



Чемезов А.И., Сутункова М.П., Рябова Ю.В.

## Изучение изменений метаболомного профиля крови крыс, вызванных воздействием свинца

ФБУН «Екатеринбургский медицинский – научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий»  
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 620014, Екатеринбург, Россия

**Введение.** Распространённость свинца в окружающей среде, обусловленная производственно-хозяйственной деятельностью человека, а также токсичность соединений элемента обосновывают актуальность исследования изменений, вызванных действием данного металла.

**Материалы и методы.** Проведён нецелевой метаболомный скрининг крови крыс, подвергнутых внутрибрюшному введению ацетата свинца, методом ВЭЖХ-масс-спектрометрии. Экспрессию выявленных масс сравнивали с аналогичными для контрольной группы животных. Массы, статистически значимо изменившие интенсивность в сравнении с контролем, подвергали фрагментации с целью получения характеристических осколков. Аннотацию метаболитов проводили посредством поиска по MS/MS базам данных, а также сравнением с *in silico* спектрами фрагментации. Вовлечённость в метаболические процессы аннотированных метаболитов устанавливали посредством анализа литературных источников.

**Результаты.** Нецелевой метаболомный скрининг выявил 37 значений *m/z* экспонированной группы, статистически значимо изменяющих интенсивность в сравнении с контролем. Аннотация с использованием спектров фрагментации, а также *in silico* фрагментации позволила установить структуру 8 метаболитов, в числе которых эпоксипроизводное линолевой кислоты, 15-гидроксиэйкозатетраеновая кислота, 4 оксо- и гидроксиацилкарнитиновых производных длинноцепочечных жирных кислот, один представитель ацилкарнитинов среднецепочечных жирных кислот и лизофосфатидилсеринового производное.

**Заключение.** При анализе литературы были соотнесены функции выявленных метаболитов, а также произведено отнесение к известным метаболическим процессам. Так, и оксо- и гидроксиацилкарнитины представляют собой производные промежуточных продуктов  $\beta$ -окисления жирных кислот – их повышенная концентрация в сравнении с контролем свидетельствует о нарушении этого процесса под влиянием окислительного стресса, вызванного свинцом. Эпокси- и 15-гидроксипроизводные жирных кислот выступают в роли регуляторных метаболитов, с одной стороны, и с другой – являются маркерами гипоксии, вызванной свинцом. Повышение концентрации лизофосфатидилсеринового производного свидетельствует об интенсификации апоптических процессов в организме животных экспонированной группы в сравнении с контрольной.

**Ключевые слова:** метаболомика; УВЭЖХ-МС/МС; свинец; кровь; крысы; ацилкарнитины; эйкозаноиды; лизофосфатидилсерины

**Для цитирования:** Чемезов А.И., Сутункова М.П., Рябова Ю.В. Изучение изменений метаболомного профиля крови крыс, вызванных воздействием свинца. *Гигиена и санитария*. 2021; 100(12): 1455–1461. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-12-1455-1461>

**Для корреспонденции:** Чемезов Алексей Игоревич, мл. науч. сотр. отд. молекулярной биологии и электронной микроскопии ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП, 620014, Екатеринбург. E-mail: chemezov@ymrc.ru

**Участие авторов:** Чемезов А.И. – концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, статистическая обработка, написание текста; Сутункова М.П. – концепция и дизайн исследования, редактирование, утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи; Рябова Ю.В. – сбор и обработка материала, статистическая обработка. Все соавторы – утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Заключение биоэтического комитета:** исследование было проведено в соответствии с положениями Хельсинкской декларации и одобрено Локальным этическим комитетом Федерального бюджетного учреждения науки «Екатеринбургский медицинский – научный центр биопрофилактики и охраны здоровья рабочих промышленных предприятий» Роспотребнадзора (Протокол № 8 от 8.11.2018 г.).

Поступила: 08.11.2021 / Принята к печати: 25.11.2021 / Опубликовано: 30.12.2021

Aleksey I. Chemezov, Marina P. Sutunkova, Julija V. Ryabova

## Investigation of changes in rat's blood metabolomic profile, caused by lead exposure

Yekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers, 620014, Ekaterinburg, Russia

**Introduction.** The prevalence of lead in the environment, due to human production and economic activities, and the xenobiotic nature of the element substantiate the relevance of studying the changes caused by the action of this metal.

**Materials and methods.** A non-target metabolomic screening of the blood of rats exposed to intraperitoneal administration of lead acetate by HPLC-mass spectrometry was carried out. The expression of the selected masses was compared with those for the control group of animals. The masses that significantly changed the intensity compared to the control were subjected to fragmentation to obtain characteristic fragments. The annotation of metabolites was performed by searching in MS/MS databases and by comparison with *in silico* fragmentation spectra. The involvement of annotated metabolites in metabolic processes was established by literature analyzing.

**Results.** Non-target metabolomic screening revealed 37 *m/z* values for the exposed group, significantly changing the intensity compared to the control. Annotation using fragmentation spectra and *in silico* fragmentation allows establishing the structure of eight metabolites, including an epoxy derivative of linolic acid, 15-hydroxyeicosatetraenoic acid, four oxo- and hydroxyacylcarnitine derivatives of long-chain fatty acids, one acylcarnitine derivatives of medium-chain fatty acids and one lysophosphoserine.

**Conclusion.** Analyzing the literature, the known functions of the identified metabolites were established and attributed to the known metabolic processes. So, oxo- and hydroxyacylcarnitines are derivatives for intermediate products of  $\beta$ -oxidation fatty acids – it is increased concentration compared to the control indicates a violation of this process under the influence of oxidative stress caused by lead. Epoxy and 15-hydroxy derivatives of fatty acids (increased content relative to the control group) act as regulatory metabolites (vasodynamic activity), on the one hand, and markers of lead-induced hypoxia on the

other hand. The increase of the concentration for the lysophosphatidylserine derivative indicates the intensification of apoptotic processes in the organism of the exposed group in contrast to the control.

**Keywords:** metabolomics; UHPLC-MS/MS; lead; Pb; blood; rat; acylcarnitine; eicosanoids; lysophosphoserine

**For citation:** Chemezov A.I., Sutunkova M.P., Ryabova Ju.V. Investigation of changes in rat's blood metabolomic profile, caused by lead exposure. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2021; 100(12): 1455-1461. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-12-1455-1461> (In Russ.)

**For correspondence:** Aleksey I. Chemezov, MD, junior researcher of Molecular biology and electron microscopy department 6 Yekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers, Ekaterinburg, 620014, Russian Federation. E-mail: chemezov@ymrc.ru

**Information about authors:**

Chemezov A.I., <https://orcid.org/0000-0001-6167-7347> Sutunkova M.P., <https://orcid.org/0000-0002-1743-7642> Ryabova Ju.V., <https://orcid.org/0000-0003-2677-0479>

**Contribution:** Chemezov A.I. — concept and design of the study, collection and processing of material, statistical processing, writing text; Sutunkova M.P. — concept and design of the study, editing, approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article; Ryabova Ju.V. — collection and processing of material, statistical processing. All authors are responsible for the integrity of all parts of the manuscript and approval of the manuscript final version.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgement.** The study had no sponsorship.

**Conclusion of the Bioethical Committee:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Local Ethics Committee of the Yekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers (Protocol No eight dated 18.11.2018).

Received: November 8, 2021 / Accepted: November 25, 2021 / Published: December 30, 2021

## Введение

Известно, что регионы с развитой металлургической промышленностью испытывают повышенную токсическую нагрузку. Действию токсикантов подвержены как рабочие, задействованные на предприятиях, так и жители близлежащих населённых пунктов. Поэтому актуальной является задача изучения механизмов действия промышленных токсикантов с целью разработки методов диагностики и лечения заболеваний, вызванных действием вредных веществ.

Одним из самых распространённых загрязнителей окружающей среды является свинец. Этот металл обнаруживается повсеместно, источником его в окружающей среде выступают как природные месторождения, так и человеческая деятельность — выбросы металлургических предприятий, использование свинцовых аккумуляторных батарей, использование тетраэтилсвинца в качестве добавки к автомобильному топливу, имевшее место в прошлом веке [1–3]. Свинец — тяжёлый металл, не имеющий биологической роли в организме. В виде иона  $Pb^{2+}$  по своим размерно-зарядовым характеристикам схож и конкурирует с ионами кальция, цинка, железа и потому может вызывать нарушения в метаболических путях, связанных с этими элементами [4–8]. Кроме того, свинец обладает большим сродством к сере, что приводит к частичной или полной деактивации тиолсодержащих биоактивных молекул.

Цель работы — поиск и выявление низкомолекулярных веществ в крови, изменяющих своё содержание при субхронической экспозиции соли свинца (II) при внутрибрюшинном введении в организме беспородных крыс, а также литературный обзор их роли в метаболических процессах. В результате исследований были выявлены изменения в экспрессии длинноцепочечных и среднецепочечных ацилкарнитинов, докозагексаеноилглицерофосфосерина, а также производных полиненасыщенных жирных кислот, что свидетельствует о нарушениях в процессе окисления жиров, развитии воспалительной и аллергической реакции, снижении активности нейронов и их повреждении, гипертензии.

Негативные эффекты, проявляющиеся при действии свинца на живые организмы, описаны в литературе. Свинец вызывает анемию и порфирию из-за нарушения порфиринового обмена, приводит к изменениям межклеточных соединений в проксимальных канальцах почек и возникновению глюкозурии, гипофосфатемии и аминоацидурии [9, 10]. Нарушения со стороны нервной системы после хронического воздействия свинца проявляются в задержке роста у детей, снижении интеллекта, кратковременной памяти, потере слуха и повреждении головного мозга [11, 12]. В литературе известны примеры метаболомных исследований воздействия свинца. Исследования проб мочи жителей поселений, расположенных рядом с предприятием по переработке свинцово-кислотных батарей, выявили изменения, относящиеся

к метаболизму аминокислот, мочевины, порфиринов [9]. Исследования образцов крови группы со свинец-ассоциированными хроническими заболеваниями выявили изменения в метаболизме в большей степени аминокислот, в меньшей — ксенобиотиков, жиров, энергетических метаболитов и пептидов [13].

## Материалы и методы

**Реактивы.** Ацетат свинца квалификации ХЧ, дистиллированная вода, физиологический раствор, метанол для градиентной хроматографии, вода для градиентной хроматографии, ацетонитрил для градиентной хроматографии, муравьиная кислота для градиентной хроматографии.

**Животные, группы, затравка.** Эксперимент проводили на беспородных белых крысах-самцах собственного разведения. Возраст животных на начало исследования составлял 4–5 мес, масса тела — 210–290 г. Было сформировано две группы («Контроль» и «Свинец») по 11 животных, обе получали стандартный питательный рацион ПК-120. Обе группы 3 раза в неделю в течение 6 нед подвергались внутрибрюшинным введениям: контрольной группе вводили физраствор объёмом 2 мл, группе «Свинец» вводили раствор ацетата свинца (II) в дистиллированной воде с концентрацией из расчёта разовой дозы 11 мг/кг массы тела животного.

**Взятие крови.** По прошествии 6 недель животным вводили гепарин и отбирали кровь из сердца в вакуумные пробирки. Полученную кровь хранили до пробоподготовки при минус 50 °С.

**Гематологические показатели.** Гематологические показатели, в том числе уровень гемоглобина, определяли с помощью гематологического анализатора «Methic 18» с использованием соответствующих диагностических наборов.

**Регистрация артериального давления.** Измерение систолического и диастолического кровяного давления, среднего давления и ЧСС у животных выполняли с использованием компьютеризированной системы CODA-HT8 для неинвазивного определения артериального давления с программным обеспечением Kent scientific corporation.

**Пробоподготовка для ВЭЖХ-МС.** Для анализа были случайным образом выбраны по 4 образца крови из каждой группы. Пробоподготовку осуществляли в соответствии с методикой, представленной в [14]. Цельную кровь центрифугировали при 4000 об./мин при 4 °С в течение 10 мин. К 100 мкл полученной сыворотки добавляли 400 мкл метанола для осаждения фибрина, перемешивали 30 с, отделяли белок центрифугированием при 12 000 об./мин в течение 10 мин при 4 °С. Образовавшийся супернатант отбирали и давали отстояться в течение 1 ч в холодильнике при 4 °С. Финальное центрифугирование проводили при 14 000 об./мин в течение 15 мин, супернатант переносили в вials для масс-спектрометрического исследования.

## Аннотированные метаболиты

## List of annotated metabolites

| № | Аннотированное вещество<br>Annotated substance  |                                                | Брутто формула<br>Empirical formula               | m/z [M + H] <sup>+</sup> |
|---|-------------------------------------------------|------------------------------------------------|---------------------------------------------------|--------------------------|
| 1 | 10,13-эпокси-10,12-октадекадиеновая кислота     | 10,13-epoxy-10,12-octadecadienic acid          | C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>    | 295.2278                 |
| 2 | 3-оксооктадеканоилкарнитин                      | 3-Oxo-octadecanoylcarnitine                    | C <sub>25</sub> H <sub>47</sub> NO <sub>5</sub>   | 442.3540                 |
| 3 | 15-гидрокси-5,8,11,13-эйкозатетраеновая кислота | 15-Hydroxy-5,8,11,13-eicosatetraenoic acid     | C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>    | 321.2436                 |
| 4 | Лизо-1-докозагексаеноил-глицеро-3-фосфосерин    | Lyso-1-docosahexaenoyl-glycero-3-phosphoserine | C <sub>28</sub> H <sub>44</sub> NO <sub>9</sub> P | 570.2844                 |
| 5 | Гидроксилинолеоилкарнитин                       | Hydroxylinoleoilcarnitine                      | C <sub>25</sub> H <sub>45</sub> NO <sub>5</sub>   | 440.3389                 |
| 6 | 5/6-гидроксигексадеканоилкарнитин               | 5/6-Hydroxyhexadecanoylcarnitine               | C <sub>23</sub> H <sub>45</sub> NO <sub>5</sub>   | 416.3389                 |
| 7 | 3-оксогексадеканоилкарнитин                     | 3-Oxo-hexadecanoylcarnitine                    | C <sub>23</sub> H <sub>43</sub> NO <sub>5</sub>   | 414.3224                 |
| 8 | 4-деценоилкарнитин                              | 4-Decenoylcarnitine                            | C <sub>17</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>4</sub>   | 314.2334                 |

**ВЭЖХ-МС и обработка данных.** Масс-спектрометрические исследования проводили на квадруполь-времяпролётном масс-спектрометре Agilent 6545 AdvanceBio Q-TOF, совмещённом с системой ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity II.

**Хроматография.** Для предварительного разделения метаболитов в ВЭЖХ системе использовали хроматографическую колонку Zorbax Eclipse Plus C18 RRHD с размером частиц 1,8 мкм и внутренними размерами 2,1 × 50 мм. Градиентное элюирование проводили аналогично [14]: подвижная А – 0,1% раствор муравьиной кислоты в воде, фаза В – 0,1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле, температура колонки 40 °С, параметры элюирования: 0 мин – В 8%, 2 мин – В 20%, 8 мин – В 45%, 20 мин – В 85%, 24 мин – В 95%, 26 мин – В 8%, 28 мин – В 8%.

**Масс-спектрометрия.** Съёмку проб проводили в программном обеспечении (ПО) Agilent MassHunter Data Acquisition. Обработку ВЭЖХ-МС данных проводили в ПО Agilent Qualitative Workflows посредством поиска Molecular Features (MF). Найденные значения m/z MF для всех проб экспортировали в ПО Mass Profiler Professional, где проводили статистический отбор групповых отличий с критерием значимости  $p < 0,05$  и параметром FoldChange > 2. Для значений m/z отобранных MF далее проводили MS/MS эксперимент с целью получения фрагментных спектров групповых метаболитов. Идентификацию проводили в последовательности: определение ионного аддукта, расчёт брутто-формулы по изотопному распределению, поиск известных метаболитов для рассчитанных брутто-формул, установление структурной формулы посредством поиска характеристических фрагментов и серий фрагментации в МС/МС-спектрах. Генерацию возможных вариантов брутто-формулы производили посредством встроенного генератора в ПО Agilent MassHunter Qualitative Analysis Navigator. Определение класса метаболита проводили посредством синтеза двух подходов: поиск по экспериментальным МС/МС-спектрам и брутто-формуле в базах данных (HMDB, Metlin, MassBankEU, MoNA) и сравнение спектров, полученных *in silico*. Последний подход реализовали в двух направлениях – генерация спектров в соответ-

ствии с известными механизмами фрагментации в ПО MS-FINDER [15, 16], и последовательная фрагментация по химическим связям с оценкой термодинамической вероятности образования фрагмента в online-сервисе MetFrag [17]. Подтверждение принадлежности к конкретному классу веществ, а также структуру вещества производили по МС/МС-спектрам вручную.

## Результаты

## Список выявленных масс и аннотированных метаболитов.

Поиск статистически значимых отличий между группами выявил 37 масс, для 8 из которых удалось произвести аннотацию (см. таблицу).

## Уровень гемоглобина, содержание лейкоцитов.

Содержание гемоглобина в крови крыс группы «Контроль» составило 148,6 ± 2,44 г/л, группы «Свинец» – 107,2 ± 3,38 г/л. Содержание лейкоцитов в крови крыс группы «Контроль» составило 11,71 ± 1,12 × 10<sup>6</sup>/мл, группы «Свинец» – 21,53 ± 1,9 × 10<sup>6</sup>/мл.

## Артериальное давление.

Артериальное давление в контрольной группе животных (мм рт. ст.): систолическое – 140,79 ± 7,41, диастолическое – 96,34 ± 5,8. Артериальное давление в группе животных «Свинец» (мм рт. ст.): систолическое – 134,53 ± 7,01, диастолическое – 93,42 ± 6,9.

## Обсуждение

Масс-спектр EpODE (рис. 1) обнаруживает алкильную серию с общей формулой C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub>, что соответствует фрагментам алкильного радикала с максимальной длиной в 5 атомов углерода. С другой стороны, лёгкий отрыв воды предполагает присутствие в молекуле карбоксильной группы и образование ацильного катиона с брутто-формулой C<sub>18</sub>H<sub>29</sub>O<sub>2</sub>, указывающей на присутствие ещё одного кислорода помимо находящегося в кетогруппе. Поскольку потери воды далее от ацилий-катиона отсутствуют, возможно предположить, что данный кислород входит в состав либо кето-, либо эфирной группы. Далее ацилий катион 227.2128 обнаруживает серию осколочных фрагментов 55.0198–141.1281, указывающую на наличие

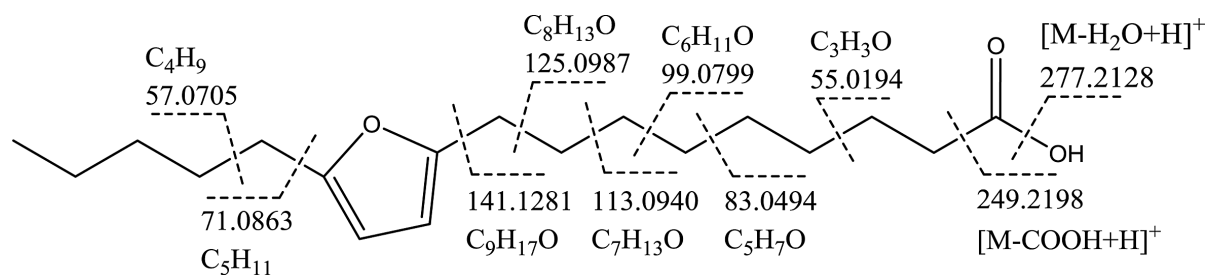
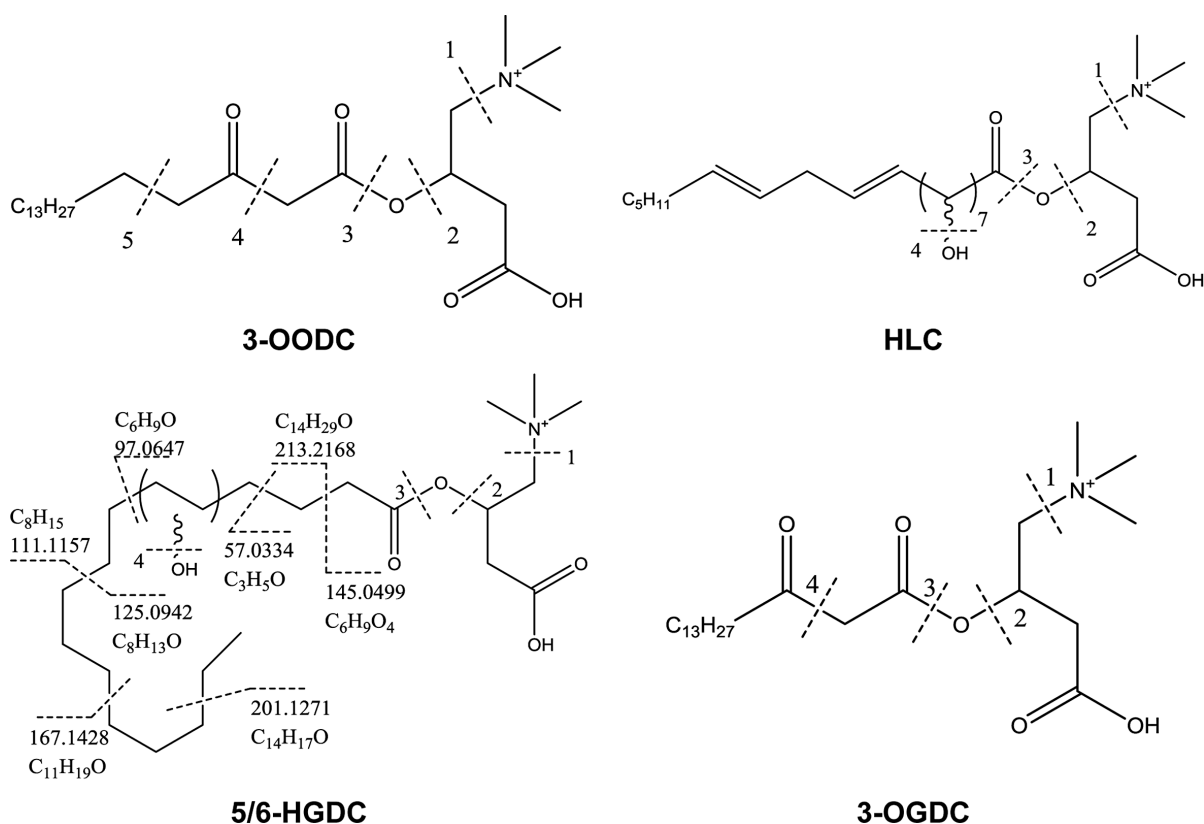


Рис. 1. Фрагментация EpODE (10,13-эпокси-10,12-октадекадиеновая кислота).

Fig. 1. Fragmentation of EpODE (10,13-epoxy-10,12-octadecadienic acid).



**Рис. 2.** Фрагментация 3-OODC (3-оксооктадеканойлкарнитин), HLC (гидроксилинолеойлкарнитин), 5/6-HGDC (5/6-гидроксигексадеканойлкарнитин), 3-OGDC (3-гидрохексадеканойлкарнитин).

**Fig. 2.** Fragmentation of 3-OODC (3-oxooctadecanoylcarnitine), HLC (hydroxylinoleoylcarnitine), 5/6-HGDC (5/6-hydroxyhexadecanoylcarnitine), 3-OGDC (3-Hydroxohexadecanoylcarnitine).

в молекуле незамещённой алкильной цепи длиной в 8 атомов. Оставшаяся часть молекулы имеет брутто-формулу  $C_4H_2O$ , что соответствует дизамещённому фурановому кольцу.

ЕрОДЕ — производное линолевой кислоты, относящейся к незаменимым (18:2ω6). Фурановая кислота поступает в организм с растительной пищей, поскольку была обнаружена во многих растениях, а также с морепродуктами [18–21]. Данное производное обладает существенным антиоксидантным действием [22, 23]. Биологическая функция данного вещества — вторичный посредник, используемый клеткой для прямой защиты от окислительного стресса [24]. Факт повышения концентрации ЕрОДЕ в крови животных группы «Свинец» относительно группы «Контроль», таким образом, свидетельствует о протекании окислительного стресса, характерного для свинцовых отравлений [25–27]. Однако в литературе не найдено упоминаний о данном веществе в контексте свинцовых отравлений.

Все идентифицированные ацилкарнитины (рис. 2) обнаруживают характерные нейтральные потери от разрывов связей 1 (59.0735 —  $C_3H_7N$ ), 1 + 3 (102.0230 —  $C_4H_6O_3$ ) и 3 (161.1009 —  $C_7H_{15}NO_3$ ). Также в спектрах присутствуют характеристические фрагменты от разрывов по 1 (60.0807 —  $C_3H_{10}N$ ) 1 + 2 (85.0287 —  $C_4H_5O_2$ ) и по 2 (144.1038 —  $C_7H_{14}NO_2$ ) [28]. 3-OODC и 3-OGDC по брутто-формуле являются гомологами, ацильный радикал которых содержит насыщенную углеводородную цепь с кетогруппой, положение которой уточняется по наличию нейтральной потери  $C_2H_2O$  (разрыв 4) от исходного кетоацилия (281.2522 и 253.2154 соответственно) с образованием фрагмента ацилий-катиона короче на 2 атома углерода (239.2395 и 211.2060 соответственно). Исходя из этого можно предположить расположение кетогруппы при третьем атоме углерода. Брутто-формула ацилий-катиона с отщеплённой водой для

HLC  $C_{18}H_{28}O$  (261.2231), что соответствует наличию 4 двойных связей. Одна соответствует оксигруппе, одна возникла по месту отрыва воды, две другие присущи остатку исходной карбоновой кислоты. Для естественно образующихся жирных кислот данным условиям соответствует линолевая кислота — отсюда можно предположить положение двух двойных связей при атомах 9 и 12. Положение третьей связи, а равно и положение гидроксигруппы установить не удалось. Спектр 5/6-HGDC обнаруживает алкильную серию с  $C_{11}H_{19}O$  по  $C_6H_9O$  с ненасыщенностью 2,5, которая заканчивается фрагментом  $C_3H_5O$  с ненасыщенностью 1,5. Наиболее вероятен отрыв данного радикала от винильного положения, что предполагает наличие двойной связи после отрыва гидроксигруппы между атомами 5 и 6 — соответственно гидроксигруппа изначально располагалась на одном из этих атомов. Пониженное снабжение клеток кислородом приводит к нарушениям в процессах, непосредственно задействующих кислород. Процесс бета-окисления требует присутствия кофермента  $NAD^+$ . Окислительный стресс, вызванный свинцом, приводит к нарушениям в дыхательной цепи, что предположительно уменьшает количество окисленной формы  $NAD$ . Дефицит  $NAD^+$  приводит к накоплению оксо- и оксиацил-КоА производных в матрикс с последующим преобразованием их в ацилкарнитиновые производные и выведением за пределы митохондрий карнитиновым челноком с последующей экскрецией в межклеточное пространство [29–31]. Таким образом, обнаруженные нами в экспонированной свинцом группе ацилкарнитиновые производные длинноцепочечных жирных кислот могут являться не только признаком нарушения процесса бета-окисления, но и дефицита окисленной формы кофермента  $NAD$ , что может являться признаком нарушений в дыхательной цепи и процессах синтеза АТФ.



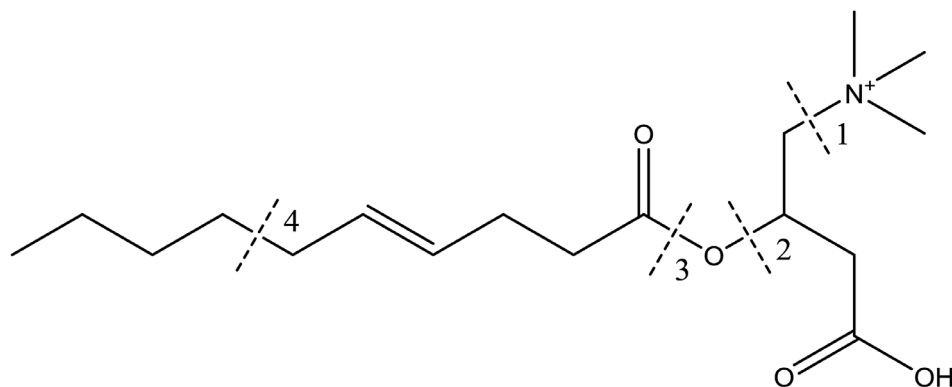


Рис. 3. Фрагментация 4-деценоилкарнитина.

Fig. 3. Fragmentation of 4-decenoylcarnitine.

Спектр данного вещества содержал характерные потери ацилкарнитинов, описанные выше (по положениям 1, 2 и их комбинациям). Положение двойной связи при С4 позволило установить наличие фрагмента  $C_6H_9O$  (97.0644), образованного посредством ретроеновой перегруппировки ацилий-катиона  $C_{10}H_{17}O$  (153.1282) (первый разрыв по 3, второй — по 4) (рис. 3).

Среднецепочечные жирные кислоты способны поступать в митохондрии, минуя карнитиновый челнок, — следовательно, часть такого рода субстратов проникает в митохондрии в виде ацилкарнитинов, часть — в немодифицированном виде [32]. Вследствие нарушения процесса бета-окисления, обсуждаемого выше, карнитиновый пул клетки был значительно израсходован на выведение промежуточных продуктов бета-окисления из митохондрий за пределы клетки. Таким образом, деценовая кислота, обладая средним по длине углеводородным радикалом, вследствие дефицита карнитина будет меньше подвергаться преобразованию в

ацилкарнитиновое производное и поступать в митохондрии для участия в процессе окисления в немодифицированном виде, что подтверждается обнаруженным нами снижением содержания деценоилкарнитина в экспонированной группе в сравнении с контрольной.

Спектры данного вещества содержат нейтральные потери, характерные для лизофосфатидилсеринов, а именно 1 (87.0309), 1 + 2 (97.9763), 2 + 3 (74.0380) [33] (рис. 4). Углеводородный радикал ацилий-катиона содержит 6 двойных связей, положение которых вытекает из степени насыщенности фрагментных ионов алкильной и ацильной серии, проявляющихся на масс-спектре.

Из литературных данных известно, что под действием солей свинца происходит повреждение клеток организма с последующей их утилизацией посредством апоптоза [34]. Одним из внешних проявлений этого процесса является выход на поверхность клеточной мембраны фосфолипидов, содержащих в своём составе аминокислоту серин [35]. Утилизация

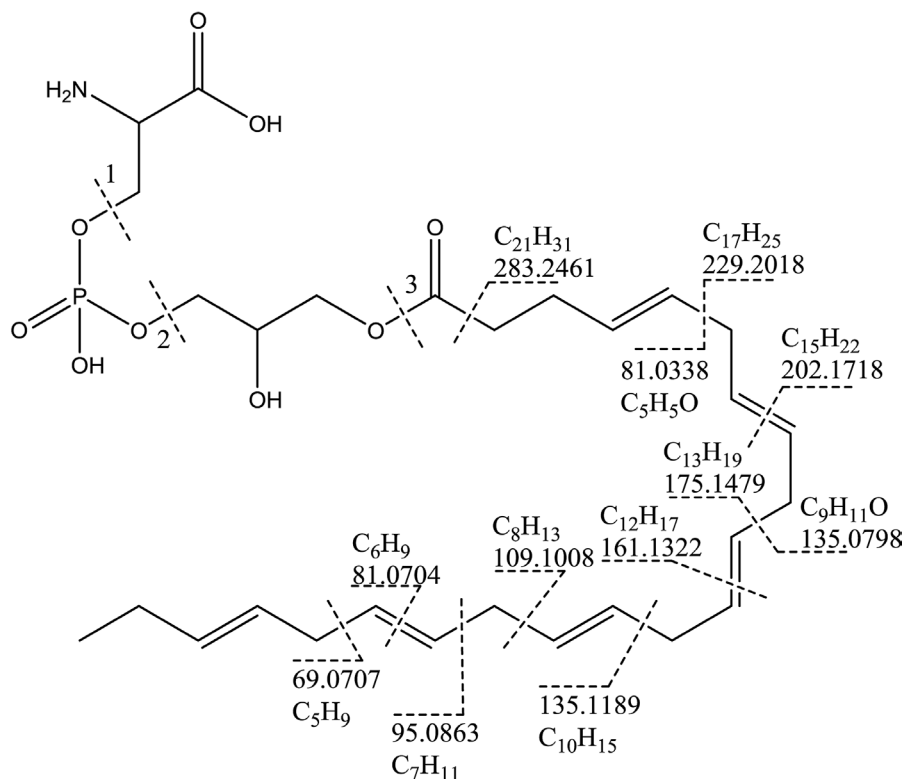


Рис. 4. Фрагментация LPS(22:6) (лизо-1-докозагексаеноил-глицеро-3-фосфосерин).

Fig. 4. Fragmentation of LPS(22:6) (lyso-1-docosahexaenoyl-glycero-3-phosphoserine).

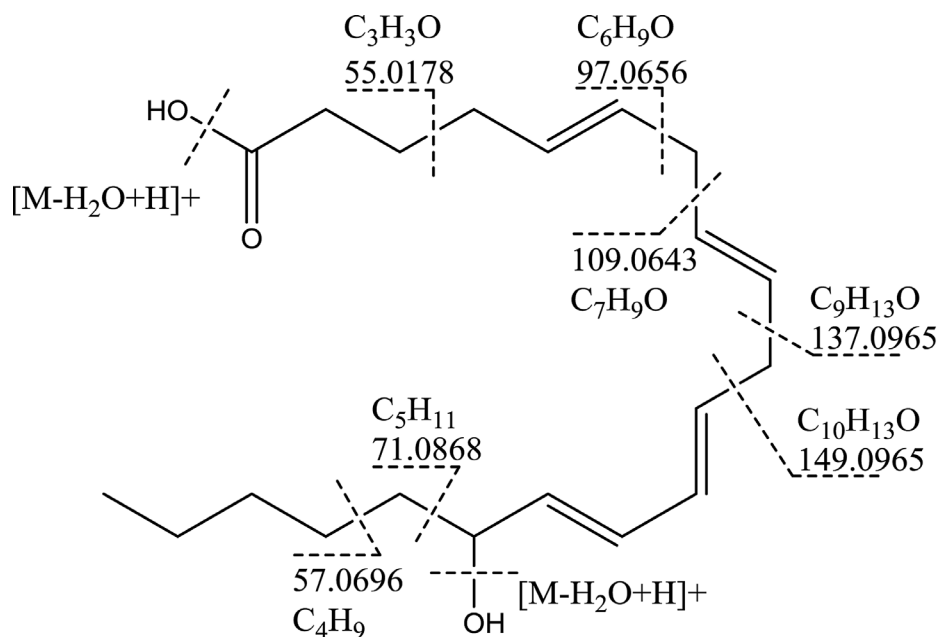


Рис. 5. Фрагментация 15-HETE (15-гидрокси-5,8,11,13-эйкозатетраеновая кислота).

Fig. 5. Fragmentation of 15-HETE (15-hydroxy-5,8,11,13-eicosatetraenoic acid).

фрагментов апоптической клетки происходит посредством фагоцитоза макрофагами. После активации макрофаги экскретируют в межклеточную среду, специфическую фосфатидилсерин фосфолипазу A2, избирательно гидролизующую серинсодержащие фосфолипиды апоптических клеток, — при этом образуются лизофосфатидилсерины, к числу которых относится обнаруженный нами лизо-докозагексаноил-глицеро-фосфосерин. Далее по механизму хемотаксиса, двигаясь по градиенту концентрации, макрофаг обнаруживает фрагмент апоптической клетки и фагоцитирует его [36]. Таким образом, повышение концентрации лизо-докозагексаноил-глицеро-фосфосерина в экспонированной группе является маркером интенсификации протекания апоптических процессов в сравнении с контрольной группой.

Фрагментация 15-НЕТЕ начинается с отрыва двух молекул воды — от карбоксильной группы и углеводородного радикала (рис. 5). Оставшийся ацилий-катион ( $285.2192 \text{ } C_{20}H_{29}O$ ) выбрасывает насыщенный фрагмент  $C_5H_{11}$  (71.0868), а также фрагмент  $C_3H_3O$  (55.0178), свидетельствующие о том, что все 5 двойных связей заключены между атомами C5 и C15. Присутствие серии ионов с  $C_6H_9O$  (97.0656) по  $C_{10}H_{13}O$  (149.0965) подтверждает положение двойных связей при C5, C8, C11 [37]. Последняя двойная связь располагается в сопряжённом виде при атоме C13, гидроксил при C15 — как следствие протекания окисления двойной связи при C14.

Гипоксические условия и окислительный стресс — причины интенсификации апоптических процессов, признаки которого обсуждались выше. Из литературных данных известно, что в условиях нехватки кислорода происходит активация фермента 15-липоксигеназы макрофагов, эозинофилов и эндотелиальных клеток дыхательных путей [38]. Данный фермент катализирует образование 15-НЕТЕ из арахидоновой кислоты, входящей в мембранный пул клеток. Для данного вещества известны противовоспалительное действие — посредством ингибирования 5- и 12-липоксигеназ, что снижает концентрацию провоспалительных эйкозаноидов [39, 40]. Биохимический анализ крови показал повышение количества лейкоцитов в крови животных группы «Свинец», что свидетельствует о протекании воспалительного процесса в организме, и экспрессия 15-НЕТЕ, по-видимому, направлена на уменьшение воспалительного

отклика. Вазодинамический эффект данного вещества носит дозозависимый характер — низкие концентрации вызывают сосудорасширяющее, высокие — сосудосуживающее действие [41]. Значительного повышения артериального давления у животных в группе «Свинец» обнаружено не было, что свидетельствует или о низких концентрациях 15-НЕТЕ, или о местной вазоконстрикции, не оказывающей значительного влияния на общее артериальное давление, поскольку данное вещество относится к аутокоидам. Факт интенсификации апоптических процессов при свинцовых отравлениях известен как из литературы, так и по обнаруженным нами метаболитам (LysoPS) [34]. Данный процесс вызван кислородным голоданием и окислительным стрессом, повреждающим митохондрии. Из литературных данных известно, что 15-НЕТЕ обладает антиапоптическим эффектом, действуя как ингибитор апоптогенных белков [42].

## Заключение

Оксо- и гидроксиацилкарнитины представляют собой производные промежуточных продуктов  $\beta$ -окисления жирных кислот — повышение концентрации данных веществ в сравнении с контролем может свидетельствовать о нарушении этого процесса под влиянием окислительного стресса, вызванного свинцом. Эпокси- и 15-гидроксипроизводные жирных кислот (повышенное содержание относительно контрольной группы) потенциально выступают в роли регуляторных метаболитов (вазодинамическое, антиапоптическое, антиоксидантное действие), с одной стороны, и с другой — предположительно являются маркерами окислительного стресса, вызванного свинцом. Повышение концентрации лизофосфатидилсеринового производного свидетельствует об интенсификации апоптических процессов в организме животных экспонированной группы.

Дальнейшая работа в данном научном направлении преследует две цели. Первая заключается в разработке новых методов диагностики — установление корреляций содержания выявленных метаболитов с принятой дозой токсиканта позволит создать методы оценки токсической нагрузки. Вторая цель — разработка новых методов терапии и профилактики свинцовых отравлений посредством изучения молекулярных механизмов протекания интоксикации.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Seleznev A.A., Yarmoshenko I.V., Malinovsky G.P. Urban geochemical changes and pollution with potentially harmful elements in seven Russian cities. *Sci. Rep.* 2020; 10(1): 1668. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58434-4>
- Liu G., Yu Y., Hou J., Xue W., Liu X., Liu Y., et al. An ecological risk assessment of heavy metal pollution of the agricultural ecosystem near a lead-acid battery factory. *Ecol. Indic.* 2014; 47: 210–8. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.04.040>
- Snakin V.V., Prisyazhnaya A.A. Lead contamination of the environment in Russia. *Sci. Total. Environ.* 2000; 256(2–3): 95–101. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(00\)00452-6](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(00)00452-6)
- Simons T.J. Cellular interactions between lead and calcium. *Br. Med. Bull.* 1986; 42(4): 431–4. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a072162>
- Habermann E., Crowell K., Janicki P. Lead and other metals can substitute for  $\text{Ca}^{2+}$  in calmodulin. *Arch. Toxicol.* 1983; 54(1): 61–70. <https://doi.org/10.1007/bf00277816>
- Batra N., Nehru B., Bansal M.P. Reproductive potential of male Portan rats exposed to various levels of lead with regard to zinc status. *Br. J. Nutr.* 2004; 91(3): 387–91. <https://doi.org/10.1079/bjn20031066>
- Wang Q., Luo W., Zheng W., Liu Y., Xu H., Zheng G., et al. Iron supplement prevents lead-induced disruption of the blood-brain barrier during rat development. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2007; 219(1): 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.11.035>
- Turgut S., Polat A., Inan M., Turgut G., Emmungil G., Bican M., et al. Interaction between anemia and blood levels of iron, zinc, copper, cadmium and lead in children. *Indian J. Pediatr.* 2007; 74(9): 827–30. <https://doi.org/10.1007/s12098-007-0147-2>
- Eguchi A., Nomiya K., Sakurai K., Kim Trang P.T., Viet P.H., Takahashi S., et al. Alterations in urinary metabolomic profiles due to lead exposure from a lead-acid battery recycling site. *Environ. Pollut.* 2018; 242(Pt. A): 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.06.071>
- Hammond P.B. Exposure of humans to lead. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1977; 17: 197–214. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.17.040177.001213>
- Cleveland L.M., Minter M.L., Cobb K.A., Scott A.A., German V.F. Lead hazards for pregnant women and children: part I: immigrants and the poor shoulder most of the burden of lead exposure in this country. Part I of a two-part article details how exposure happens, whom it affects, and the harm it can do. *Am. J. Nurs.* 2008; 108(10): 40–9; quiz 50. <https://doi.org/10.1097/01.naj.0000337736.76730.66>
- Flora G., Gupta D., Tiwari A. Toxicity of lead: A review with recent updates. *Interdiscip. Toxicol.* 2012; 5(2): 47–58. <https://doi.org/10.2478/v10102-012-0009-2>
- Kelly R.S., Bayne H., Spiro A. 2<sup>nd</sup>, Vokonas P., Sparrow D., Weiss S.T., et al. Metabolomic signatures of lead exposure in the VA Normative Aging Study. *Environ. Res.* 2020; 190: 110022. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110022>
- Cheng M., Wu H., Wu H., Liu X., Zhou A. Metabolic profiling of copper-laden hepatolenticular degeneration model rats and the interventional effects of Gandou decoction using UPLC-Q-TOF/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2019; 164: 187–95. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.10.041>
- Tsugawa H., Kind T., Nakabayashi R., Yukihiro D., Tanaka W., Cajka T., et al. Hydrogen rearrangement rules: computational MS/MS fragmentation and structure elucidation using MS-FINDER software. *Anal. Chem.* 2016; 88(16): 7946–58. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00770>
- Lai Z., Tsugawa H., Wohlgemuth G., Mehta S., Mueller M., Zheng Y., et al. Identifying metabolites by integrating metabolome databases with mass spectrometry cheminformatics. *Nat. Methods.* 2018; 15(1): 53–6. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4512>
- Rutties C., Schymanski E.L., Wolf S., Hollender J., Neumann S. MetFrag relaunched: incorporating strategies beyond in silico fragmentation. *J. Cheminform.* 2016; 8: 3. <https://doi.org/10.1186/s13321-016-0115-9>
- Hannemann K., Puchta V., Simon E., Ziegler H., Ziegler G., Spiteller G. The common occurrence of furan fatty acids in plants. *Lipids.* 1989; 24(4): 296–8. <https://doi.org/10.1007/bf02535166>
- Batna A., Scheinkönig J., Spiteller G. The occurrence of furan fatty acids in *Isochrysis* sp. and *Phaeodactylum tricornutum*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1993; 1166(2–3): 171–6. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(93\)90093-o](https://doi.org/10.1016/0005-2760(93)90093-o)
- Wahl H.G., Tetschner B., Liebig H.M. The effect of dietary fish oil supplementation on the concentration of 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionic acid in human blood and urine. *J. High Resol. Chromatogr.* 1992; 15(12): 815–8.
- Jensen S., Ragnarsdóttir O., Johannsson R. Marine sources of furan fatty acids. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 2019; 28(1): 74–83. <https://doi.org/10.1080/10498850.2018.1561569>
- Okada Y., Okajima H., Konishi H., Terauchi M., Ishii K., Liu I.M., et al. Antioxidant effect of naturally occurring furan fatty acids on oxidation of linoleic acid in aqueous dispersion. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 1990; 67(11): 858–62. <https://doi.org/10.1007/BF02540506>
- Teixeira A., Cox R.C., Egmond M.R. Furan fatty acids efficiently rescue brain cells from cell death induced by oxidative stress. *Food Funct.* 2013; 4(8): 1209–15. <https://doi.org/10.1039/c3fo60094g>
- Yu X.H., Shanklin J. Solving a furan fatty acid biosynthesis puzzle. *J. Biol. Chem.* 2020; 295(29): 9802–03. <https://doi.org/10.1074/jbc.h120.014701>
- Gurer-Orhan H., Sabir H.U., Özgüneş H. Correlation between clinical indicators of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead-exposed workers. *Toxicology.* 2004; 195(2–3): 147–54. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2003.09.009>
- Mateo R., Beyer W.N., Spann J.W., Hoffman D.J., Ramis A. Relationship between oxidative stress, pathology, and behavioral signs of lead poisoning in mallards. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 2003; 66(14): 1371–89. <https://doi.org/10.1080/15287390306390>
- Bechara E.J. Oxidative stress in acute intermittent porphyria and lead poisoning may be triggered by 5-aminolevulinic acid. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1996; 29(7): 841–51.
- Smith E.H., Matern D. Acylcarnitine analysis by tandem mass spectrometry. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* 2010; Chapter 17: Unit 17.8.1–20. <https://doi.org/10.1002/0471142905.hg1708s64>
- Wojtczak L. Effect of long-chain fatty acids and acyl-CoA on mitochondrial permeability, transport, and energy-coupling processes. *J. Bioenerg. Biomembr.* 1976; 8(6): 293–311. <https://doi.org/10.1007/bf00765158>
- Su X., Han X., Mancuso D.J., Abendschein D.R., Gross R.W. Accumulation of long-chain acylcarnitine and 3-hydroxy acylcarnitine molecular species in diabetic myocardium: identification of alterations in mitochondrial fatty acid processing in diabetic myocardium by shotgun lipidomics. *Biochemistry.* 2005; 44(13): 5234–45. <https://doi.org/10.1021/bi047773a>
- Violante S., Ijlst L., Te Brinke H., Tavares de Almeida I., Wanders R.J., Ventura F.V., et al. Carnitine palmitoyltransferase 2 and carnitine/acylcarnitine translocase are involved in the mitochondrial synthesis and export of acylcarnitines. *FASEB J.* 2013; 27(5): 2039–44. <https://doi.org/10.1096/fj.12-216689>
- Papamandjaris A.A., MacDougall D.E., Jones P.J. Medium chain fatty acid metabolism and energy expenditure: obesity treatment implications. *Life Sci.* 1998; 62(14): 1203–15. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(97\)01143-0](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(97)01143-0)
- Taguchi R., Houjou T., Nakanishi H., Yamazaki T., Ishida M., Imagawa M., et al. Focused lipidomics by tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2005; 823(1): 26–36. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.06.005>
- Ahmed M.B., Ahmed M.I., Meki A.R., Abdrahob N. Neurotoxic effect of lead on rats: Relationship to Apoptosis. *Int. J. Health Sci. (Qassim).* 2013; 7(2): 192–9. <https://doi.org/10.12816/0006042>
- Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H., Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods.* 1995; 184(1): 39–51. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(95\)00072-i](https://doi.org/10.1016/0022-1759(95)00072-i)
- Park K.S., Lee H.Y., Kim M.K., Shin E.H., Jo S.H., Kim S.D., et al. Lyso-phosphatidylserine stimulates L2071 mouse fibroblast chemotactic migration via a process involving pertussis toxin-sensitive trimeric G-proteins. *Mol. Pharmacol.* 2006; 69(3): 1066–73. <https://doi.org/10.1124/mol.105.018960>
- Murphy R.C., Fiedler J., Hevko J. Analysis of nonvolatile lipids by mass spectrometry. *Chem. Rev.* 2001; 101(2): 479–526. <https://doi.org/10.1021/cr9900883>
- Profita M., Sala A., Riccobono L., Paternò A., Mirabella A., Bonanno A., et al. 15-Lipoxygenase expression and 15(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid release and reincorporation in induced sputum of asthmatic subjects. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 2000; 105(4): 711–6. <https://doi.org/10.1067/mai.2000.105122>
- Vanderhoek J.Y., Bryant R.W., Bailey J.M. Inhibition of leukotriene biosynthesis by the leukocyte product 15-hydroxy-5,8,11,13-eicosatetraenoic acid. *J. Biol. Chem.* 1980; 255(21): 10064–6.
- Vanderhoek J.Y., Bryant R.W., Bailey J.M. 15-hydroxy-5,8,11,13-eicosatetraenoic acid: A potent and selective inhibitor of platelet lipoxygenase. *J. Biol. Chem.* 1980; 255(13): 5996–8.
- Van Diest M.J., Verbeuren T.J., Herman A.G. 15-lipoxygenase metabolites of arachidonic acid evoke contractions and relaxations in isolated canine arteries: role of thromboxane receptors, endothelial cells and cyclooxygenase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1991; 256(1): 194–203.
- Wang S., Wang Y., Jiang J., Wang R., Li L., Qiu Z., et al. 15-HETE protects rat pulmonary arterial smooth muscle cells from apoptosis via the PI3K/Akt pathway. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2010; 91(1–2): 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2009.12.007>