

УДК 543.51.061:543.54.45:543.8

©Коллектив авторов

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛИПИДОМА ПЛАЗМЫ КРОВИ, КАК СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ И ОПТИМИЗАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ТЕРАПИИ

П.Г. Лохов^{1}, Д.Л. Маслов¹, Е.Е. Балашова¹, О.П. Трифонова¹,
Н.В. Медведева¹, Т.И. Торховская¹, О.М. Ипатова¹,
А.И. Арчаков¹, П.П. Малышев², В.В. Кухарчук², Е.А. Шестакова³,
М.В. Шестакова³, И.И. Дедов³*

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Москва, 119121, ул. Погодинская, 10; факс: +7 495 2450857;

эл. почта: lokhovpg@rambler.ru

²Российский кардиологический научно-производственный комплекс МЗ РФ, Москва

³Эндокринологический научный центр МЗ РФ, Москва

Рассмотрен новый метод анализа липидного состава крови, основанный на прямой масс-спектрометрии липофильной низкомолекулярной фракции плазмы крови. Данная методика позволяет количественно определять сотни различных видов липидов, что меняет существующее представление о диагностике липидных нарушений и связанных с ними заболеваний. Показаны универсальность и быстрота выполнения метода, существенно упрощающие его повсеместное применение. Обоснована возможность применения метода для диагностики атеросклероза, сахарного диабета, онкологических и других заболеваний. Детализация липидного состава плазмы крови на молекулярном уровне с помощью масс-спектрометрии позволяет оценить эффективность лечения заболеваний и оптимизировать лекарственную терапию сердечно-сосудистых заболеваний фосфолипидными препаратами.

Ключевые слова: масс-спектрометрия, плазма крови, диагностика, персонализация лечения, липидом, метаболом.

ВВЕДЕНИЕ

Диагностика и своевременное лечение липидных нарушений являются ключевым моментом профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний, являющихся основной причиной смерти людей [1]. Однако, существующая лабораторная диагностика липидных нарушений, несмотря на её важность, практически не менялась последние несколько десятилетий. Она обычно включает измерение общего холестерина, триглицеридов, холестерина липопротеинов высокой плотности, расчёт индекса атерогенности [2-3]. Подобная лабораторная диагностика малоинформативна и неспецифична, так как причиной изменения подобных лабораторных показателей могут быть различные заболевания, например

гормональные нарушения (сахарный диабет, гипо- и гипертиреоз, гиперпродукция глюкокортикоидов и т.д.), поражение печени, почек и т.д.

Методы, применяемые в клинике для исследования липидного состава крови пациента, также “морально” устарели. Так, одним из наиболее широко применяемых способов является электрофорез на поддерживающих средах-носителях – хроматографической бумаге, ацетатцеллюлозных мембранах, различных гелях, а также на комбинированных средах [4-5]. Эти методы длительны, недостаточно информативны ввиду низкой чувствительности, и, в случае использования гелей в качестве носителей, сложны и имеют низкую воспроизводимость.

* - адресат для переписки

АНАЛИЗ ЛИПИДОМА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ОПТИМИЗАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ТЕРАПИИ

Недостатком применяемых методов диагностики также является низкая избирательность в отношении детекции отдельных липидных биомаркеров заболеваний. Так, для детекции стероидных гормонов в крови используют иммуноферментный анализ (ELISA). Однако, данный метод позволяет определять лишь один гормон или его метаболит. Для определения иных метаболитов необходимо повторить измерения с другими, специфическими для них, антителами. Учитывая, что гормоны и их метаболиты имеют очень схожие структуры, это приводит к перекрёстным реакциям и некорректным результатам [6-7], затрудняющим правильное установление диагноза и проведение контроля лечения заболевания [8].

Таким образом, существующая лабораторная диагностика липидных и связанных с ними нарушений является устаревшей. Требуется повышение её эффективности за счёт лабораторных методов, более полно использующих диагностический потенциал липидов крови.

1. ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ЛИПИДОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ

Накопившиеся научные данные, касающиеся диагностического потенциала липидов крови, позволяют существенно повысить уровень лабораторной диагностики липидных нарушений. Липиды интегрированы практически во все процессы, протекающие в организме человека. Они выполняют структурные функции (формируют мембраны), обеспечивают окружение гидрофобным белкам, выполняют транспортную функцию для липофильных веществ, принимают активное участие в энергетическом обмене, выступая в роли источника энергии, являются гормонами и вторичными мессенджерами [9-11]. Широкое вовлечение липидов в биохимические процессы организма объясняет их связь с воздействующими на организм внешними факторами и протекающими в организме различного рода патологическими процессами. Это свойство липидов позволяет использовать их в качестве биомаркеров различных заболеваний. Так, было показано, что липиды могут служить специфическими биомаркерами таких заболеваний как ожирение [12], атеросклероз [13], гипертензия [14], сахарный диабет [15], различные виды рака [16-18]. Сведения о различных классах липидов, изменение состава которых может служить биомаркером заболеваний, представлены в таблице.

Таблица. Липиды как биомаркеры различных заболеваний.

Заболевание	Липидный биомаркер
Рак простаты	Фосфатидилхолины [19-20]
	Лизофосфатидилхолины [20]
	Фосфатидилэтаноламины [20]
	Сфингомиелины [20]
	Стероидные гормоны [17]
Рак молочной железы	Лизофосфатидная кислота [33-34]
	Фосфатидилинозитолы [33]
	Фосфатидилхолины [34]
	Лизофосфатидилхолины [34]
	Фосфатидилэтаноламины [35]
	Фосфатидилсерины [33]
	Сфингомиелины [34]
Рак яичников	Эстрогены [36]
	Лизофосфатидная кислота [39-42]
Рак печени	Лизофосфатидилхолины [43]
	Лизофосфатидная кислота [44]
	Лизофосфатидилхолины [37]
	Эфиры холестерина [37]
Рак лёгкого	Триглицериды [37]
	Свободные жирные кислоты [48]
Рак поджелудочной железы	Фосфолипиды [18]
	Свободные жирные кислоты [48]
Атеросклероз	Фосфатидилинозитол [51]
	Лизофосфатидная кислота [35, 57]
	Фосфатидилхолины [57]
	Фосфатидилэтаноламины [57]
	Сфингомиелины [58]
	Холестерин [59-60]
	Свободные жирные кислоты [61-63]
Сахарный диабет	Фосфатидилсерины [58]
	Фосфатидилхолины [21-22]
	Лизофосфатидилхолины [21, 23-24]
	Фосфатидилэтаноламины [22, 25]
	Сфингомиелины [21]
	Холестерин [26]
	Свободные жирные кислоты [27-29]
	Простагландины [30]
Эндометриоз яичников	Триглицериды [31]
	Фосфатидилхолины [32]
Гепатит	Сфингомиелины [32]
Цирроз печени	Фосфатидилхолины [37]
Гормональные нарушения	Сфингомиелины [37]
Панкреатит	Липидные гормоны (андрогены, эстрогены и т.д.) [38]
Хроническая почечная недостаточность	Свободные жирные кислоты [45]
Бронхиальная астма	Холестерин [46-47]
	Триглицериды [46-47]
Болезнь Альцгеймера	Лейкотриены [49]
	Простагландины [50]
Депрессивные состояния	Сфинголипиды [52-55]
	Стероиды [56]
	Фосфатидилхолины [64]
	Сфинголипиды [64]

К сожалению, отсутствие идентификации отдельных классов липидов в применяемых сейчас на практике методах диагностики не позволяет использовать весь диагностический потенциал, заложенный в липидном составе плазме крови. Однако развитие “омных” технологий, в особенности основанных на масс-спектрометрии, привело к появлению новых методов, позволяющих быстро и с высокой точностью исследовать молекулярный состав любого биологического образца [65-67]. Применение подобных методов позволяет решить большинство современных проблем диагностики, в частности, осуществить анализ плазмы крови с детализацией всего молекулярного разнообразия входящих в неё липидов [67-68].

2. ЛИПИДОМИКА ПЛАЗМЫ КРОВИ КАК СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ

Липидомика является разделом метаболомики, занимающимся количественным анализом всего разнообразия липидов (липидома) биологических объектов. Основным аналитическим методом в липидомике является масс-спектрометрия, детальное описание применения которой для исследования метаболома (и как одного из его составляющих – липидома) биологических объектов приведено в публикации Лохова и соавт. [68]. В научных исследованиях масс-спектрометрический анализ наиболее часто применяется в комплексе с высокоэффективной жидкостной хроматографией, позволяющей выполнить предварительное разделение веществ анализируемой пробы. Однако, в условиях

клинической диагностики наиболее перспективным является использование так называемого прямого масс-спектрометрического анализа (DIMS – direct infusion mass spectrometry), который предусматривает непосредственное внесение анализируемого биоматериала в источник ионизации масс-спектрометра без какого-либо предварительного разделения веществ биопробы хроматографическим или иным способом [69-70]. Прямой масс-спектрометрический анализ рассматривают как относительно простой в исполнении, быстрый, хорошо воспроизводимый и самый дешёвый среди других, основанных на масс-спектрометрии методов [68]. Отсутствие же разделения метаболитов хроматографией компенсируется применением современных масс-спектрометров с высоким разрешением измерения масс веществ. Успешное применение данной методики с целью анализа низкомолекулярных веществ (метаболома) различных биологических жидкостей было описано во многих работах [17, 70-74]. Типичный протокол применения прямой масс-спектрометрии для анализа липидома плазмы крови показан на рисунке 1.

Наиболее оптимальным способом ионизации низкомолекулярных веществ плазмы крови при прямом масс-спектрометрическом анализе является электроспрейный метод. Данный метод является “мягким” способом ионизации, что позволяет снизить нежелательную фрагментацию метаболитов в источнике ионизации и идеально подходит для анализа как полярных (сфинголипиды, глицерофосфолипиды), так и неполярных (триглицериды и стеролы)

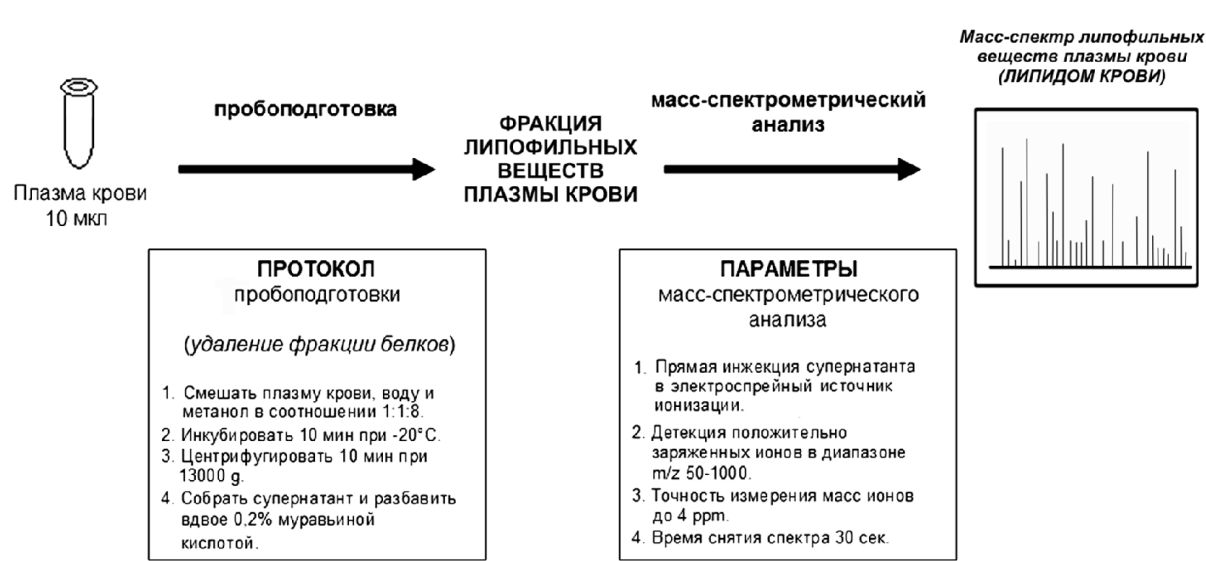


Рисунок 1. Схема проведения анализа липидома плазмы крови методом прямой масс-спектрометрии. Типичные масс-спектры липидома плазмы крови, полученные по указанной схеме, представлены на рисунке 2.

липидов [75-76]. Типичные масс-спектры прямого масс-спектрометрического профилирования образца плазмы крови, полученные в режиме детекции положительно и отрицательно заряженных ионов, приведены на рисунке 2. Анализ масс-спектров показал, что указанным способом детектируется до 4000 ионов, большая часть которых представляет собой различные классы липидов.

3. ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИИ ЛИПИДОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ

Динамический диапазон детекции масс веществ является лимитирующим фактором применения масс-спектрометрии для анализа липидов плазмы крови с использованием прямой инъекции. Это связано с самим принципом метода прямого ввода – одновременный ввод всех липофильных низкомолекулярных веществ крови без какого-либо их предварительного разделения. Типичный образец масс-спектра

низкомолекулярных веществ плазмы крови, с указанием динамического диапазона и лимита детекции концентраций веществ, представлен на рисунке 3. Как правило, наиболее интенсивными пиками в масс-спектре являются пики ионов фосфолипидов, общая концентрация которых в сыворотке крови $\sim 2,5 \times 10^{-3}$ М. При этом наиболее интенсивный пик масс-спектра соответствует молекулярным видам фосфатидилхолина (ФХ) с концентрацией $\sim 2,5 \times 10^{-5}$ М.

Согласно техническим характеристикам, динамический диапазон детекции масс веществ на современном масс-спектрометре составляет не менее пяти порядков (например, MicrOTOF-Q, “Bruker Daltonics”, Германия). Таким образом, предел детекции при прямой масс-спектрометрии низкомолекулярных веществ плазмы крови составляет $\sim 2,5 \times 10^{-10}$ М (см. рис. 3). Однако, фактический диапазон эффективного измерения концентраций липидов существенно меньше. Наиболее значимой характеристикой, снижающей динамический диапазон, является так называемый “химический шум” возникающий

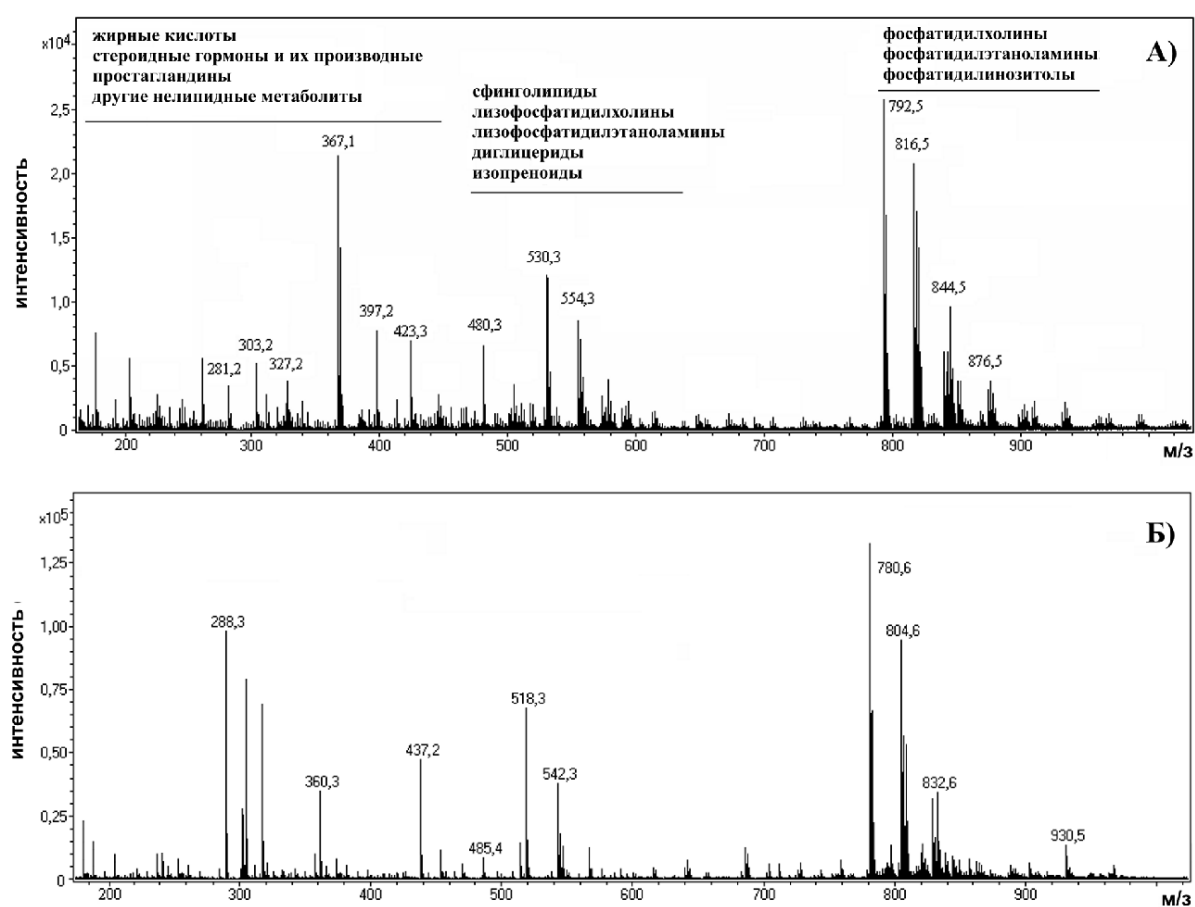


Рисунок 2. Масс-спектры липидома образца плазмы крови. Масс-спектры получены прямой инъекцией депротеинезированной плазмы крови в электроспрейный источник ионизации квадруполь-времяпролетного масс-спектрометра (MicrOTOF-Q, Bruker Daltonics). Спектры получены в режиме детекции положительно (А) и отрицательно (Б) заряженных ионов (адаптировано из [17]).

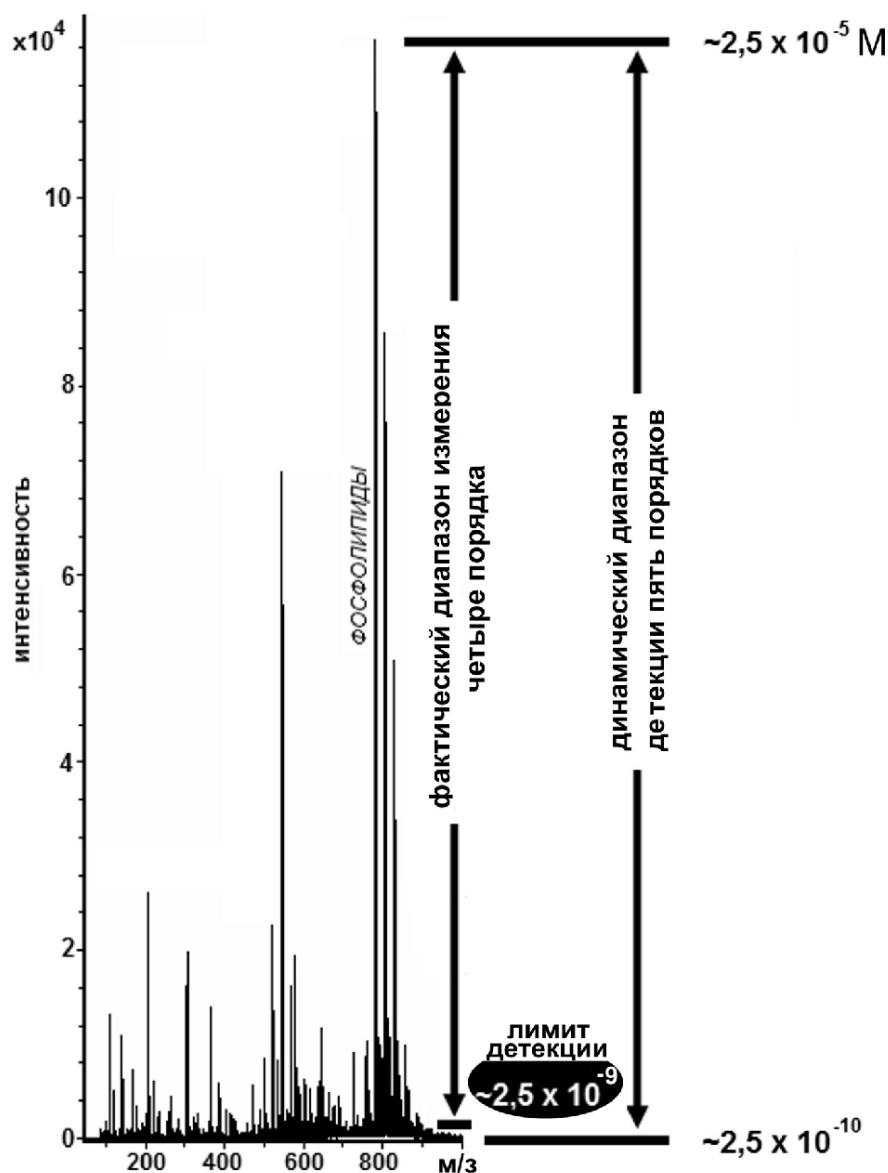


Рисунок 3. Динамический диапазон и лимит детекции концентраций липофильных веществ при прямой масс-спектрометрии плазмы крови. Масс-спектр липофильной фракции низкомолекулярных веществ плазмы крови (липидом плазмы крови) получен прямой инъекцией депротеинизированной метанолом плазмы крови в электроспрейный источник ионизации квадруполь-времяпролетного масс-спектрометра (MicrOTOF-Q, Bruker Daltonics). Диапазон детекции масс ионов веществ m/z 50-1000 (адаптировано из [77]).

в результате детектирования прибором сигналов от ионов, не являющихся объектами исследования; к ним относятся сигналы от ионов растворителя, различных примесей, попавших в исследуемый раствор, и т.д. Сигнал, имеющий значение интенсивности ниже показателя интенсивности “шума”, не может быть идентифицирован. Это уменьшает “рабочий” динамический диапазон примерно на 1 порядок. Поэтому теоретически все липиды в концентрации $>2,5 \times 10^{-9}$ М должны

регистрироваться прямой масс-спектрометрией. Указанный порог чувствительности прямой масс-спектрометрии согласуется с другими источниками данных и может незначительно варьировать в зависимости от используемого масс-спектрометра. Так, при поиске липидных биомаркеров рака простаты прямой масс-спектрометрией метаболитов плазмы крови были зарегистрированы липиды, концентрация которых снижалась до 1×10^{-9} М [20], что близко к пределу чувствительности метода.

Помимо предела чувствительности ещё одним немаловажным показателем, лимитирующим возможности прямой масс-спектрометрии в детекции липидов, является способность их к ионизации в электроспрейном источнике ионизации масс-спектрометра. Ионизация вещества, а следовательно, и уровень его сигнала, находятся в прямой зависимости от его способности присоединять (в случае фиксации сигнала в режиме детекции положительно заряженных ионов) или отдавать протон (в случае фиксации сигнала в режиме детекции отрицательно заряженных ионов). Например, свободный холестерин при концентрации $\sim 5 \times 10^{-3}$ М в масс-спектре липида плазмы крови имеет еле заметный пик, что объясняется его слабой способностью ионизироваться [78]. Поэтому, для его изучения часто применяют либо другие, более жёсткие методы ионизации, либо его предварительно модифицируют, образуя легко ионизируемые эфиры (сульфаты, ацетаты и т.д.). Фосфолипиды же, напротив, хорошо ионизируются и поэтому представлены в масс-спектре интенсивными пиками.

Рассматривая прямую масс-спектрометрию в качестве перспективного средства диагностики липидных нарушений, следует упомянуть точность измерений концентрации липидов. Техническая точность (technical precision; определяется путём многократного измерения одной и той же пробы) измерения липидов прямой масс-спектрометрии довольно высока. Так, коэффициент вариации (CV, coefficient of variation; выраженное в процентах отношение стандартного отклонения к среднему значению измеряемой величины) для технической точности не превышает 10%. Биологическая точность (biological precision; определяется измерением нескольких проб, полученных в одинаковых условиях от одного и того же пациента) значительно ниже и коэффициент вариации для нее достигает 25-40% для разных классов липидов [79]. Однако низкая биологическая точность измерения липидов является отражением вариабельности липида плазмы крови, поэтому напрямую не рассматривается как недостаток метода.

Таким образом, прямой масс-спектрометрический анализ липофильной низкомолекулярной фракции плазмы крови позволяет детектировать липидные биомаркеры для целого ряда заболеваний, включая такие социально значимые заболевания как сахарный диабет, атеросклероз, болезнь Альцгеймера, онкологические заболевания и т.д. [17, 70, 72, 80]. Технические характеристики прямого масс-спектрометрического анализа,

такие как воспроизводимость и чувствительность, позволяют рассматривать его как перспективный и пригодный для внедрения диагностический метод.

4. МОЛЕКУЛЯРНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ЛИПИДОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ КАК ОСНОВА СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Как было отмечено выше, существующая лабораторная диагностика на основе анализа липидного состава крови (холестерин, триглицериды и т.д.) является неспецифичной в отношении заболеваний. Однако детализация липидного состава крови с помощью масс-спектрометрического анализа до уровня отдельных классов липидов и их молекулярных видов делает её специфичной, раскрывая весь диагностический потенциал. Известно, что фосфолипиды различаются по входящим в их состав остаткам жирных кислот, которые, в свою очередь, имеют различный молекулярный вес. В результате чего, в масс-спектре определяют разнообразные молекулярные виды фосфолипидов, некоторые из которых специфичны для различных заболеваний. Так, было показано отсутствие в плазме больных ишемической болезнью сердца определённых молекулярных видов фосфолипидов, содержащих различные жирные кислоты: фосфатидилхолин (ФХ^{16:0/16:1}); фосфатидилэтаноламина (ФЭ^{20:1/20:4}); лизоформы фосфатидной кислоты (ЛизоФК^{16:1}). С другой стороны, было установлено присутствие фосфатидилглицерола (ФГ^{20:2/16:0}) и ЛизоФК^{18:3}, отсутствовавших в образцах плазмы крови здоровых людей [57]. При поиске липидных биомаркеров рака простаты был найден целый ряд фосфолипидных биомаркеров, таких как ЛизоФХ^{18:1}, ЛизоФХ^{20:4}, ФХ^{40:7}, совместное использование которых позволило диагностировать рак простаты с точностью 95,9% [20]. Другой показательный пример относится к диагностике рака лёгкого. Показано что у больных данным заболеванием в крови обнаруживаются специфические формы лизофосфатидилхолинов, в частности, ЛизоФХ^{16:0}, ЛизоФХ^{18:0}, ЛизоФХ^{18:1}, ЛизоФХ^{18:2} [18].

Одним из вариантов повышения эффективности диагностики является одновременное измерение липидных и иных биомаркеров [81-82]. Например, сочетанное определение в крови белкового биомаркера СА-125 и анализ молекулярных видов фосфолипидов крови позволило достичь точности диагностики рака яичника 82% [82].

5. МОНИТОРИНГ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ ПО ЛИПИДНОМУ СОСТАВУ (ЛИПИДОМУ) ПЛАЗМЫ КРОВИ

Масс-спектрометрический анализ липидома плазмы крови пригоден не только для диагностики различного рода заболеваний, но и позволяет осуществлять контроль их лечения. В данном случае контроль над процессом лечения заключается в мониторинге липидного состава плазмы крови, который возвращается к нормальному состоянию в случае реконвалесценции, либо продолжает изменяться в результате дальнейшего развития заболевания. Возможность подобного мониторинга была продемонстрирована в ряде научных исследований. В частности, было показано, что концентрация отдельных классов фосфолипидов четко коррелирует со степенью развития колоректального рака [83]. Такая же ситуация наблюдалась и в случае рака почки [84], а именно, было установлено, что уровень снижения ЛизоФХ крови пропорционален степени развития заболевания. В работе Sherubin и соавт. [85] показана взаимосвязь между снижением уровня общей фракции липидов, триглицеридов, липопротеинов высокой, низкой и очень низкой плотности и тяжестью рака ротовой полости. Очевидно, что подобные наблюдения дают основу для использования липидома плазмы крови для оценки степени развития заболеваний и мониторинга эффективности их лечения. Следует отметить, что в случае липидных нарушений (например, дислипидемий) изменение липидного состава крови является прямым показателем состояния больного и является основным критерием оценки эффективности лечения.

6. ОЦЕНКА АНТИАТЕРОГЕННЫХ СВОЙСТВ ПЛАЗМЫ КРОВИ ПРИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ТЕРАПИИ ФОСФОЛИПИДНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ

Основную роль в сохранении здоровой сердечно-сосудистой системы отводят липопротеинам высокой плотности (ЛПВП) плазмы крови. Согласно эпидемиологическим данным, низкий уровень этих липопротеинов является фактором развития сердечно-сосудистых заболеваний [86]. Однако, повышение концентрации ЛПВП в результате терапии не снижает риск возникновения подобных заболеваний [87], что указывает на важность не только уровня ЛПВП в крови, но и их

качественного состава [88]. Установлено, что существует обратная связь между степенью сосудистого поражения и способностью ЛПВП к обратному транспорту холестерина [89], что, в свою очередь, определяется наличием в составе ЛПВП веществ, способных принимать холестерин из клеток, в частности из макрофагов аорты [90].

По мнению многих исследователей, основная роль в способности ЛПВП принимать холестерин принадлежит входящим в их состав фосфолипидам [91-94]. Так, Pownall и Ehnholm [92] отмечают, что Апо А1 (основной апопротеин ЛВП) без фосфолипидов не может служить акцептором холестерина [93]. Более того, среди веществ, входящих в ЛПВП, только для фосфолипидов показана способность вызывать регрессию экспериментального атеросклероза [96]. Обогащение же ЛПВП фосфолипидами ведёт к повышению их холестерин-акцепторной активности [91, 92, 94].

Данное обстоятельство закономерно привело к появлению лекарственной терапии фосфолипидными препаратами, направленной на повышение холестерин-акцепторных свойств ЛПВП [88, 90]. Учитывая, что различные виды фосфолипидов имеют свои особенности биодоступности, времени жизни и тропности в отношении различных липопротеинов, то эффект, оказываемый препаратом на фосфолипидный состав ЛПВП, подлежит оценке. Существуют различные методы для подобной оценки, однако, по мнению авторов, прямая масс-спектрометрия в данном случае является методом выбора.

Способность прямой масс-спектрометрии фиксировать изменения липидного состава ЛПВП наглядно демонстрируется в модельном эксперименте, заключающемся в совместной инкубации эссенциальных фосфолипидов (ЭФ) и плазмы крови с последующим удалением не вступивших во взаимодействие ЭФ (см. методику в [95]), выделении ЛПВП и их прямом масс-спектрометрическом анализе. Типичные масс-спектры прямого масс-спектрометрического профилирования фосфолипидов ЛПВП до и после инкубации плазмы крови с ЭФ (препарат "Фосфоглив") представлены на рисунке 4Б и В, соответственно. Согласно представленным данным, масс-спектрометрический анализ чётко регистрирует изменение фосфолипидной фракции ЛПВП в результате инкубации плазмы крови с ЭФ. Как и ожидалось, различные молекулярные виды фосфолипидов демонстрируют различную тропность к ЛПВП (рис. 4Г, точки 1 и 2).

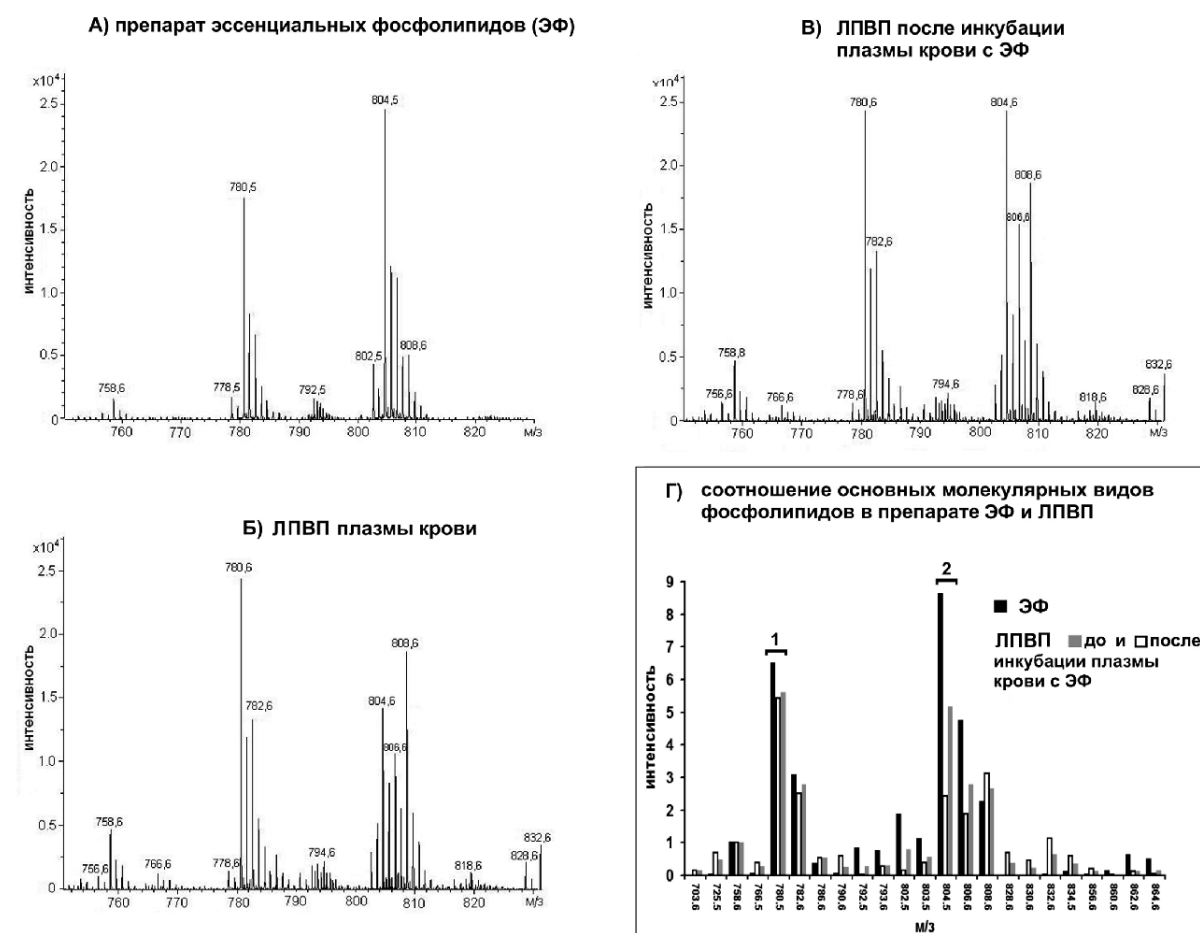


Рисунок 4. Изменение фосфолипидного состава ЛПВП после инкубации плазмы крови с препаратом эссенциальных фосфолипидов. А) Масс-спектр эссенциальных фосфолипидов, полученный инъекцией водно-метанольного раствора эссенциальных фосфолипидов (препарат “Фосфоглив”) в электроспрейный источник ионизации масс-спектрометра. Б) Масс-спектр фосфолипидной фракции ЛПВП до инкубации плазмы крови с препаратом эссенциальных фосфолипидов. В) Масс-спектр фосфолипидной фракции ЛПВП после инкубации плазмы крови с препаратом эссенциальных фосфолипидов. Г) Диаграмма соотношения основных молекулярных форм фосфолипидов в препарате эссенциальных фосфолипидов и в ЛПВП до и после инкубации плазмы крови с этим препаратом (протокол выделения ЛПВП ультрацентрифугированием после инкубации плазмы крови с эссенциальными фосфолипидами описан Krauss и соавт. [94]). Показан пример слабой тропности фосфолипида из препарата с массой 780,5 (1) к ЛПВП, который не приводит к изменению их фосфолипидного состава, и пример высокой тропности фосфолипида из препарата с массой 804,5 (2), который увеличивает вдвое содержание соответствующего фосфолипида в ЛПВП. Масс-спектры получены прямой инъекцией водно-метанольного раствора ЛПВП в электроспрейный источник ионизации квадруполь-времяпролетного масс-спектрометра (MicroTOF-Q, Bruker Daltonics). Диапазон детекции масс ионов веществ m/z 50-1000 (показан диапазон m/z 750-840, где зафиксирован сигнал фосфолипидов). Спектры получены в режиме детекции положительно заряженных ионов.

Таким образом, зная исходный фосфолипидный состав ЛВП пациента с сердечно-сосудистым заболеванием или риском его развития, а также фосфолипидный состав ЛПВП после его коррекции фосфолипидным препаратом, можно оценить, происходит ли коррекция холестерин-акцепторной функции ЛПВП плазмы крови пациента надлежащим образом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Прямой масс-спектрометрический анализ низкомолекулярной фракции плазмы крови является быстрым, относительно простым и эффективным способом анализа липидного состава (липидома) плазмы крови. Метод позволяет определять отдельные молекулярные виды липидов, выявляя, таким образом, липидные биомаркеры для целого ряда

заболеваний. Дополнительно метод позволяет характеризовать липидные нарушения на молекулярном уровне и оптимизировать лекарственную терапию фосфолипидными препаратами сердечно-сосудистых заболеваний. Ввиду того, что применение в клинической практике существующих лабораторных тестов не позволяет детализировать липидный состав крови и, таким образом, использовать весь диагностический потенциал крови, то можно предположить скорое внедрение липидомной диагностики в клиническую практику в качестве основного средства анализа липидного состава крови.

Публикация поддержана государственным заданием (дополнение темы №6 "Метаболическая диагностика нарушенной толерантности к глюкозе").

ЛИТЕРАТУРА

- Hoyert D.L., Xu J. (2012) Natl. Vital. Stat. Rep., **61**(6), 1-52.
- Graham I., Atar D., Borch-Johnsen K., Boysen G., Burell G., Cifkova R., Dallongeville J., De Backer G., Ebrahim S., Gjelsvik B., Herrmann-Lingen C., Hoes A., Humphries S., Knapton M., Perk J., Priori S.G., Pyörälä K., Reiner Z., Ruilope L., Sans-Menendez S., Scholte op Reimer W., Weissberg P., Wood D., Yarnell J., Zamorano J.L., Walma E., Fitzgerald T., Cooney M.T., Dudina A.; European Society of Cardiology (ESC) Committee for Practice Guidelines (CPG). (2007) Eur. Heart. J., **28**(19), 2375-2414.
- Perk J., De Backer G., Gohlke H., Graham I., Reiner Z., Verschuren M., Albus C., Benlian P., Boysen G., Cifkova R., Deaton C., Ebrahim S., Fisher M., Germano G., Hobbs R., Hoes A., Karadeniz S., Mezzani A., Prescott E., Ryden L., Scherer M., Syvännä M., Scholte op Reimer W.J., Vrints C., Wood D., Zamorano J.L., Zannad F.; European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR); ESC Committee for Practice Guidelines (CPG). (2012) Eur. Heart. J., **33**(13), 1635-1701. DOI: 10.1093/eurheartj/ehs092
- Диагностика и коррекция нарушений липидного обмена с целью профилактики и лечения атеросклероза. Российские рекомендации. (2004) Приложение к журналу Кардиоваскулярная терапия и профилактика.
- Ahsan S.K. (1997) Indian J. Med. Sci., **51**(11), 420-425.
- Ismail A.A., Walker P.L., Cawood M.L., Barth J.H. (2002) Ann. Clin. Biochem., **39**(4), 366-373. DOI: 10.1258/000456302760042128
- Stanczyk F.Z., Cho M.M., Endres D.B., Morrison J.L., Patel S., Paulson R.J. (2003) Steroids., **68**(14), 1173-1178. DOI: 10.1016/j.steroids.2003.08.012
- Penning T.M., Lee S.H., Jin Y., Gutierrez A., Blair I.A. (2010) J. Steroid. Biochem. Mol. Biol., **121**(3-5), 546-555. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2010.01.005
- Oresic M., Hänninen V.A., Vidal-Puig A. (2008) Trends Biotechnol., **26**(12), 647-652. DOI: 10.1016/j.tibtech.2008.09.001
- Murphy S.A., Nicolaou A. (2013) Mol. Nutr. Food Res., **57**(8), 1336-1346. DOI: 10.1002/mnfr.201200863
- Торховская Т.И., Халилов Е.М., Коротаева А.А. (2007) Бюлл. экспер. биол. мед., **144**(3), 408-412.
- Pietiläinen K.H., Sysi-Aho M., Rissanen A., Seppänen-Laakso T., Yki-Järvinen H., Kaprio J., Oresic M. (2007) PLoS One, **2**(2), e218. DOI: 10.1371/journal.pone.0000218
- Ekroos K., Jänis M., Tarasov K., Hurme R., Laaksonen R. (2010) Curr. Atheroscler. Rep., **12**(4), 273-281. DOI: 10.1007/s11883-010-0110-y
- Graessler J., Schwudke D., Schwarz P.E., Herzog R., Shevchenko A., Bornstein S.R. (2009) PLoS One, **4**(7), e6261. DOI: 10.1371/journal.pone.0006261
- Han X., Yang J., Yang K., Zhao Z., Abendschein D.R., Gross R.W. (2007) Biochemistry, **46**(21), 6417-6428. DOI: 10.1021/bi7004015
- Görke R., Meyer-Bäse A., Wagner D., He H., Emmett M.R., Conrad C.A. (2010) BMC Syst. Biol., **4**, 126. DOI: 10.1186/1752-0509-4-126
- Lokhov P., Dashtiev M., Moshkovskii S., Archakov A. (2010) Metabolomics, **6**(1), 156-163. DOI: 10.1007/s11306-009-0187-x
- Dong J., Cai X., Zhao L., Xue X., Zou L., Zhang X. (2010) Metabolomics, **6**, 478-488. DOI: 10.1007/s11306-010-0215-x
- Min H.K., Lim S., Chung B.C., Moon M.H. (2011) Anal. Bioanal. Chem., **399**(2), 823-830. DOI: 10.1007/s00216-010-4290-7
- Zhou X., Mao J., Ai J., Deng Y., Roth M.R., Pound C., Henegar J., Welti R., Bigler S.A. (2012) PLoS One, **7**(11), e48889. DOI: 10.1371/journal.pone.0048889
- Floegel A., Stefan N., Yu Z., Mühlenbruch K., Drogan D., Joost H.G., Fritsche A., Häring H.U., Hrabé de Angelis M., Peters A., Roden M., Prehn C., Wang-Sattler R., Illig T., Schulze M.B., Adamski J., Boeing H., Pischon T. (2013) Diabetes, **62**, 639-648. DOI: 10.2337/db12-0495
- Shui G., Stebbins J.W., Lam B.D., Cheong W.F., Lam S.M., Gregoire F., Kusonoki J., Wenk M.R. (2011) Plos One, **6**, e19731. DOI: 10.1371/journal.pone.0019731
- Ha C.Y., Kim J.Y., Paik J.K., Kim O.Y., Paik Y.H., Lee E.J., Lee J.H. (2012) Clin. Endocrinol. (Oxf.), **76**(5), 674-682. DOI: 10.1111/j.1365-2265.2011.04244.x
- Wang-Sattler R., Yu Z., Herder C., Messias A.C., Floegel A., He Y., Heim K., Campillos M., Holzapfel C., Thorand B., Grallert H., Xu T., Bader E., Huth C., Mittelstrass K., Döring A., Meisinger C., Gieger C., Prehn C., Roemisch-Margl W., Carstensen M., Xie L., Yamanaka-Okumura H., Xing G., Ceglarek U., Thiery J., Giani G., Lickert H., Lin X., Li Y., Boeing H., Joost H., Hrabé de Angelis M., Rathmann W., Suhre K., Prokisch H., Peters A., Meitinger T., Roden M., Wichmann E., Pischon T., Adamski J., Illig T. (2012) Mol. Syst. Biol., **8**, 615. DOI: 10.1038/msb.2012.43

25. Nakagawa K., Oak J.H., Higuchi O., Tsuzuki T., Oikawa S., Otani H., Mune M., Cai H., Miyazawa T. (2005) *J. Lipid Res.*, **46**(11), 2514-2524. DOI: 10.1194/jlr.D500025-JLR200
26. al-Muhtaseb N., al-Yusef A.R., Bajaj J.S. (1991) *Diabet Med.*, **8**(8), 732-737.
27. Shelgikar K.M., Naik S.S., Khopkar M., Bhat D.S., Raut K.N., Joglekar C.V., Gerard M.E., Yajnik C.S. (1997) *Diabet Med.*, **14**(9), 757-761.
28. Berrish T.S., Elliott C., Cooper B.G., Reed J.W., Orskov H., Alberti K.G., Walker M. (1993) *Diabet Med.*, **10**(2), 152-158.
29. Xu W., Zhang L., Huang Y., Yang Q., Xiao H., Zhang D. (2012) *J. Ethnopharmacol.*, **143**(2), 463-468. DOI: 10.1016/j.jep.2012.06.045
30. Gopaul N.K., Anggård E.E., Mallet A.I., Betteridge D.J., Wolff S.P., Nourooz-Zadeh J. (1995) *FEBS Lett.*, **368**(2), 225-229
31. Xu W., Zhang L., Huang Y., Yang Q., Xiao H., Zhang D. (2012) *Se Pu*, **30**(9), 864-869.
32. Vouk K., Hevir N., Ribić-Pucelj M., Haarpaintner G., Scherb H., Osredkar J., Müller G., Prehn C., Rižner T.L., Adamski J. (2012) *Hum. Reprod.*, **27**(10), 2955-2965. DOI: 10.1093/humrep/des152
33. Min H.K., Kong G., Moon M.H. (2010) *Anal. Bioanal. Chem.*, **396**(3), 1273-1280. DOI: 10.1007/s00216-009-3292-9
34. Qiu Y., Zhou B., Su M., Baxter S., Zheng X., Zhao X., Yen Y., Jia W. (2013) *Int. J. Mol. Sci.*, **14**(4), 8047-8061. DOI: 10.3390/ijms14048047
35. Dohi T., Miyauchi K., Ohkawa R., Nakamura K., Kurano M., Kishimoto T., Yanagisawa N., Ogita M., Miyazaki T., Nishino A., Yaginuma K., Tamura H., Kojima T., Yokoyama K., Kurata T., Shimada K., Daida H., Yatomi Y. (2013) *Atherosclerosis*, **229**(1), 192-197. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.03.038
36. Xu X., Roman J.M., Issaq H.J., Keefer L.K., Veenstra T.D., Ziegler R.G. (2007) *Anal. Chem.*, **79**(20), 7813-7821. DOI: 10.1021/ac070494j
37. Chen S., Yin P., Zhao X., Xing W., Hu C., Zhou L., Xu G. (2013) *Electrophoresis*, **34**(19), 2848-2856. DOI: 10.1002/elps.201200629
38. Honour J.W. (2009) *J. Clin. Res. Endocrinol.*, **1**(5), 209-226. DOI: 10.4274/jcrpe.v1i5.209
39. Bese T., Barbaros M., Baykara E., Guralp O., Cengiz S., Demirkiran F., Sanioglu C., Arvas M. (2010) *J. Gynecol. Oncol.*, **21**(4), 248-254. DOI: 10.3802/jgo.2010.21.4.248
40. Sedláková I., Vávrová J., Tošner J., Hanousek L. (2011) *Tumour Biol.*, **32**(2), 311-316. DOI: 10.1007/s13277-010-0123-8
41. Pua T.L., Wang F.Q., Fishman D.A. (2009) *Future Oncol.*, **5**(10), 1659-1673. DOI: 10.2217/fon.09.120
42. Sedláková I., Vávrová J., Tošner J., Hanousek L. (2008) *Eur. J. Gynaecol. Oncol.*, **29**(5), 511-514.
43. Okita M., Gaudette D.C., Mills G.B., Holub B. (1997) *Int. J. Cancer.*, **71**(1), 31-34.
44. Ikeda H., Enooku K., Ohkawa R., Koike K., Yatomi Y. (2013) *Hepatology*, **57**(1), 417-418. DOI: 10.1002/hep.25886
45. Marosvolgyi T., Horvath G., Dittrich A., Cseh J., Lelovics Z., Szabo E., Decsi T., Figler M. (2010) *Pancreatol.*, **10**(5), 580-585. DOI: 10.1159/000289466
46. Cabarkapa V., Djerić M., Stosić Z., Sakac V., Zagorka L.C., Vucković B. (2012) *Vojnosanit Pregl.*, **69**(11), 961-966.
47. Kaysen G.A. (1994) *Blood Purif.*, **12**(1), 60-67.
48. Zuidgeest-van Leeuwen S.D., van der Heijden M.S., Rietveld T., van den Berg J.W., Tilanus H.W., Burgers J.A., Wilson J.H., Dagnelie P.C. (2002) *Clin. Nutr.*, **21**(3), 225-230. DOI: 10.1054/clnu.2001.0530
49. Syslová K., Böhmová A., Demirbağ E., Šimková K., Kuzma M., Pelclová D., Sedlák V., Čáp P., Martásek P., Kačer P. (2013) *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **81-82**, 108-117. DOI: 10.1016/j.jpba.2013.03.026
50. Bochenek G., Nizankowska E., Gielicz A., Swierczyńska M., Szczeklik A. (2004) *Thorax.*, **59**(6), 459-464. DOI: 10.1136/thx.2003.013573
51. Beger R.D., Schnackenberg L.K., Holland R.D., Li D., Dragan Y. (2006) *Metabolomics*, **2**(3), 125-134.
52. Алесенко А.В. (2013) *Биомед. химия*, **59**(1), 25-50.
53. Mielke M.M., Lyketsos C.G. (2010) *Neuromolecular Med.*, **12**(4), 331-340. DOI: 10.1007/s12017-010-8121-y
54. Mielke M.M., Haughey N.J., Ratnam Bandaru V.V., Schech S., Carrick R., Carlson M.C., Mori S., Miller M.I., Ceritoglu C., Brown T., Albert M., Lyketsos C.G. (2010) *Alzheimers Dement.*, **6**(5), 378-385. DOI: 10.1016/j.jalz.2010.03.014
55. Han X., Rozen S., Boyle S.H., Hellegers C., Cheng H., Burke J.R., Welsh-Bohmer K.A., Doraiswamy P.M., Kaddurah-Daouk R. (2011) *PLoS One.*, **6**(7), e21643. DOI: 10.1371/journal.pone.0021643
56. Smith C.D., Wekstein D.R., Markesbery W.R., Frye C.A. (2006) *Psychopharmacology (Berl.)*, **186**(3), 481-548. DOI: 10.1007/s00213-005-0186-1
57. Byeon S.K., Lee J.Y., Lim S., Choi D., Moon M.H. (2012) *J. Chromatogr. A*, **1270**, 246-253.
58. Thomas A., Déglon J., Lenglet S., Mach F., Mangin P., Wolfender J.L., Steffens S., Staub C. (2010) *Anal. Chem.*, **82**(15), 6687-6694.
59. Nigg C., Gutzwiller F. (1995) *Schweiz Med. Wochenschr.*, **125**(8), 355-360.
60. Tchai B.S. (1993) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **676**, 279-288. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1993.tb38741.x
61. Lafontan M. (2013) *Ann. Pharm. Fr.*, **71**(1), 13-26. DOI: 10.1016/j.pharma.2012.07.008
62. Imamura F., Lemaitre R.N., King I.B., Song X., Lichtenstein A.H., Matthan N.R., Herrington D.M., Siscovick D.S., Mozaffarian D. (2012) *Am. J. Clin. Nutr.*, **96**(6), 1252-1261. DOI: 10.3945/ajcn.112.039990
63. Shah S.H., Sun J.L., Stevens R.D., Bain J.R., Muehlbauer M.J., Pieper K.S., Haynes C., Hauser E.R., Kraus W.E., Granger C.B., Newgard C.B., Califf R.M., Newby L.K. (2012) *Am. Heart J.*, **163**(5), 844-850. DOI: 10.1016/j.ahj.2012.02.005
64. Demirkan A., Isaacs A., Ugocsai P., Liebisch G., Struchalin M., Rudan I., Wilson J.F., Pramstaller P.P., Gyllenstein U., Campbell H., Schmitz G., Oostra B.A., van Duijn C.M. (2013) *J. Psychiatr. Res.*, **47**(3), 357-362. DOI: 10.1016/j.jpsychires.2012.11.001

65. Schneider M.V., Orchard S. (2011) *Methods Mol. Biol.*, **719**, 3-30. DOI: 10.1007/978-1-61779-027-0_1
66. Bogyo M., Rudd P.M. (2013) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **17**(1), 1-3. DOI: 10.1016/j.cbpa.2013.01.005
67. Sung J., Wang Y., Chandrasekaran S., Witten D.M., Price N.D. (2012) *Biotechnol. J.*, **7**(8), 946-957. DOI: 10.1002/biot.201100305
68. Лохов П.Г., Арчаков А.И. (2008) *Биомед. химия*, **54**(5), 497-511.
69. Dettmer K., Aronov P.A., Hammock B.D. (2007) *Mass Spectrom. Rev.*, **26**(1), 51-78. DOI: 10.1002/mas.20108
70. Lokhov P.G., Kharybin O.N., Archakov A.I. (2012) *Int. J. Mass Spectrom.*, **309**, 200-205.
71. Erve J.C., Demaio W., Talaat R.E. (2008) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **22**(19), 3015-3026. DOI: 10.1002/rcm.3702
72. Lokhov P.G., Trifonova O.P., Maslov D.L., Archakov A.I. (2013) *Eur. J. Cancer Prev.*, **22**(4), 335-341. DOI: 10.1097/CEJ.0b013e32835b3898
73. Lin L., Yu Q., Yan X., Hang W., Zheng J., Xing J., Huang B. (2010) *Analyst*, **135**(11), 2970-2978. DOI: 10.1039/c0an00265h
74. Koulman A., Tapper B.A., Fraser K., Cao M., Lane G.A., Rasmussen S. (2007) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **21**(3), 421-428.
75. Han X., Gross R.W. (2005) *Mass Spectrom. Rev.*, **24**(3), 367-412.
76. Isaac G. (2011) *Methods Mol. Biol.*, **708**, 259-275. DOI: 10.1007/978-1-61737-985-7_16
77. Лохов П.Г., Маслов Д.Л., Трифонова О.П., Балашова Е.Е., Арчаков А.И. (2014) *Биомед. химия*, **60**(2), 201-216.
78. Liebis G., Binder M., Schifferer R., Langmann T., Schulz B., Schmitz G. (2006) *Biochim. Biophys. Acta.*, **1761**(1), 121-128.
79. Crews B., Wikoff W.R., Patti G.J., Woo H.K., Kalisiak E., Heideker J., Siuzdak G. (2009) *Anal. Chem.*, **81**(20), 8538-8544. DOI: 10.1021/ac9014947
80. Lokhov P.G., Trifonova O.P., Maslov D.L., Balashova E.E., Archakov A.I., Shestakova E.A., Shestakova M.V., Dedov I.I. (2014) *PLoS One*, **9**(9):e105343. DOI: 10.1371/journal.pone.0105343. eCollection 2014.
81. Fernandis A.Z., Wenk M.R. (2009) *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **877**(26), 2830-2835. DOI: 10.1016/j.jchromb.2009.06.015
82. Shan L., Chen Y.A., Davis L., Han G., Zhu W., Molina A.D., Arango H., LaPolla J.P., Hoffman M.S., Sellers T., Kirby T., Nicosia S.V., Sutphen R. (2012) *PLoS One*, **7**(10), e46846. DOI: 10.1371/journal.pone.0046846
83. Zhao Z., Xiao Y., Elson P., Tan H., Plummer S.J., Berk M., Aung P.P., Lavery I.C., Achkar J.P., Li L., Casey G., Xu Y. (2007) *J. Clin. Oncol.*, **25**(19), 2696-2701.
84. Süllentrop F., Moka D., Neubauer S., Haupt G., Engelmann U., Hahn J., Schicha H. (2002) *NMR Biomed.*, **15**(1), 60-68.
85. Sherubin E.J., Kannan K.S., Kumar D.N., Joseph I. (2013) *J. Oral. Maxillofac. Pathol.*, **17**(1), 4-9. DOI: 10.4103/0973-029X.110685
86. Rosenson R.S., Brewer H.B. Jr, Davidson W.S., Fayad Z.A., Fuster V., Goldstein J., Hellerstein M., Jiang X.C., Phillips M.C., Rader D.J., Remaley A.T., Rothblat G.H., Tall A.R., Yvan-Charvet L. (2012) *Circulation*, **125**(15), 1905-1919. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.066589
87. Lüscher T.F., von Eckardstein A., Simic B. (2012) *Curr. Vasc. Pharmacol.*, **10**(6), 720-724.
88. Pirillo A., Norata G.D., Catapano A.L. (2013) *Curr. Pharm. Des.*, **19**(21), 3841-3857.
89. Khera A.V., Rader D.J. (2010) *Curr. Atheroscler. Rep.*, **12**(1), 73-81. DOI: 10.1007/s11883-009-0080-0
90. Soran H., Hama S., Yadav R., Durrington P.N. (2012) *Curr. Opin. Lipidol.*, **23**(4), 353-366. DOI: 10.1097/MOL.0b013e328355ca25
91. Pownall H.J. (2006) *Biochemistry*, **45**(38), 11514-11522.
92. Fournier N., de la Llera Moya M., Burkey B.F., Swaney J.B., Paterniti J. Jr, Moatti N., Atger V., Rothblat G.H. (1996) *J. Lipid Res.*, **37**(8), 1704-1711.
93. Pownall H.J., Ehnholm C. (2005) *Curr. Opin. Lipidol.*, **16**(3), 265-268.
94. Tchoua U., Gillard B.K., Pownall H.J. (2010) *Atherosclerosis*, **209**(2), 430-435. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.10.002
95. Krauss R.M., Burke D.J. (1982) *J. Lipid. Res.*, **23**(1), 97-104.
96. Day C. (1975) *Artery*, **1**, 1-2.

Поступила: 01. 09. 2014.

**MASS SPECTROMETRY ANALYSIS OF BLOOD PLASMA LIPIDOME AS METHOD
OF DISEASE DIAGNOSTICS, EVALUATION OF EFFECTIVENESS AND OPTIMIZATION
OF DRUG THERAPY**

*P.G. Lokhov¹, D.L. Maslov¹, E.E. Balashova¹, O.P. Trifonova¹, N.V. Medvedeva¹,
T.I. Torkhovskaya¹, O.M. Ipatova¹, A.I. Archakov¹, P.P. Malyshev², V.V. Kukharchuk²,
E.A. Shestakova³, M.V. Shestakova³, I.I. Dedov³*

¹Institute of Biomedical Chemistry,

10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; fax: +7 495 2450857; e-mail: lokhovpg@rambler.ru

²Russian Cardiology Research and Production Complex, Moscow, Russia

³Endocrinology Research Centre, Moscow, Russia

A new method for the analysis of blood lipid based on direct mass spectrometry of lipophilic low molecular weight fraction of blood plasma has been considered. Such technique allows quantification of hundreds of various types of lipids and this changes existing concepts on diagnostics of lipid disorders and related diseases. The versatility and quickness of the method significantly simplify its wide use. This method is applicable for diagnostics of atherosclerosis, diabetes, cancer and other diseases. Detailization of plasma lipid composition at the molecular level by means of mass spectrometry allows to assess the effectiveness of therapy and to optimize the drug treatment of cardiovascular diseases by phospholipid preparations.

Key words: mass spectrometry, blood plasma, diagnostics, personalization of therapy, lipidome, metabolome.