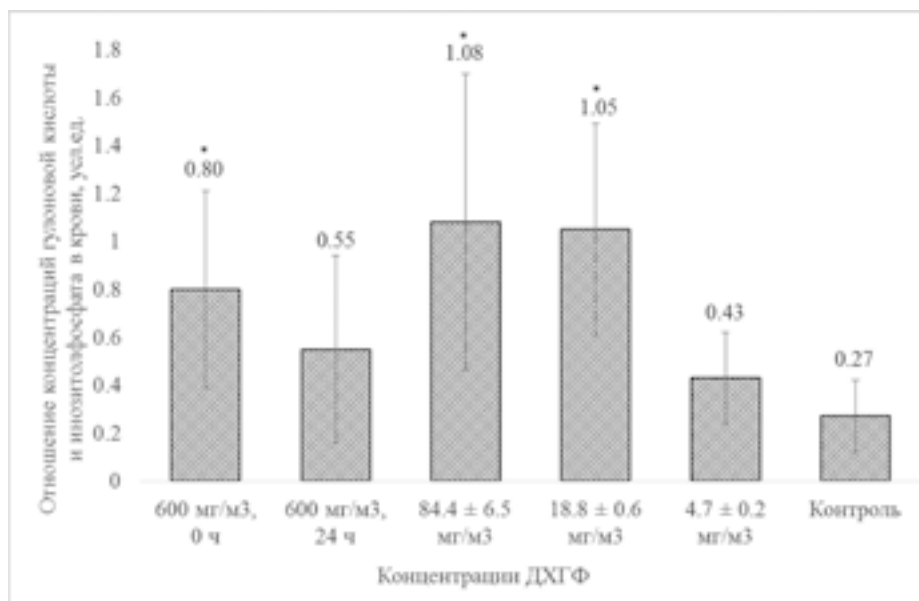


Рис. 7. Отношение концентраций гулоновой кислоты и инозитолфосфата в крови крыс, экспонированных различными концентрациями ДХГФ

при поступлении ДХГФ в организм не происходит его биоактивация с образованием лабильных тикетенов, которые являются основной причиной мутагенного и канцерогенного действия некоторых галогенуглеводородов.

Для обоснования экстраполированного списка биомаркеров экспозиции для биомониторинга воздействия ДХГФ на человека были использованы результаты сравнения активностей глутатион S-трансфераз, β-лиаз, дипептидаз и ацетилтрансфераз печени и почек крысы и человека по отношению к гексахлорбутадиену-1,3, который обладает достаточно близкой структурой к ДХГФ. Конъюгация гексахлорбутадиена-1,3 с глутатионом в микросомальной фракции печени крыс была в 5 раз более интенсивной чем у человека, в то время как метаболизм цистеинового аддукта почечными β-лиазами был приблизительно в 23 раза менее интенсивным у человека, чем у крысы. Активность ацетилтрансфераз в почках крыс и человека отличалась значительно меньше: в 3.5 раза больше у крыс. Таким образом, при биомониторинге воздействия ДХГФ на человека стоит в первую очередь в качестве целевых биомаркеров экспозиции рассматривать следующие соединения.

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

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

Так как активность почечных β-лиаз была приблизительно в 23 раза меньше у человека, то можно не рассматривать продукты расщепления цистеиновых аддуктов по связи C-S в качестве целевых биомаркеров экспозиции при биомониторинге воздействия ДХГФ на человека: 4-метилсульфил-1-хлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутен-2, 4-метилсульфинил-1-хлор-1,1,2,3,4,4-гексафторбутен-2 и 1,1,3,4,4-пентафтор-1,4-дихлорбутантион-2.

Благодарности
Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории аналитической токсикологии ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России: к.х.н. Л.К. Густылевой, к.х.н. Т.И. Алюшиной и к.б.н. Г.В. Каракашеву.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Материалы по экспериментальному обоснованию ориентировочного безопасного уровня воздействия (ОБУВ) 1,4-дихлоргексафторбутена-2 (хладона RL316) в воздухе рабочей зоны // Отчет о НИР / ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России, рук. д.м.н., проф. Радилов А.С. Санкт-Петербург, 2015 г.
2. *Trahaud R., Boudene C., Jouany J.M., Bouant A.* Experimental study of the toxicity of a fluoroalkene derivative, the hexafluorodichlorobutene (HFCB). *Fluoride*. 1972; 5: 1: 4-14.
3. *Corrigan D.S., McHattie G.V., Reventos J.* Halothane and Dichlorohexafluorobutene. *Brit. J. Anaesthesia*. 1963; 35: 824-825.
4. *Грушко Я.М.* Вредные органические соединения в промышленных выбросах в атмосферу. Л.: Химия. – 1986. – 143 с.
5. *Муравьева С.И., Казнина Н.И., Прохорова Е.К.* Справочник по контролю вредных веществ в воздухе. М.: Химия. 1988.-143 с.
6. *Филов В.А.* Вредные химические вещества. Углеводороды, галогенпроизводные углеводородов: справ Л.: «Химия». 1990.-732 с.
7. *Лазарев Н.В.* Вредные химические вещества. Органические вещества: справ. / Лазарев Н.В. Л.: «Химия». – 1976. – Т. 1. – С. 300.
8. *Hayden P.J., Hayden P.J., Stevens J.L.* Cysteine conjugate toxicity, metabolism, and binding to macromolecules in isolated rat kidney mitochondria. *Mol. Pharm.* 1990; 37: 468-476.
9. *Уколов А.И., Орлова Т.И., Мигаловская Е.Д., Войтенко Н.Г., Гончаров Н.В.* Мета-

боломина: на пути интеграции биохимии, аналитической химии, информатики. Успехи современной биологии. 2015; 135; 1: 3-17.

10. Уколов А.И., Кессених Е.Д., Радиллов А.С., Гончаров Н.В. Токсикометаболизма: поиск маркеров хронического воздействия низких концентраций алифатических углеводородов. Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2017; 53; 1: 24-32.

11. Орлова Т.И., Уколов А.И., Савельева Е.И., Радиллов А.С. Определение свободных и этерифицированных жирных кислот в плазме крови методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием. Аналитика и контроль. 2015; 19; 2: 183-188.

12. Уколов А.И., Орлова Т.И., Савельева Е.И., Радиллов А.С. Хромато-масс-спектрометрическое определение свободных жирных кислот в плазме крови и моче с использованием

экстрактивного алкилирования. Журнал аналитической химии. 2015; 70; 9: С. 968.

13. Dekant W. Toxicology of Chlorofluorocarbon Replacements. Environ. Health Perspect. 1996; 104; 1: 75-83.

14. Anders M.W. Metabolism and Toxicity of Hydrochlorofluorocarbons: Current Knowledge and Needs for the Future. Environ. Health Perspect. 1991; 96: 185-191.

15. Dekant W., Vamvakas S., Berthold K., Schmidt S., Wild D., Henschler D. Bacterial-lyase mediated cleavage and mutagenicity of cysteine conjugates derived from the nephrocarcinogenic alkenes trichloroethylene, tetrachloroethylene and hexachlorobutadiene. Chem.-Biol. Interact. 1986; 60: 31-45.

16. Anders M.W., Lash L., Dekant W., Elfarra A.A., Dohn D.R. Biosynthesis and bioconversion of glutathione S-conjugates to

toxic metabolites. CRC Crit. Rev. Toxicol. 1988; 18: 311-341.

17. Dreehen B., Westphal G. Mutagenicity of the glutathione and cysteine S-conjugates of the haloalkenes 1,1,2-trichloro-3,3,3-trifluoro-1-propene and trichlorofluoroethene in the Ames test in comparison with the tetrachloroethene-analogues. Mut. Res. 2003; 539: 157-166.

18. Lock E.A., Berndt W.O. Studies on the Mechanism of Nephrotoxicity and Nephrocarcinogenicity of Halogenated Alkenes. CRC Crit. Rev. Toxicol. 1988; 19: 1: 23-42.

19. MacNichol D.D., Robertson D.D. New and unexpected reactivity of saturated fluorocarbons. Nature. 1988; 332: 59-61.

20. Wkelman C., Kazis C. Recent advances in the chemistry of halogenofluorocarbons. J. FluorineChem. 1986; 33: 347-359.

21. Blair I.A. Analysis of endogenous glutathione-adducts and their metabolites. Biomed. Chromatogr. 2010; 24; 1: P. 29-38.

22. Blair I.A. Endogenous glutathione adducts. Curr. Drug Metab. 2006; 7; 8: 853-872.

23. Awasthi Y.C., Sharma R., Yadav S., Dwivedi S., Sharma A., Awasthi S. The non-ABC drug transporter RLP76 (RALBP-1) plays a major role in the mechanisms of drug resistance. Curr. Drug Metab. 2007; 8; 4: 315-323.

24. Green T., Lee R., Farrar D., Hill J. Assessing the health risks following environmental exposure to hexachlorobutadiene. Toxicol. Lett. 2003; 138; 1-2: 63-73.

25. Poet T.S., Wu H., Corley R.A., Thrall K.D. In vitro glutathione conjugation of methyl iodide in rat, rabbit, and human blood and tissues. Inhal. Toxicol. - 2009. - V. 21. - N. 6. - P. 524-530.

REFERENCES:

1. Materials on the experimental substantiation of the approximate safe exposure level of 1,4-dichlorohexafluorobutene-2 (RL316) in the air of the working area. FSUE RIHOPHE FMBA of Russia, prof. Radilov A.S. Saint-Petersburg, 2015 (in Russian).

2. Truhaut R., Boudene C., Jouany J.M., Bouant A. Experimental study of the toxicity of a fluoroalkene derivative, the hexafluorodichlorobutene (HFDB). Fluoride. 1972; 5; 1: 4-14.

3. Corrigan D.S., McHattie G.V., Reventos J. Halothane and Dichlorohexafluorobutene. Brit. J. Anaesthesia. 1963; 35: 824-825.

4. Grushko Ya.M. Harmful organic compounds in industrial emissions. Leningrad: Khimiya. 1986. - 143 p. (in Russian).

5. Muravieva S.I., Kaznina N.I., Prokhorova E.K. Handbook for the control of harmful substances in the air. Moscow: Khimiya. 1988. - 143 p. (in Russian).

6. Filov V.A. Harmful chemicals. Hydrocarbons, halogen derivatives of hydrocarbons: a handbook. Leningrad: Khimiya. 1990. - 732 p. (in Russian).

7. Lazarev N.V. Harmful chemicals. Organic

compounds: Handbook. Leningrad: Khimiya. 1976; V.1. - 300 p. (in Russian).

8. Hayden P.J., Hayden P.J., Stevens J.L. Cysteine conjugate toxicity, metabolism, and binding to macromolecules in isolated rat kidney mitochondria. Mol. Pharm. 1990; 37: 468-476.

9. Ukolov A.I., Orlova T.I., Migalovskaya E.D., Voitenko N.G., Goncharov N.V. Metabolomics: On the Way to an Integration of Biochemistry, Analytical Chemistry, and Informatics. Biol. Bulletin Reviews. 2015; 135; 1: 3-17.

10. Ukolov A.I., Kessenikh, E.D., Radilov, A.S., Goncharov N.V. Toxicometabolomics: Identification of markers of chronic exposure to low doses of aliphatic hydrocarbons. J. Evol. Biochem. Phys. 2017; 53; 1: 24-32. (in Russian)

11. Orlova T.I., Ukolov A.I., Savelieva E.I., Radilov A.S. GC-MS quantification of free and esterified fatty acids in blood plasma. Analitika i kontrol. 2015; 19(2): 183 (in Russian).

12. Ukolov A.I., Orlova T.I., Savelieva E.I., Radilov A.S. Chromatographic-Mass Spectrometric Determination of Free Fatty Acids in Blood Plasma and Urine Using Extractive Alkylation. J. of Anal. Chemistry. 2015; 70(9): 968. (in Russian).

13. Dekant W. Toxicology of Chlorofluorocarbon

Replacements. Environ. Health Perspect. 1996; 104; 1: 75-83.

14. Anders M.W. Metabolism and Toxicity of Hydrochlorofluorocarbons: Current Knowledge and Needs for the Future. Environ. Health Perspect. 1991; 96: 185-191.

15. Dekant W., Vamvakas S., Berthold K., Schmidt S., Wild D., Henschler D. Bacterial-lyase mediated cleavage and mutagenicity of cysteine conjugates derived from the nephrocarcinogenic alkenes trichloroethylene, tetrachloroethylene and hexachlorobutadiene. Chem.-Biol. Interact. 1986; 60: 31-45.

16. Anders M.W., Lash L., Dekant W., Elfarra A.A., Dohn D.R. Biosynthesis and bioconversion of glutathione S-conjugates to toxic metabolites. CRC Crit. Rev. Toxicol. 1988; 18: 311-341.

17. Dreehen B., Westphal G. Mutagenicity of the glutathione and cysteine S-conjugates of the haloalkenes 1,1,2-trichloro-3,3,3-trifluoro-1-propene and trichlorofluoroethene in the Ames test in comparison with the tetrachloroethene-analogues. Mut. Res. 2003; 539: 157-166.

18. Lock E.A., Berndt W.O. Studies on the Mechanism of Nephrotoxicity and

Nephrocarcinogenicity of Halogenated Alkenes. CRC Crit. Rev. Toxicol. 1988; 19: 1: 23-42.

19. MacNichol D.D., Robertson D.D. New and unexpected reactivity of saturated fluorocarbons. Nature. 1988; 332: 59-61.

20. Wkelman C., Kazis C. Recent advances in the chemistry of halogenofluorocarbons. J. FluorineChem. 1986; 33: 347-359.

21. Blair I.A. Analysis of endogenous glutathione-adducts and their metabolites. Biomed. Chromatogr. 2010; 24; 1: P. 29-38.

22. Blair I.A. Endogenous glutathione adducts. Curr. Drug Metab. 2006; 7; 8: 853-872.

23. Awasthi Y.C., Sharma R., Yadav S., Dwivedi S., Sharma A., Awasthi S. The non-ABC drug transporter RLP76 (RALBP-1) plays a major role in the mechanisms of drug resistance. Curr. Drug Metab. 2007; 8; 4: 315-323.

24. Green T., Lee R., Farrar D., Hill J. Assessing the health risks following environmental exposure to hexachlorobutadiene. Toxicol. Lett. 2003; 138; 1-2: 63-73.

25. Poet T.S., Wu H., Corley R.A., Thrall K.D. In vitro glutathione conjugation of methyl iodide in rat, rabbit, and human blood and tissues. Inhal. Toxicol. - 2009. - V. 21. - N. 6. - P. 524-530.

A.I. Ukolov, M.D. Shachneva, A.S. Radilov

IDENTIFICATION OF BIOMARKERS OF EXPOSURE AND EFFECT OF 1,4-DICHLOROHEXAFLUOROBUTENE-2

Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Federal Medical and Biological Agency, 188663, Leningrad region, Kuzmolovsky, Russian Federation

Using gas and high-performance liquid chromatography with mass-selective detection (GC/MS and HPLC/MS, respectively), the metabolism of previously unstudied freon RL316 (1,4-dichloro-1,1,2,3,4,4-hexafluorobutene-2, hereinafter – DCHF) has been investigated. Two volatile metabolites, which are products of reductive replacement of chlorine atoms: 1-chloro-1,1,2,3,3,4,4,4-octafluorobutane and 1-chloro-1,1,2,3,4,4-hexafluorobutene-2, have been detected and identified in the blood and urine samples of rats. In total 15 different previously unknown metabolites have been revealed and identified. The main direction of metabolism of DCHF is the formation of adducts with glutathione and their further degradation to cysteine and acetylcysteine adducts. Among all metabolites 4-methylsulfyl-1-chloro-1,1,2,3,4,4-hexafluorobutene-2, 4-methylsulfynyl-1-chloro-1,1,2,3,4,4-hexafluorobutene-2 and 1,1,3,4,4-pentafluoro-1,4-dichlorobutanethion-2 were found to be the most sensitive biomarkers. The intake of DCHF in the body does not lead to its bioactivation with the formation of labile thioketenes which are the main cause of mutagenic and carcinogenic effects of some halocarbons.

Metabolic profiling of blood plasma revealed potential metabolic markers of exposure to DCHF at a concentration of 18,8 mg/m³: the ratio of concentrations of gulonic acid and myo-inositol phosphate. The combination of the determination of the chemical markers – nonmetabolic forms of DCHF and 1,4-dichloro-1,1,3,4,4-butanethion-2 with the definition of discovered metabolic markers allows to estimate more accurately the dose or level of exposure of DCHF on the body of people in contact with it.

Keywords: 1,4-dichloro-1,1,2,3,4,4-hexafluorobutene-2, freon RL316, blood, urine, chromatography/mass spectrometry.

Материал поступил в редакцию 02.04.2019 г.