

УДК 614.71

ОСНОВНІ ПУБЛІКАЦІЇ

ЧУМАК А. А., КУБАШКО А. В.

ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ В МЕДИЦИНЕ

Сучасна медична наука підійшла до необхідності глибокого вивчення і розуміння суті процесів, що відбуваються в людському організмі. Завдяки технічному уdosконаленню хромато-масс-спектрометрія посіла гідне місце серед методів інструментальної аналітичної хімії у фундаментальних і клінічних медичних дослідженнях. В огляді розглядається суть методу, а також різноманітність його застосувань у медико-біологічних пошуках і клінічній лабораторній практиці.

Modern medicine science has approached to the necessity of more detail study and understanding of processes essence taking place in human body. Due to technical improvement the chromatography-mass spectrometry found worthy use among instrumental and analytical chemical methods in fundamental and clinical medical investigations. Method gist and variety of its use in medico-biological researching and clinical laboratory practice is considering in presented review.

В последние десятилетия решение проблем разделения сложных смесей и количественного определения их компонентного состава оказалось огромное влияние на развитие науки и техники. Жидкостная и газовая хроматография, капиллярный и гель-электрофорез стали обычными аналитическими методами. Каждый из этих инструментальных методов имеет свою область применения и предназначен для анализа самых разнообразных объектов: от макромолекул (ДНК, РНК, белков) до низкомолекулярных веществ (жирных кислот, спиртов, альдегидов, кетонов и др.). Несмотря на то, что хроматографические методы успешно используются при анализе полимеров, в том числе и биополимеров, большая часть их применений лежит в области анализа низкомолекулярных соединений (<1000 дальтон).

Объектами анализа жидкостной и газовой хроматографии могут быть одни и те же вещества (фенолы, витамины, летучие органические кислоты и др.), однако большинство нелетучих и сильнонаполярных веществ (аминокис-

лоты, сахара, антибиотики, водорастворимые витамины и др.) являются объектами анализа высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В то же время, методами газовой хроматографии (ГХ) удобнее анализировать такие соединения, как альдегиды, кетоны, компоненты эфирных масел, спирты, алифатические и галогензамещённые углеводороды, другие летучие и относительно термически стабильные (вплоть до 400 °C) вещества. При этом преимуществом ГХ перед другими хроматографическими методами является её высокая чувствительность, которая позволяет определять в различных продуктах микропримеси с концентрацией вплоть до 10^{-14} г [1].

Сочетание нескольких физико-химических методов анализа позволяет резко увеличить объем извлекаемой информации об анализируемом веществе. Так, сочетание газохроматографического и масс-спектрометрического методов позволило создать новое направление хроматографического анализа – хромато-масс-спектрометрический анализ (ГХ/МС).

Суть метода масс-спектрометрии основывается на измерении отношения массы ионов к их заряду. Разделение анализируемого вещества на ионы в масс-анализаторе осуществляется методом электронного удара (ЭУ) в 70 эВ или химическими агентами в ионном источнике. При этом ионизация сопровождается фрагментацией исходных молекул с формированием множества осколочных ионов, состав которых характерен для данного соединения и является его своеобразным “отпечатком пальца”. На пути к коллектору ионов под воздействием стационарного электростатического поля ионы встречают масс-фильтр, который в определенный момент времени пропускает только один вид ионов с определенным отношением массы к заряду. Разработано достаточно много конструкций масс-фильтров, но наибольшее распространение получил т. н. квадрупольный масс-фильтр, в котором ионы, пролетая сквозь четыре параллельных электрода, расположенных в сечении вершин квадрата, под воздействием переменного электрического поля меняют траекторию движения в зависимости от соотношения их массы к заряду. Ступенчато изменяя напряжение на квадруполе, можно добиться последовательной регистрации ионов и получить уникальный для них масс-спектр. Масс-спектры одного и того же вещества, полученные на разных масс-спектрометрах с ионизацией ЭУ, практически совпадают. Это послужило основой для создания библиотек, которые содержат масс-спектры сотен тысяч известных соединений. Такие библиотеки дают возможность идентифицировать вещества, сократив их число с тысяч и сотен до единиц или одного единственного. Хроматограмма по полному ионному току в ГХ/МС не отличается по внешнему виду от хроматограммы, полученной с использованием других детекторов, однако она имеет дополнительное “измерение”: за каждой точкой вне плоскости хроматограммы располагается масс-спектр. Хромато-масс-спектрометр является надежным средством идентификации веществ, так как, кроме времен удерживания, предоставляет информацию о масс-спектрах веществ.

Работа масс-детектора, в результате которой получают полный масс-спектр идентифицируемых веществ, называется режимом сканирования масс. Другой важной особенностью работы масс-спектроскопического детектора является возможность регистрации выборочных ионов. Такой режим называется селективным ионным мониторингом (СИМ). Когда постановка аналитической задачи предполагает регистрацию только определенных веществ (например, пестицидов или наркотиков), применение режима СИМ дает возможность в десятки раз повысить чувствительность и резко увеличить селективность детектора.

Динамический диапазон масс-спектрометра составляет шесть-семь порядков, что дает возможность регистрировать микрограммовые примеси на фоне макроконцентраций основных веществ (матрицы). Поэтому ГХ/МС нашла широкое применение в качестве анализатора определенных соединений, находящихся в очень сложных смесях, и является арбитражным методом для анализа наркотиков, допинговых препаратов, токсических и многих других веществ в различных средах, в том числе и в биологических жидкостях [2].

Сочетание методов газохроматографического разделения веществ и масс-спектрометрического их детектирования создало совершенно уникальные возможности для решения различных аналитических задач, решаемых при помощи хромато-масс-спектрометров. Современные модели этих приборов производятся такими известными фирмами, как "Agilent Technologies" (до 1999 г. – "Hewlett-Packard"); "Thermo Finnigan"; "Shimadzu"; "Varian"; "Chrompack", "Perkin Elmer Instruments" и др.

Совершенствование химических методов расщепления липидов, углеводов и белков до более простых компонентов, которые впоследствии могут быть превращены в летучие соединения, открыло дорогу для применения газовой хроматографии (в сочетании с масс-спектрометрией) в фундаментальных медико-биологических исследованиях, а также в клинической диагностике многих заболеваний путём идентификации и количественного измерения содержания определённых соединений (маркеров). Наличие этих соединений в определенных количествах является характерным признаком протекания патологических процессов в человеческом организме. Метод хромато-масс-спектрометрии с успехом используется в молекулярной биологии и биохимии для исследования внутриклеточного липидного [3, 4], белкового [5] и энергетического [6] обменов; в генетике – для исследования повреждающих ДНК агентов, обнаружения причин генетических аномалий и заболеваний неизвестной этиологии [7, 8, 9]; в токсикологии и судебной медицине – для диагностики отравлений фальсифицированными алкогольными напитками, техническими жидкостями, пестицидами [10, 11, 12]; в спортивной медицине – для допинг-контроля [13]; в фармакологии и фармации – для контроля качества препаратов и изучения метаболизма лекарственных средств [14, 15]; при решении задач гигиены и экологии относительно определения вредных веществ в воздухе, воде и пищевых продуктах

[16, 17, 18, 19]. Хромато-масс-спектрометрия также применяется при стандартизации лабораторных методов исследований биологических жидкостей человеческого организма [20].

Как известно, липидный обмен играет важную роль в жизнедеятельности человеческого организма. Липиды выполняют многие функции, начиная с протекторной и структурной, при формировании цитоплазматической и ядерной биомембран, до энергетического жизнеобеспечения. Основную группу липидов (жиров) составляют сложные эфиры глицерина и жирных кислот (ЖК). Физико-химические свойства жиров в значительной мере определяются соотношением насыщенных и ненасыщенных жирных кислот, входящих в состав этих соединений.

Нарушение липидного обмена в организме приводит к серьезным изменениям в органах и тканях, что связано с качеством и количеством ЖК, входящих в состав липидов. Так, изменения в метаболизме арахидоновой кислоты являются одним из факторов, определяющих состояние эндотелия сосудистой стенки [21], что в свою очередь влияет на такие процессы, как агрегация тромбоцитов, образование тромбозов, спазм сосудов. Имеются сведения о функциональной связи между обменом незаменимых полиненасыщенных ЖК (линолевой, линоленовой и арахидоновой) и функционированием костной ткани [22]. Отсутствие незаменимых жирных кислот в пищевом рационе может вызвать замедление роста, а также нарушение работы почек [23]. Образующиеся из ненасыщенных жирных кислот простагландины оказывают влияние на метаболизм костной ткани, процессы воспаления, кровообращения, транспорта ионов через мембранны [24, 25]. В связи с этим идентификация, а также определение концентраций отдельных ЖК в сыворотке крови и тканях, имеют большое значение для характеристики метаболизма липидов в организме человека [26].

Развитие исследований клеточных мембран способствовало пониманию проблем, связанных с жизнедеятельностью клеток, и изучению протекающих в них патологических процессов. Согласно современным представлениям, все клеточные и внутриклеточные мембранны устроены сходным образом, одним из их компонентов которых являются амфифильные молекулы липидов, в состав которых входят неполярные углеводородные цепи жирных кислот. Эти низкомолекулярные соединения обеспечивают стабильность биологических мембран [27], поддерживают энергетический клеточный гомеостаз [28], являются источником образования физиологически активных производных высших жирных кислот – простагландинов, простациклинов, тромбоксанов, лейкотриенов [29], а также принимают участие в формировании иммунитета и аллергических реакций [30]. Состав жирных кислот является уникальным и видоспецифичным для разных мембран, поэтому возможность идентификации жирнокислотного спектра посредством ГХ/МС с целью определения индивидуальных структур биологических мембран, как в клетках различных тканей человеческого организма, так и внутриклеточных органеллах, является незаменимой. [31].

Процессы свободно-радикального окисления протекают во всех клетках организма, как в норме, так и при патологии. Непосредственным участником этих процессов являются активные формы кислорода, которые угнетают активность гликолиза, окислительного фосфорилирования, ингибируют синтез белка и нуклеиновых кислот, нарушают нормальное протекание различных ферментативных процессов. В свою очередь, организм обладает целой системой защиты от повреждений, вызванных свободнорадикальным окислением, которая, однако, не всегда является эффективной. Окисление клеточных липидных мембран и других клеточных структур, включая ДНК, может привести к оксидантному стрессу, наличие которого в свою очередь приводит к развитию таких патологических процессов и заболеваний, как канцерогенез, заболевания желудка и печени (гастрит, язва, хронический гепатит), заболеваний, связанных с дегенерацией нервных клеток, ускоренному старению [32]. ГХ/МС дает уникальную возможность определения соединений, являющихся маркерными показателями оксидантного стресса: 8-гидрокси-2-дюоксигуанозина, гидроперекисей сложных эфиров, гидроксидов и кетонов жирных кислот и способствует более детальному объяснению механизмов внутриклеточных патологических процессов. [33, 34].

Поражение эпителия сосудистой стенки в результате свободнорадикального окисления может стать причиной атеросклероза, варикоза, гипертензии, а также ишемического или геморрагического инсульта. В этом случае наиболее показательными маркерами оксидантного стресса сосудистой стенки, которые с успехом определяются при помощи метода ГХ/МС, является повышенное количество изоформ некоторых простагландинов и изопростанов, а также образующиеся альдегиды и кетоны высших жирных кислот [35].

Сравнительно недавно открыта группа наследственных, так называемых пероксисомных, заболеваний [36]. Пероксисомы представляют собой распространенные клеточные органеллы лейкоцитарных клеток, окруженные единичной мембраной. Особенностью метаболической функции пероксисом является окисление жирных кислот, которые неохотно трансформируются иными органеллами. Пероксисомные нарушения проявляются в задержке развития, а также поражении нервной и эндокринной систем, нарушении функций ряда внутренних органов. Практически для всех пероксисомных заболеваний характерно накопление в клеточных мембранах и плазме крови насыщенных жирных кислот с длиной цепи до 24–28 углеводородных атомов. В настоящее время ГХ/МС является самым эффективным методом при определении таких метаболических нарушений [37].

На сегодняшний день при постановке диагнозов атеросклероза, ишемической болезни сердца и нарушения мозгового кровообращения важным является определение липидного состава крови (холестерина, липопротеинов высокой и низкой плотности). Метод ГХ/МС с успехом используется для детального изучения метabolизма липидов крови и его изменений в случае применения питания с различными схемами липидной нагрузки [38].

В последние годы появился ряд работ, посвященных исследованию методами хромато-масс-спектрометрии метаболизма витаминов при различных заболеваниях. Так, с помощью ГХ/МС была более глубоко изучена протекторная роль витаминов Е, С и D₃ [39, 40, 41] при антиоксидантном стрессе, витамина B₁₂ – при врожденных патологиях нервной системы [42], а также витамина К, при заболеваниях сердечно-сосудистой системы и системы свертывания крови [43].

В наши дни ГХ/МС с успехом применяется для анализа спиртов, альдегидов, аминокислот, углеводов, нуклеотидов, стероидов и других низкомолекулярных биогенных соединений [44]. В частности, методом ГХ/МС определяется увеличение содержания ацетона, гептанона-2 и других кетонов при сахарном диабете [45]. Исследование метаболизма желчных кислот с помощью ГХ/МС позволит ближе подойти к пониманию патогенеза цирроза печени [46]. Накопление фенилуксусной кислоты свидетельствует о некоторых заболеваниях нервной системы. Для контроля состояния ожоговых больных определяют производные углеводов и такие сахара как маннитол и лактулоза [47]. ГХ/МС дает возможность в одной пробе количественно оценить весь клинически значимый спектр стероидов [48]. Данный анализ незаменим в диагностике ряда заболеваний, связанных с нарушением функций надпочечников, щитовидной железы и эндокринной системы половой сферы [49]. Разработаны методы определения катехоламинов: адреналина, норадреналина и родственных им соединений при диагностике опухолевых заболеваний надпочечников и связанных с ними гипертензий невыясненной этиологии [50].

Все большее применение ГХ/МС получает при выявлении генетических заболеваний по маркерным веществам [51]. Так, по избыточному количеству гомогентизиновой кислоты судят о наличии такого генетического заболевания как алкаптонурия, характеризующегося нехваткой фермента, трансформирующего гомогентизиновую кислоту в малейацетоуксусную в метаболизме тирозина. Последствиями алкаптонурии могут явиться артрит позвоночника и охронозис (пигментация соединительной ткани) [52]. В этом случае ГХ/МС является надежным методом ранней диагностики этих патологий.

В микробиологии ГХ/МС находит все большее применение и оказывается нередко более быстрым и универсальным методом, чем при решении проблемы дифференциации микроорганизмов при помощи химических агентов [53]. Данный метод позволяет получить уникальную информацию о составе мономерных химических компонентов микробной клетки и ее метаболитов. Такого рода маркером может выступать индивидуальный жирнокислотный спектр липидных мембран, который дает уникальную информацию о составе мономерных химических компонентов микробной клетки и ее метаболитов. Определяя индивидуальный состав клеточных мембран, можно с успехом идентифицировать штаммы различных классов и видов микроорганизмов [54]. В настоящее время созданы базы данных, которые ис-

пользуются в компьютерных интерфейсах хромато-масс-спектрометров для идентификации уникальных маркерных жирнокислотных компонентов мембран анаэробных и аэробных бактерий, а даже некоторых видов грибков [55]. Так, для бифидобактерий отличительным является октадеценовый альдегид, для лактабактерий – пальмитолеиновый альдегид, компонент липида плазмологена [56]. Семейство рода эубактерий [57], основных обитателей кишечника, можно определить по дегидрохолестеролу, а клебсиеллы среди других членов семейства энтеробактерий имеют отличительный признак – наличие 2-оксимиристиновой кислоты в составе липополисахаридов. Специфическим признаком кандидозных грибков является наличие гептадеценовой кислоты в липидной фракции биологических жидкостей человека [58]. Стафилококки содержат нечетные изо- и антеизо- разветвленные кислоты с числом атомов углерода 15, 17, и 19. Неспецифическим тестом на микобактерии является детектирование методом ГХ/МС туберкулостеариновой кислоты в очаге поражения [59]. Описаны примеры обнаружения микроорганизмов при инфекционных процессах. При помощи метода ГХ/МС в этих случаях установлено наличие в крови человека малых молекул микробного происхождения, что сопровождается нарушением гомеостаза при воспалениях. [60].

По продуктам естественного распада бактерий или их уничтожения фагоцитами была проведена идентификация кишечной флоры при таких патологиях, как синдром раздраженного кишечника, диареи невыясненной этиологии [61]. Существенные изменения в концентрациях маркеров актиномицетов (изопальмитиновой и 10-метилразветвленной кислот с числом атомов углерода от 14 до 17) в тонком кишечнике обнаружены при болезни Крона, язвенных колитах и кахексии [62]. Оказалось, что их содержание в крови существенно меняется при дерматитах: экземе, псориазе, угреватости кожи лица, крапивнице, себорейном и атопическом дерматозах, что позволяет развивать новые версии о происхождении и течении этих заболеваний. Также с помощью ГХ/МС было выяснено, что значительная доля лихорадок неизвестной этиологии, не поддающихся лечению вагинитов, простатитов, уретритов, менингитов, эндокардитов, респираторных заболеваний, а также упоминавшихся выше кишечных патологий и дерматитов, связана с участием актиномицетов, идентификацию которых все с большим успехом можно осуществить при помощи этого метода [63].

В клинической практике ГХ/МС метод начал применяться для диагностики анаэробной газовой инфекции по оксистеариновой кислоте – метаболиту клостридий в мышечной ткани, при послеоперационной и раневой инфекции [64].

Развитие молекулярной биологии на сегодняшний день дает более глубокое понимание метаболических процессов, опосредованных различными органическими и неорганическими биорегуляторами. Одним из них является двухвалентная окись азота, которая вот уже более десяти лет привлекает внимание исследователей как активный внутриклеточный и межклеточный

посредник [65]. Молекула NO вырабатывается многими клетками организма человека, но на сегодняшний день наиболее изучен ее метаболизм в трех популяциях клеток: в эндотелии сосудистой стенки, в макрофагах и нейронах. При нормальных условиях жизнедеятельности клетки NO участвует во многих регуляторных механизмах. Так, механизм расширения сосудов реализуется за счет выработки NO в эндотелиальных клетках. Также доказано, что молекула NO, образующаяся в эндотелии, препятствует прилипанию к нему лейкоцитов и кровяных пластинок и снижает агрегацию последних [66]. Такое действие NO может иметь большое значение на ранних стадиях развития тромбозов и в генезе атеросклеротических повреждений сосудистой стенки. При изучении иммунологического ответа многочисленные эксперименты подтвердили, что макрофаги способны выделять большое количество этого вещества в ответ на воздействие чужеродных агентов. Значение уровня содержания NO в центральной нервной системе при нормальных условиях связывают с тремя процессами (так называемая NO-гипотеза) [67]:

- 1) участие в межнейронной связи в качестве своеобразного нейромедиатора,
- 2) регуляция церебрального кровотока;
- 3) установление межнейронных синаптических взаимосвязей при развитии нервной системы.

Токсический же эффект NO проявляется, прежде всего, в ингибировании митохондриальных ферментов [68]. Кроме того, молекула NO может непосредственно повреждать ДНК, что впоследствии может привести к гибели клеток. NO оказывает непосредственное влияние на железосодержащие ферменты, а также образует сильный окислитель – пероксинитрит, являющийся реакционным и наиболее токсичным свободнорадикальным соединением [69].

ГХ/МС на сегодняшний день дает возможность более глубоко исследовать пути метаболизма такого важного клеточного мессенджера, как NO, посредством определения производных различных NO-синтетаз в тканях, а именно: определении производных L-[¹⁵N]₂-аргинина, [¹⁵N]-нитритов и [¹⁵N]-нитратов [70].

Применение ГХ/МС дало возможность определять метаболические профили биосред: крови, мочи, слюны, выдыхаемого воздуха [71]. В одном образце можно зарегистрировать и идентифицировать несколько сот компонентов без предварительного знания его состава. Метаболические профили индивидуальны и несут в себе массу медицинской информации о том, какими лекарствами лечился в последнее время пациент, какими микроорганизмами вызвано то или иное заболевание и т.д.

Компьютерный анализ метаболических профилей является одним из мощнейших инструментов диагностики врожденных и приобретенных заболеваний, таких как сахарный диабет, подагра, разветвленно-цепочечная кетонuria – фенилкетонурия и др. [72].

Таким образом, метод ГХ/МС даёт возможность исследовать метаболические профили как системы интегральной оценки метаболических процессов в живых организмах. Этот метод является одним из самых мощных аналитических методов и находит все большее применение в научных исследованиях и клинической практике.

Литература

1. *Bagnoli F., Bianchi A., Ceccarini A., Fuoco R. and Giannarelli S.* Trace metals and organic pollutants in treated and untreated residues from urban solid waste incinerators // Microchemical Journal. – 2005. – Vol. 79, № 1–2. – P. 291–297.
2. *Gómez-Ariza J. L., García-Barrera T., Lorenzo F., Bernal V., Villegas M. J. and Oliveira V.* Use of mass spectrometry techniques for the characterization of metal bound to proteins (metallomics) in biological systems // Analytica Chimica Acta. – 2004. – Vol. 524, № 1–2. – P. 15–22.
3. *Brondz Ilia.* Development of fatty acid analysis by high-performance liquid chromatography, gas chromatography, and related techniques // Analytica Chimica Acta. – 2002. – Vol. 465, № 1–2. – P. 1–37.
4. *Wheatley Alan R.* Some recent trends in the analytical chemistry of lipid peroxidation // TrAC Trends in Analytical Chemistry. – 2000. – Vol. 19, № 10. – P. 617–628.
5. *Rappaport Stephen M., Waidyanatha Suramya, Yeowell-O'Connell Karen, Rothman Nathaniel, Smith Martyn T., Zhang Luoping, Qu Qingshan, Shore Roy, Li Guilan and Yin Songnian.* Protein adducts as biomarkers of human benzene metabolism // Chemico-Biological Interactions. – 2005. – Vol. 153–154. – P. 103–109.
6. *Man-Jeong Paik, Hong-Jin Lee and Kyoung-Rae Kim.* Simultaneous retention index analysis of urinary amino acids and carboxylic acids for graphic recognition of abnormal state // Journal of Chromatography B. – 2005. – Vol. 821, № 1. – P. 94–104.
7. *Mitchell David, Willerslev Eske and Hansen Anders.* Damage and repair of ancient DNA // Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. – 2005. – Vol. 571, № 1–2. – P. 265–276.
8. *Mashiyama Susan T., Courtemanche Chantal, Elson-Schwab Ilan, Crott Jimmy, Bee Lan Lee, Choong Nam Ong, Fenech Michael and Ames Bruce N.* Uracil in DNA, determined by an improved assay, is increased when deoxynucleosides are added to folate-deficient cultured human lymphocytes // Analytical Biochemistry – 2004. – Vol. 330, № 1. – P. 58–69.
9. *Gahl William A., Suwannarat Pim, Phornphutkul Chanika, Introne Wendy J.* Alkaptonuria. – Washington. – 2005. – 116 p.
10. *Poli Diana, Manini Paola, Andreoli Roberta, Franchini Innocente and Mutti Antonio.* Determination of dichloromethane, trichloroethylene and perchloroethylene in urine samples by headspace solid phase microextraction gas chromatography-mass-spectrometry // Journal of Chromatography B. – 2005. – Vol. 820, № 1. – P. 95–102.
11. *Couper Fiona J., Chopra Kiran and Pierre-Louis Marie Lydie Y.* Fatal methadone intoxication in an infant // Forensic Science International. – 2005. – Vol. 153, № 1. – P. 71–73.

12. **Heudorf U., Angerer J. and Drexler H.** Current internal exposure to pesticides in children and adolescents in Germany: Blood plasma levels of pentachlorophenol (PCP), lindane (γ -HCH), and dichloro(diphenyl)ethylene (DDE), a biostable metabolite of dichloro(diphenyl)trichloroethane (DDT) // International Journal of Hygiene and Environmental Health. – 2003. – Vol. 206, № 6. – P. 485–491.
13. **Gärtner Peter, Novak Clemens, Einzinger Christian, Felzmann Wolfgang, Knollmüller Max, Gmeiner Günter and Schänzer Wilhelm.** A facile and high yielding synthesis of 2,2,3,4,4-d5-androsterone- β -glucuronide – an internal standard in dope analysis // Steroids. – 2003. – Vol. 68, № 1. – P. 85–96.
14. **Geoffrey W., PengWin L.** Chiou Analysis of drugs and other toxic substances in biological samples for pharmacokinetic studies // Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications. – 1990. – Vol. 531, № 12. – P. 3–50.
15. **Halvor Jaeger.** Capillary gas chromatography/mass spectrometry in medicine and pharmacology: Hüthig, Heidelberg, 1987 (ISBN 3-7785-1375-3). XIII + 309 pp. Price DM 108.00 // Analytica Chimica Acta. – 1988. – Vol. 215. – P. 366–367.
16. **Coldwell Matthew R., Pengelly Ian and Rimmer Duncan A.** Determination of dithiocarbamate pesticides in occupational hygiene sampling devices using the isoctane method and comparison with an automatic thermal desorption (ATD) method // Journal of Chromatography A. – 2003. – Vol. 984, № 1. – P. 81–88.
17. Concentration measurements of selected hydrocarbons in methane/air partially premixed flames using gas chromatography // International Journal of Thermal Sciences. – 2005. – Vol. 44, № 11. – P. 1078–1089.
18. **Lifeng Zhang, Ruikang Hu and Zhaoguang Yang.** Simultaneous picogram determination of “earthy-musty” odorous compounds in water using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry coupled with initial cool programmable temperature vaporizer inlet // Journal of Chromatography A. – 2005. – Available online 5 October 2005.
19. **Janouskova Eva, Krbuskova Miroslava, Rehurkova Irena, Klimova Michaela, Prokes Lubomir and Jiri.** Determination of chlordane in foods by gas chromatography // Food Chemistry. – 2005. – Vol. 93, № 1. – P. 161–169.
20. **Panteghini and Forest J. C.** Standardization in laboratory medicine: New challenges // Clinica Chimica Acta. – 2005. – Vol. 355, № 1–2. – P. 1–12.
21. **Daskalou T., Karamouzis M., Liaros G.** Metabolites of arachidonic acid in activating platelets and their estimation by radionuclide techniques // Hell J Nucl Med. – 2006. – Vol. 9, № 1. – P. 49–52.
22. **Baggio B., Budakovic A., Ferraro A., Checchetto S., Priante G., Musacchio E., Manzato E., Zaninotto M., Maresca M. C.** Relationship between plasma phospholipid polyunsaturated fatty acid composition and bone disease in renal transplantation // Transplantation. – 2005. – Vol. 80, № 9. – P. 1349–1352.
23. **Казимирко В. К., Мальцев В. И., Бутыллин В. Ю., Горобец Н. И.** Свободорадикальное окисление и антиоксидантная терапия. – Киев: Морион, 2004. – 160 с.
24. **Ha H., Lee J. H., Kim H. N., Kim H. M., Kwak H. B., Lee S., Kim H. H., Lee Z. H.** Alpha-Lipoic acid inhibits inflammatory bone resorption by suppressing prostaglandin E2 synthesis // J Immunol. – 2006. – Vol. 176, № 1. – P. 111–117.

25. *Nieves D, Moreno J. J.* Effect of arachidonic and eicosapentaenoic acid metabolism on RAW 264.7 macrophage proliferation // *J Cell Physiol.* – 2006. – Vol. 208, № 2. – P. 428–434.
26. *Мансурова И. Д., Суманова А. К.* Содержание высших жирных кислот в сыворотке крови при циррозе печени и панкреатите. – В кн.: Изменение липидного обмена патологии внутренних органов. – М.: Медицина, 1979. – 324 с.
27. *Kates M.* Techniques of Liipidology. Isolation, analysis and identification of lipids. – Amsterdam, London, New York: Academ Press. – 1972. – 242 p.
28. *Haller H., Hanefeld M., Jaross W.* Linidstoffwechselstorungen: Diagnostick, Klinik und Therapie. – Jena, 1975. – 346 p.
29. *Perez N. D., Weksler B. B.* Jddstein Generation of chemotaxic lipid from arachidonic acid exposure to a superoxide, generation system. – New York: Inflalmmation, 1980. – Vol. 4. – P. 313–328.
30. *Goodwin J. S., Webb D. R.* Regulation of the immune response by prostaglandin's // *Clin. Ivamunol. Immunopathol.* – 1980. – Vol. 15, № 1. – P. 106–112.
31. *Koumanov Kamen S., Tessier Cedric, Momchilova Albena B., Rainteau Dominique, Wolf Claude and Quinn Peter J.* Comparative lipid analysis and structure of detergent-resistant membrane raft fractions isolated from human and ruminant erythrocytes // *Archives of Biochemistry and Biophysics.* – 2005. – Vol. 434, № 1. – P. 150–158.
32. *Зиновьевева В. Н., Островский О. В.* Свободнорадикальное окисление ДНК и его биомаркер окисленный гуанозин (8-oxodG) // Вопросы медицинской химии. – 2002. – Т. 48, № 5. – С. 419–431.
33. *Spiteller Gerhard.* Linoleic acid peroxidation – the dominant lipid peroxidation process in low density lipoprotein – and its relationship to chronic diseases // *Chemistry and Physics of Lipids.* – 1998. – Vol. 95, № 2. – P. 105–162.
34. *Lunec Joseph, Holloway Karen A., Cooke Marcus S., Faux Steve, Griffiths Helen R. and Evans Mark D..* Urinary 8-oxo-2-deoxyguanosine: redox regulation of DNA repair in vivo? // *Free Radical Biology and Medicine.* – 2002. – Vol. 33, № 7. – P. 875–885.
35. *Cherubini Antonio, Ruggiero Carmelinda, Polidori Cristina M. and Mecocci Patrizia.* Potential markers of oxidative stress in stroke // *Free Radical Biology and Medicine.* – 2005. – Vol. 39, № 7. – P.841–852.
36. *Reiser Georg, Schönfeld Peter and Kahlert Stefan.* Mechanism of toxicity of the branched-chain fatty acid phytanic acid, a marker of Refsum disease, in astrocytes involves mitochondrial impairment // *International Journal of Developmental Neuroscience.* – 2006. – Vol. 24, № 2–3. – P. 113–122.
37. *Mayatepek Ertan, Ferdinandusse Sacha, Meissner Thomas and Wanders Ronald J. A.* Analysis of cysteinyl leukotrienes and their metabolites in bile of patients with peroxisomal or mitochondrial β-oxidation defects // *Clinica Chimica Acta.* – 2004. – Vol. 345, № 1–2. – P. 89–92.
38. *Sun Zhiyong, Lichtenstein Alice H., Dolnikowski Gregory G., Welty Francine K. and Schaefer Ernst J.* Human apolipoprotein A–IV metabolism within triglyceride-rich lipoproteins and plasma // *Atherosclerosis.* – 2001. – Vol. 156, № 2. – P. 363–372.
39. *Pope Simon A. S., Burtin Guillaume E., Clayton Peter T., Madge David J. and Muller David P. R.* Synthesis and analysis of conjugates of the major vitamin E

metabolite, 6-CEHC // Free Radical Biology and Medicine. – 2002. – Vol. 33, № 6. – P. 807–817.

40. *McCall Mark R. and Frei Balz*. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? // Free Radical Biology and Medicine. – 1999. – Vol. 26, № 7–8. – P. 1034–1053.

41. *Lehmann Bodo, Pietzsch Jens, Kämpf Anita and Meurer Michael*. Human keratinocyte line HaCaT metabolizes 1 α -hydroxyvitamin D3 and vitamin D3 to 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 (calcitriol) // Journal of Dermatological Science. – 1998. – Vol. 18, № 2. – P. 118–127.

42. *Morel Chantal F., Watkins David, Scott Patrick, Rinaldo Piero and Rosenblatt David S.* Prenatal diagnosis for methylmalonic acidemia and inborn errors of vitamin B12 metabolism and transport // Molecular Genetics and Metabolism. – 2005. – Vol. 86, № 1–2. – P. 160–171.

43. *Raith Wolfgang, Fauler Günter, Pichler Gerhard and Muntean Wolfgang*. Plasma Concentrations after Intravenous Administration of Phylloquinone (vitamin K1) in Preterm and Sick Neonates // Thrombosis Research. – 2000. – Vol. 99, № 5. – P. 467–472.

44. Тогузов Р. Т. Хроматография в биологии и медицине. М.: МОЛГМИ. – 1985. – 320 с.

45. *Ling Dong, Xizhong Shen and Chunhui Deng*. Development of gas chromatography-mass spectrometry following headspace single-drop microextraction and simultaneous derivatization for fast determination of the diabetes biomarker, acetone in human blood samples // Analytica Chimica Acta, 2006. – Vol. 569, № 1–2. – P. 91–96.

46. *Zollner Gernot, Fickert Peter, Silbert Dagmar, Fuchsbechler Andrea, Marschall Hanns-Ulrich, Zatloukal Kurt, Denk Helmut and Trauner Michael*. Adaptive changes in hepatobiliary transporter expression in primary biliary cirrhosis // Journal of Hepatology. – 2003. – Vol. 38, № 6. – P. 717–727.

47. *Berger Véronique, Périer Sandra, Pachiaudi Christiane, Normand Sylvie, Louisot Pierre and Martin Ambroise*. Dietary specific sugars for serum protein enzymatic glycosylation in man // Metabolism. – 1998. – Vol. 47, № 12. – P. 1499–1503.

48. *Seon Hwa Lee, Yoon Jung Yang, Kyung Mee Kim and Bong Chul Chung*. Altered urinary profiles of polyamines and endogenous steroids in patients with benign cervical disease and cervical cancer // Cancer Letters. – 2003. – Vol. 201, № 2. – P. 121–131.

49. Зеленин К. Н. Газовая хроматография в медицине // Соровский образовательный журнал. – 1996. – № 11. – С. 20–25.

50. *Jellum, Thoresen O., Horn L., Seip R., Nilsen E., Kvittingen E. A. and Stokke O.* Advances in the use of computerized gas chromatography-mass spectrometry and high-performance liquid chromatography with rapid scanning detection for clinical diagnosis // Journal of Chromatography A. – 1989. – Vol. 468. – P. 43–53.

51. *Kussmann Martin, Raymond Frédéric and Affolter Michael*. OMICS-driven biomarker discovery in nutrition and health // Journal of Biotechnology. – 2006. – Available online 4 April 2006,

52. *Hill A., Hoag G. N. and Zaleski W. A.* The investigation of aromatic acids in phenylketonuria, alkaptonuria and tyrosinosis using gas-liquid chromatography // Clinica Chimica Acta. – 1972. – Vol. 37. – P. 455–462.

53. *Coodfellow M., Minnikin D. E.* Chemical methods in Bacterial Systematics // Acad. Press. – 1985.

54. **Осипов Г. А., Парфенов А. И. Богомолов П. О.** Сравнительное хромато-масс-спектрометрическое исследование состава химических маркеров микроорганизмов в крови и биоптатах слизистой оболочки кишечника. – 2005.
55. **Tsuchiya H., Masaru S., Kato M.** et. al. High-Perfomance Liquid Chromatographic analisis of bacterial fatty acid composition for chemotaxonomic characterization of oral streptococci // J. Clin. Microbiolo. – 1986. – Vol. 24, № 1. – P. 81–85.
56. **Mott G. T., Brinkley A. W.** Plasmonylethanolamin: growth factor for cholesterol-reducing Eubacterium // J. Bacteriol. – 1979. – Vol. 139, № 3. – P. 755–760.
57. **Nicols P. D., Leeming Rlk Rayner M. S.** et al. Ust of capillary gas chromatography for measuring fecal-derived sterols // J. Chrom A. – 1996. – Vol. 733. – P. 497–509.
58. **Осипов Г. А., Парфенов А. И., Богомолов П. О.** Сравнительное хромато-масс-спектрометрическое исследование состава химических маркеров микроорганизмов в крови и биоптатах слизистой оболочки кишечника // Вестник РАМН. – 1997.
59. **Axelsson D. O., Saraf A., Larson L** Determination of ergosterol in organic dust by gas chromatography-mass spectrometry // J. Chromatogr. B.б. – 1995. – Vol. 666. – P. 77–84.
60. **Белобородова Н. В., Осипов Г. А.** Гомеостаз малых молекул микробного происхождения и его роль во взаимоотношениях микроорганизмов с хозяином // Вестник РАМН. – 1999. – Т. 16, № 7. – С. 25–31.
61. **Осипов Г. А., Демина А. М.** Хромато-масс-спектрометрическая индикация микроорганизмов в анаэробных инфекционных процессах // Вестник РАМН. – 1996. – Т. 13, № 2. – С. 15–17.
62. **Campbell Warren L., Franklin Wirt and Cerniglia Carl E.** Validation studies on an in vitro semicontinuous culture system designed to simulate a bacterial ecosystem of the human intestine // Journal of Microbiological Methods. – 1992. – Vol. 16, № 4. – P. 239–252.
63. **Осипов Г. А.** Обнаружение компонентов клеточных стенок актиномицетов (“лучистых грибков”) в клинических пробах. – 2000.
64. **Осипов Г. А., Шабанова Е. А., Бабайцева В. А.** и др. Способ диагностики клостридиальной анаэробной газовой инфекции. Патент РФ № 2021608 кл. G01 N 33/50. – зарегистрировано в гос. реестре 15.10.94. – Бюл. № 19.
65. **Дмитренко Н. П., Холиан А.** Роль взаимодействия путей метаболизма формальдегида и оксида азота в механизме их токсического действия. 2. Токическое действие оксида азота // Український біохімічний журнал. – 2005. – Т. 77, № 5. – С. 5–23.
66. **Crane M. S., Rossi A. G., Megson I. L.** A potential role for extracellular nitric oxide generation in cGMP-independent inhibition of human platelet aggregation: biochemical and pharmacological considerations // Br J Pharmacol. – 2005. – Vol. 144, № 6 – P. 849–859.
67. **Moncada S., Palmer R. M. J., Higgs E. A.** Nitric oxide: Physiology, Pathophysiology and Pharmacology // Pharmacol. Rew. – 1991 – Vol. 43. – P. 109–141.
68. **Сосунов** Оксид азота как межклеточный посредник // Соровский образовательный журнал. – 2000. – № 12. – С. 27–34.

69. *Lyman S. V., Hurst J. K.* // *J. Am. Chem. Soc.* – 1995. – 117. – P. 8867–8868.
70. *Tsikas Dimitrios, Sandmann Jörg, Savva Athanasia, Lueßen Piet, Böger Rainer H., Gutzki Frank-Mathias, Mayer Bernd and Fröhlich Jürgen C.* Assessment of nitric oxide synthase activity in vitro and in vivo by gas chromatography-mass spectrometry // *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications.* – 2000. – Vol. 742, № 1. – P. 143–153.
71. *Тогузов Р. Т.* Хроматография в биологии и медицине. – М.: МОЛГМИ. – 1985. – 260 с.
72. *Schauer Nicolas, Steinhauser Dirk, Strelkov Sergej, Schomburg Dietmar, Allison Gordon, Moritz Thomas, Lundgren Krister, Roessner-Tunali Ute, Forbes Megan G., Willmitzer Lothar et al.* GC-MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples // *FEBS Letters.* – 2005. – Vol. 579, № 6. – P. 1332–1337.

Научный центр радиационной медицины АМН Украины

Поступила в редакцию 04.12.2005