

Использование масс-спектрометрии с электрораспылением для количественного анализа липидомов клеток животных на примере полиненасыщенных жирных кислот и эйкозаноидов

Каратасо Юрий Олегович¹, Алешин Степан Евгениевич², Попова Нина Владимировна²
аспирант, аспирант, студент

¹ Институт Биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва

² Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Определение липидного состава клеток животных и человека является актуальной задачей. Известно, что липидом человека содержит более 2000 липидов и изменения их метаболизма связаны с развитием диабета, ожирения, сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваний. Важным фактом является множественность изменений липидома при системных патологиях. Так, для всех указанных заболеваний характерно изменение высвобождения из фосфолипидов клеточной мембраны полиненасыщенных жирных кислот (PUFAs) и увеличение окислительного метаболизма эйкозаноеновой кислоты с образованием простагландина E₂ (PGE₂) и родственных ему соединений - эйкозаноидов. Изучение процессов метаболизма PUFAs и синтеза эйкозаноидов долгое время ограничивалось отсутствием методов анализа, которые позволяют одновременно количественно измерять множество различных липидов. В настоящее время предложено использовать масс-спектрометрию с электрораспылением (ESI/MS) для количественного анализа соединений липидной природы (1-3). Нами разработан метод одновременного анализа PUFAs и эйкозаноидов в культуральных жидкостях и липидных экстрактах животных тканей с использованием ESI/MS (прибор Bruker Esquire 4000).

На первом этапе был определен растворитель, при использовании которого в спектре хорошо видны пики отрицательно заряженных молекулярных ионов [M-H]⁻, отсутствующие в спектре растворителя. Проведено сравнение влияния на конечный спектр ионов исходного состава среды культивирования клеток (RPMI-1640, DMEM, PBS) в разных режимах экстракции липидов. С использованием липидного экстракта печени мыши показано, что эйкозаноиды (PGE₂, PGD₂, PGA₂, 15d-PGJ₂) и различные PUFAs могут определяться: 1) в многокомпонентной смеси липидома клетки, 2) независимо друг от друга, 3) в наномолярном диапазоне концентраций, 4) при объеме исследуемой пробы от 30 мкл. Поскольку PUFAs представляют собой схожие по структуре молекулы, которые отличаются длиной углеводородной цепи и количеством ненасыщенных двойных связей, т.е. образуют гомологические ряды, проведена работа по подбору одного стандарта для определения концентрации близких по строению соединений. В качестве стандарта использовали линолевую (C18:2) и/или эйкозопентаеновую кислоты (C20:5), а также PGE₂. Построены калибровки арахидоновой (C20:4), докозгексаеновой (C22:6) и линолевой кислот (C18:2) в диапазоне концентраций от 50 до 600 нМ. Показано, что в исследуемом диапазоне концентраций калибровки линейны, и что тангенс угла наклона калибровочной прямой уменьшается с ростом количества углеродов и количества двойных связей: для C20:4 k = 0.01166, для C18:2 k = 0.03482, для C22:6 k = 0.00362 (при использовании в качестве стандарта эйкозопентаеновой кислоты). Показано, что данный метод может быть применим для одновременного анализа PUFAs и эйкозаноидов в биологических жидкостях. Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ (04-04-49357 и 07-04-01160).

1. Whitehouse C.M. et al. Anal. Chem., 1985, 57, 675.
2. Han X., Gross R.W., Anal. Chem., 2001, 295, 88.
3. Gross R.W., et al. Anal. Biochem., 2004, 330, 317.