

УДК 577.25

ОПРЕДЕЛЕНИЕ 2-ОКСОКИСЛОТ В ЭКСТРАКТАХ МОЗГА КРЫС С ПОМОЩЬЮ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

© 2022 В.Н. Ташлицкий¹, А.В. Артюхов^{2,3}, Н.В. Федорова², М.А. Суконников¹, А.Л. Ксенофонтов^{2*}, В.И. Буник^{2,3,4}, Л.А. Баратова^{2*}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991 Москва, Россия

² Институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия; электронная почта: baratova@belozersky.msu.ru, ksenofon@belozersky.msu.ru

³ Сеченовский университет, кафедра биохимии, 119991 Москва, Россия

⁴ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 17.03.2022

После доработки 20.03.2022

Принята к публикации 20.03.2022

2-Оксокислоты принимают участие в ряде важнейших метаболических процессов, в связи с этим они могут быть использованы как биомаркеры для диагностики болезней человека. С учетом опубликованных методов и известных проблем определения содержания 2-оксокислот в тканях млекопитающих нами был разработан оптимизированный метод высокоэффективной жидкостной хроматографии 2,4-динитрофенилгидразиновых производных 2-оксокислот. Ввиду своей химической устойчивости 2,4-динитрофенилгидразиновые производные 2-оксокислот обладают рядом преимуществ по сравнению с ранее использовавшимися производными фенилгидразина. В работе определено содержание пирувата, глиоксилата, 2-оксоглутарата, 2-оксомалоната и 4-метилтио-2-оксобутирата в метанол-уксусных экстрактах мозга крыс, обсуждены вопросы пробоподготовки при проведении анализов экстрактов мозга млекопитающих. Представленные валидационные характеристики метода демонстрируют, что предел количественного определения достигает 2 нмоль/г ткани для каждой из пяти 2-оксокислот. Разработанный метод позволяет исследовать тонкие изменения содержания 2-оксокислот как (пато)физиологических индикаторов метаболизма в тканях млекопитающих.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ВЭЖХ, 2-оксокислоты, экстракты мозга крыс, 2,4-динитрофенилгидразин, валидация метода.

DOI: 10.31857/S0320972522040030, **EDN:** AQNHJK

ВВЕДЕНИЕ

2-Оксокислоты (или α -кетокислоты) представляют собой органические соединения, содержащие в α -положении по отношению к карбоксильной группе карбонильную группу. Располагаясь на пересечении различных метаболических путей, 2-оксокислоты, в частности пируват (Pyr), 2-оксоглутарат (2-OG) и оксалоацетат, формируют узлы метаболических сетей, служа-

щих для взаимодействия между гликолизом, циклом Кребса, глюконеогенезом и распадом отдельных аминокислот [1]. Другие 2-оксокислоты участвуют в метаболизме отдельных аминокислот в качестве интермедиатов (2-оксоизовалерат, 2-оксоизокапроат, 2-оксо-3-метилвалерат, 2-оксоадипат, 2-оксобутират и 4-метилтио-2-оксобутират (МТОВ)) или побочных продуктов (фенилпируват, глиоксилат (Glx)). В связи с этим они могут служить прогностическими биомаркерами в диагностике и при анализе протекания ряда болезней человека. Так, недостаточное или избыточное содержание 2-оксокислот в организме обнаруживалось, например, при гиповитаминозе витаминов группы В, гипоксии, раке, голодании, диабете, различных наследственных заболеваниях, в моделях нейродегенеративных заболеваний и при других нарушениях [2–8].

Принятые сокращения: 2-ОМ – 2-оксомалонат; 2-ОГ – 2-оксоглутарат; ОФ ВЭЖХ – обращенно-фазная высокоэффективная жидкостная хроматография; DNPН – 2,4-динитрофенилгидразин; Glx – глиоксилат; LOD – нижний предел детекции; LOQ – нижний предел количественного определения; МТОВ – 4-метилтио-2-оксобутират; Pyr – пируват.

* Адресат для корреспонденции.

Разрабатываемые в последние годы высокопроизводительные масс-спектрометрические методы LC-MS/MS/MS для анализа низкомолекулярных метаболитов позволяют проводить оценку нескольких сотен соединений (так называемых метаболомов) для исследования ответов на различные стрессы, а также изучать проявления различных заболеваний, таких как рак, диабет и нейродегенерация. Так, при изучении течения болезни Хантингтона на модели *Drosophila melanogaster* изменения в уровнях Pуг и 2-OG были идентифицированы на симптоматической стадии заболевания, что, ввиду узловой роли этих 2-оксокислот, свидетельствует о серьезных метаболических изменениях в ходе развития болезни [7]. Описанные в литературе изменения уровня 2-OG в плазме крови при голодании трактуются авторами как имеющие сигнальное значение, поскольку данное соединение способно служить модулятором транскрипции. Так, 2-OG активирует 2-OG-зависимые пролилгидроксилазы, за счет чего дестабилизируются транскрипционные факторы, в результате чего при продолжительном голодании активируются процессы как глобального катаболизма, так и анаболизма [8]. В последнее время отдельные 2-оксокислоты также интенсивно изучаются в связи с онкологическими заболеваниями, поскольку могут регулировать экспрессию генов, в частности, эпигенетически, влияя на модификации ДНК и гистонов. Таким образом, данные об изменениях в содержании 2-оксокислот в клетках могут свидетельствовать и о возможных эпигенетических модификациях [9].

Большинство методов количественного определения 2-оксокислот включает в себя использование аналитической ВЭЖХ совместно с дериватизацией анализируемых соединений. Так, использование в качестве дериватирующего агента фенилгидразина позволило детектировать полученные производные фенилгидразона спектрофотометрически для количественного определения Glx, Pуг и 2-OG в моче [10, 11]. При этом вне хроматографических методов одним из наиболее ранних дериватирующих агентов для количественной детекции 2-оксокислот можно считать его производное 2,4-динитрофенилгидразин (DNPH) [12]. Ввиду того, что DNPH-производные разных 2-оксокислот имеют разные максимумы поглощения в диапазоне 380–520 нм, данный метод предлагался к использованию, в частности, для определения активностей трансаминаз [13]. В дальнейшем, благодаря высокой стабильности образующихся производных, дериватизация DNPH с последующей ВЭЖХ и спектрофотометрической детекцией дериватов использовалась для

количественного определения различных альдегидов и кетонов [14, 15]. В случае 2-оксокислот хроматографическое разделение их DNPH-производных использовалось лишь для сравнения чувствительности с другим дериватирующим агентом, *o*-фенилендиамином [16].

Серьезный недостаток ранних работ, описывающих применение разных агентов, дериватирующих 2-оксокислоты, состоял в том, что при узком спектре определяемых 2-оксокислот все они были нацелены на решение чисто практических задач. При этом валидированных методов количественного определения одновременно нескольких биологически важных 2-оксокислот в одном опыте просто не существовало. Кроме того, несмотря на успешное использование *o*-фенилендиамина в качестве дериватирующего агента [17], для эффективного ВЭЖХ анализа 2-оксокислот в моче и плазме крови требовалась предварительная очистка 2-оксокислот на колонке с гидразидным гелем и экстракция их дериватизованных производных этилацетатом.

В более поздних работах уже приводятся некоторые валидационные параметры, такие как предел чувствительности (LOD), предел количественного определения (LOQ) и соотношение сигнал : шум. В случае использования *o*-фенилендиамина в качестве дериватирующего агента при флюориметрической детекции минимальное значение LOQ составило 1,2 мкМ [18, 19] и LOD – порядка 0,25 [11] и 0,39 мкМ [19]. При использовании в качестве дериватирующего агента 4,5-метилendioкси-1,2-диаминобензола был показан более низкий предел чувствительности – 0,014 мкМ (сигнал : шум = 5 : 1) [6]. При использовании DNPH в качестве дериватирующего агента и спектрофотометрической детекции продукта дериватизации проводилась валидация методики определения формальдегида в кормах и пище животных [15], при которой значение чувствительности достигало ~ 40 мкМ, но не для 2-оксокислот.

В большей части работ, где использованы хроматографические методы определения 2-оксокислот, применяется обращенно-фазная (ОФ) ВЭЖХ. При этом во всех работах без исключения проведению непосредственного анализа предшествует стадия дериватизации. Среди возможных дериватирующих реагентов наиболее используемыми оказались фенилгидразин и его 2,4-динитро-производное (спектрофотометрическая детекция) либо *o*-фенилендиамин и его 4,5-метилendioкси-производное (флюориметрическая детекция).

В данной работе нами предложен метод ОФ ВЭЖХ со спектрофотометрической детек-

цией с предварительной химической дериватизацией DNPН 2-оксокислот в экстрактах головного мозга животных. Среди анализируемых 2-оксокислот Glx, 2-OG и Pуг ранее определялись в крови и моче животных и человека, в то время как данные по ВЭЖХ определению 2-оксомалоната (2-ОМ) и МТОВ в животных объектах вовсе отсутствуют. Аналогично методу количественного определения формальдегида [15], реакции DNPН с 2-оксокислотами также дают соединения (гидразоны), поглощающие в видимом свете (380–520 нм). Применение этой методики позволило бы увеличить чувствительность определения по сравнению с УФ-детекцией (324 нм) этих производных при дериватизации с фенилгидразином [10, 11]. Более того, DNPН-производные карбонильных соединений имеют высокую химическую стабильность [15] в отличие от разрушающихся в течение нескольких дней производных фенилгидразина, что особенно выражено для глиоксилата [11]. Нами получены валидационные характеристики метода, которые показывают, что предел количественного определения достигает 1 мкМ для каждой из пяти 2-оксокислот. Метод был использован для оценки содержания 2-оксокислот в метанол-уксусных экстрактах мозга крыс, что позволяет расширить область применения ВЭЖХ определения 2-оксокислот не только для биологических жидкостей, но и в экстрактах тканей животных. Мы полагаем, что тонкий анализ содержания 2-оксокислот, являющихся низкомолекулярными индикаторами отдельных узлов метаболизма, позволит прогнозировать пути продукции энергии из углеводов и аминокислот в дополнении к ранее разработанным методам определения свободных аминокислот в гомогенатах мозга [20–22].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все использованные реактивы обладали наивысшей доступной чистотой. Они были приобретены у следующих производителей: 2,4-динитрофенилгидразина гидрохлорид (99%, кат. № 162325.1608, «PanReac», Испания), ацетонитрил (HPLC-gradient grade, кат. № 221881.1611, «PanReac»), фосфорная кислота, концентрированная для ВЭЖХ (для HPLC, 85–90%, кат. № 79606-500ML, «Honeywell Fluka», США), метанол (кат. № 106018, 99,8% чистоты, «Supelco», Германия), хлороформ (кат. № 102444, 99,8% чистоты, «Supelco»), пируват (кат. № 106619, 99% чистоты, «Merck»), уксусная кислота (кат. № 161008, 99,5% чистоты, «Panreac»), KH_2PO_4 (#A1043, 99,5% чистоты, Biochimica, «PanReac»),

остальные органические соединения – «Sigma-Aldrich» (США), включая стандарты 2-оксокислот, в частности, 2-оксомалонат (кат. № K4625, 98% чистоты), 2-оксоглутарат (кат. № K1750, 98,5% чистоты), 4-метилтио-2-оксобутират (кат. № K6000, 97% чистоты) и глиоксилат (кат. № G4627, 98% чистоты). Пируват и 4-метилтио-2-оксобутират использовались в виде натриевых солей, 2-оксомалонат – в виде моногидрата динатриевой соли, 2-оксоглутарат – в виде кислоты, а глио-ксилат – в виде моногидрата кислоты. Для приготовления растворов использовали деионизированную воду (Millipore Milli-Q PLUS, $R \geq 18,2 \text{ МОМ}\cdot\text{см}$).

Приготовление растворов. Для приготовления дериватирующей смеси к 10 мл ацетонитрила добавляли 10 мкл 85%-ной фосфорной кислоты, вносили навеску 10 мг 2,4-динитрофенилгидразина гидрохлорида. Для приготовления исходного раствора стандартов 2-оксокислот (2 мМ) в 1,5-миллитровые пробирки помещали по 10 мкл концентрированных (100 мМ) растворов Glx, Pуг, 2-ОМ, 2-ОГ и МТОВ, добавляли 450 мкл воды. Для приготовления раствора сравнения (50 мкМ) в пробирки помещали 10 мкл исходного раствора стандартов 2-оксокислот (2 мМ) и добавляли 390 мкл воды. Для приготовления испытуемых растворов в пробирки помещали 150 мкл раствора образца, холостого раствора (вода) или раствора сравнения, 150 мкл дериватирующего раствора и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч.

Хроматографический анализ DNPН-производных 2-оксокислот. Хроматографию осуществляли с использованием ВЭЖХ-системы Agilent 1200 с диодноматричным детектором («Agilent», США) и колонки Synergi Max-RP 250 мм × 4,6 мм («Phenomenex», США), с размером частиц сорбента 5 мкм при температуре 25 °С. Скорость потока составляла 1 мл/мин. Детекцию проводили спектрофотометрически при длине волны 360 нм. Остальные хроматографические условия определяли в процессе разработки метода.

Получение метанол-уксусных экстрактов мозга крыс и удаление липидной фракции. Экстракты коры головного мозга самцов крыс линии Wistar готовили с использованием метанола и уксусной кислоты согласно опубликованной методике [20]. Вкратце, хранившуюся при –70 °С ткань гомогенизировали в 8-кратном объеме ледяного метанола. Полученный гомогенат разводили в 2,5 раза 0,2%-ной уксусной кислотой, перемешивали в шейкере Excella E24 («New Brunswick Scientific», Германия) во льду в течение 30 мин при 180 об./мин. Денатурированные белки уда-

ляли центрифугированием в течение 20 мин при 21 500 g и 4 °С. Супернатант отбирали в чистые охлажденные пробирки и хранили при –70 °С. Перед анализом из экстрактов удаляли липидную фракцию с помощью экстракции хлороформом [23] с модификациями, использовавшимися для экстракции метаболитов из животных клеток [24]. Так, метанол-уксусный экстракт смешивали с одним объемом хлороформа, тщательно встряхивали в течение 1 мин и центрифугировали в течение 5 мин при 3500 g. Верхнюю фракцию, содержащую полярные соединения, аккуратно отделяли от нижней липидной фракции, разделяли на 2 мл аликвоты и высушивали с помощью вакуумного концентратора Eppendorf Concentrator Plus («Хеликон», Россия) при комнатной температуре. Высушенные аликвоты полярной фракции хранили при температуре –70 °С до проведения анализа. Непосредственно перед анализом аликвоты разводили в 200 мкл 50 mM калий-фосфатного буфера, pH 6,0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Разработка ВЭЖХ метода разделения DNPН-производных 2-оксокислот. Для выбора оптимального значения pH подвижной фазы была использована программа ACD/Phys Chem History версия 2020.2.0 («ACD/Labs», Канада). На основании структур химических соединений программа рассчитывает для каждого соединения значения pK и logD – гидрофобность (распределение октанол/вода), определенную с учетом pH раствора. В результате при выбранном значении pH, при котором все исследуемые компоненты имеют одну доминирующую ионную форму, различия в logD способствуют удовлетворительному разделению компонентов в условиях ОФ ВЭЖХ. При этом нужно учитывать pH-диапазон, в котором производителем допускается использовать выбранную хроматографическую колонку. Распределения ионных форм 2-оксокислот в зависимости от pH для каждого из шести соединений (5 производных 2-оксокислот и свободный дериватирующий агент) приведены на рис. 1.

Расчетная зависимость содержания доминирующей ионной формы соединения от pH среды для всех шести соединений представлена на рис. 2, а. Показано, что максимальное содержание доминирующей ионной формы для всех шести соединений наблюдается в диапазоне от 5,9 до 6,2. Зависимость гидрофобности (logD) от pH среды всех компонентов (рис. 2, б) подтверждает, что для достижения лучшего разделения компонентов предпочтительное значение pH

около 6,0. Наибольшее значение logD имеет свободный DNPН и можно предположить, что пики всех оставшихся пяти анализируемых компонентов будут иметь время удерживания меньше, чем пик DNPН. Выбранная для анализа колонка Synergi Max-RP допускает использование подвижной фазы с pH в диапазоне 1,5–10. Выбранное значение pH 6,0 находится в допустимом диапазоне.

На основании представленных на рис. 2 данных была выбрана подвижная фаза А: 15 mM калия фосфат, pH 6,0 в воде. В качестве сильного элюента использовали 100% ацетонитрил. Для оптимизации градиента ацетонитрила использовали программу ACD/AutoChrom 2020.2.0 («ACD/Labs»). Для построения моделей зависимости удерживания каждого пика от концентрации ацетонитрила были проведены 3 градиентных разделения в условиях, указанных в табл. 1. В таблице приведены рассчитанные и экспериментальные времена удерживания пиков анализируемых компонентов. Идентификацию пиков осуществляли на основании анализа продуктов дериватизации каждой отдельной 2-оксокислоты (рис. 3, а). Видно, что большинство 2-оксокислот образуют 2 пика производных с DNPН, вероятно, по причине наличия цис-транс изомеров (далее обозначены как -1 и -2).

Из таблицы видно, что линейная двухпараметрическая модель $\ln k' = a + b \times X$ (где k' – коэффициент емкости, X – содержание ацетонитрила в подвижной фазе, a и b – коэффициенты регрессии) удовлетворительно описывает данные, полученные по 3 экспериментальным градиентам. Предсказанный оптимальный градиент 20–40% ацетонитрила за 15 мин был реализован с модификацией подвижной фазы А: ацетонитрил/вода (20 : 80) и 12 mM калия фосфат, pH 6,0. Градиентная программа в этом случае имеет вид, приведенный в табл. 2.

Результаты анализа модельной смеси (рис. 3, б) с использованием этой градиентной программы показывают достаточное разрешение ($> 1,0$) компонентов: 2-ОМ (3,5), 2-ОГ (9,8), МТОВ (1,7), Glx-1 (13,1), Glx-2 (10,1) и Руг-1 (16,0).

Полученные валидационные характеристики подобранного метода разделения представлены в табл. 3.

Оказалось, что для веществ, образующих 2 пика продуктов дериватизации, площади индивидуальных пиков обладают большей изменчивостью по сравнению с суммой площадей пиков. На основании полученных валидационных характеристик можно сделать вывод, что метод позволяет с достаточно большой точностью определять все исследованные 2-оксокислоты,

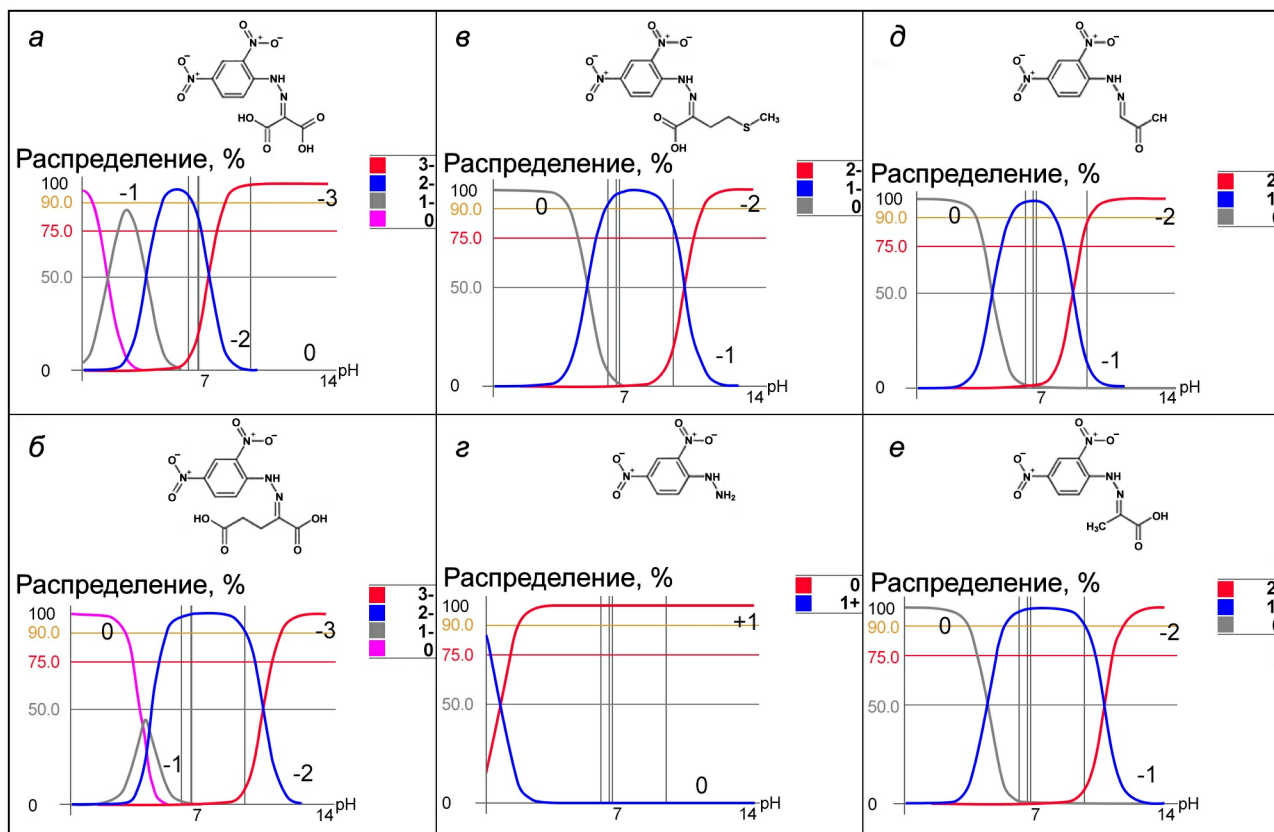


Рис. 1. pH-Зависимость распределения ионных форм 2-ОМ-DNPH (а), 2-ОГ-DNPH (б), МТОВ-DNPH (в), DNPH (г), Glx-DNPH (д) и Pux-DNPH (е). Цифрами рядом с кривыми обозначен заряд ионных форм

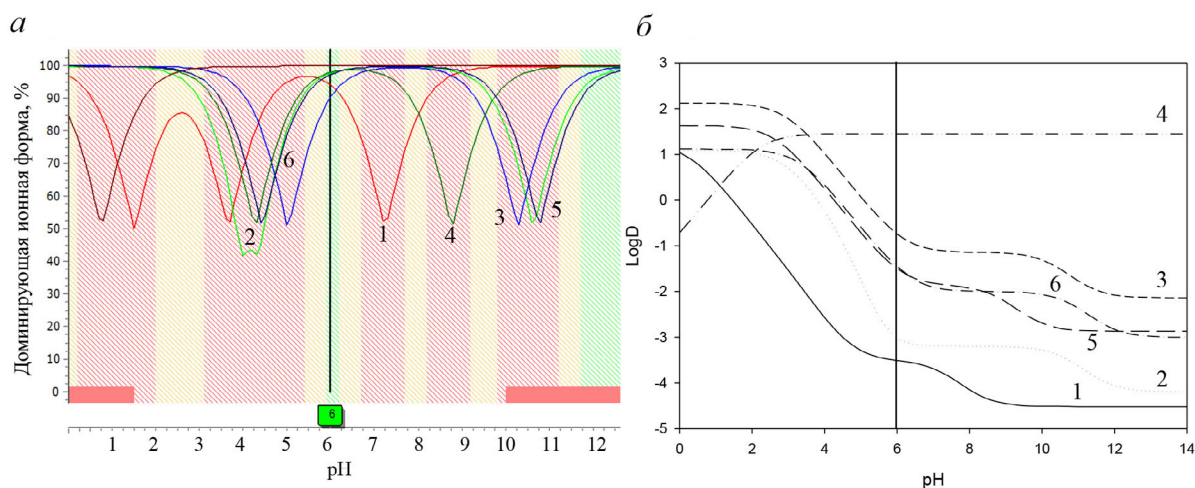


Рис. 2. а – pH-Зависимость распределения доминирующих ионных форм шести соединений; б – pH-зависимость распределения октанол/вода (logD) шести соединений: 2-ОМ-DNPH (1), 2-ОГ-DNPH (2), МТОВ-DNPH (3), DNPH (4), Glx-DNPH (5) и Pux-DNPH (6). Вертикальной линией обозначено выбранное рабочее значение pH среды. Участки за пределами рабочего диапазона отмечены красным цветом. Расчеты проведены с помощью ACD/Phys Chem History

кроме серосодержащей МТОВ, обладающей недостаточными стабильностью и разрешимостью второго пика с пиком дериватирующего агента (DNPH).

Анализ 2-оксокислот в образцах гомогенатов мозга крыс. Несмотря на стабильность и надежность метода, количественное определение содержания 2-оксокислот в биологических жид-

Таблица 1. Рассчитанные и экспериментальные времена удерживания пиков анализируемых компонентов, полученные по исходным градиентным программам

Условия ОФ ВЭЖХ*	Тип	Glx-1	Glx-2	Pyг-1	Pyг-2	МТОВ-1	МТОВ-2	2-OG	2-OM	DNPH
5–50% (20 мин)	модель	14,9	18,0	16,5	19,8	19,5	24,1	13,4	12,6	22,7
	опыт	15,5	18,2	17,1	19,9	19,1	24,1	14,2	13,4	22,9
5–50% (40 мин)	модель	21,5	25,5	24,5	30,3	28,3	35,9	19,6	17,7	33,6
	опыт	21,4	25,4	24,6	30,4	28,2	35,9	19,5	17,3	33,7
20–60% (30 мин)	модель	9,0	13,4	11,4	16,3	15,6	22,2	6,7	5,7	20,2
	опыт	8,9	13,3	11,2	16,2	15,8		6,6	5,7	20,1
20–40% (1 мин); 40–60% (5 мин)	модель	9,0	13,4	11,4	16,3	15,6	21,8	6,7	5,7	20,2

* Приведены условия градиента ацетонитрила; подвижная фаза: 15 мМ калия фосфат, рН 6,0.

костях и тканях методом ВЭЖХ далеко не всегда представляет собой простую задачу. Первая проблема связана с корректной пробоподготовкой. Это, в первую очередь, полнота осаждения белков с использованием специальных реагентов и необходимость удаления примесных компонентов, прежде всего липидной природы, мешающих последующему анализу. И в этом отношении подготовка проб из мозга животных представляет особую сложность, связанную с высоким содержанием липидов разной природы. Несмотря на подбор условий максимально возможного удаления липидной составляющей мозга, даже незначительное остаточное содержание липидов в образцах для анализа, как показал наш опыт работы, достаточно быстро снижает хроматографические качества колонки.

Предложенные условия хроматографического разделения 2-оксокислот были использованы

для измерения содержания указанных соединений в метанол-уксусных экстрактах головного мозга животных (пример хроматограммы для одного из испытуемых образцов приведен на рис. 4).

Усреднение результатов анализов экстрактов из образцов мозга разных крыс (табл. 4) показало, что содержание 2-оксокислот дает сходимые результаты: для исследованных образцов стандартная ошибка среднего составляет: 8, 13, 17, 20 и 22% от среднего значения для 2-OM, МТОВ, Pyг, 2-OG и Glx соответственно. Наблюдаемые высокие значения дисперсии для части соединений (Glx, 2-OG и Pyг), предположительно, обусловлены индивидуальными особенностями метаболизма в головном мозге.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Систематическое исследование метаболомов, метаболомика, – безусловно, перспективное развивающееся направление, по влиянию в мире претендующее на одинаковые позиции с геномикой и протеомикой, однако банк данных метаболомов еще сравнительно мал, а для количественного анализа конкретного аналита требуется персональная аналитическая методика количественного определения. Зачастую более показательным использованием таргетированного подхода, такого как измерение небольшого числа 2-оксокислот.

Ранние методы, используемые для количественного определения 2-оксокислот в клиничес-

Таблица 2. Оптимизированная градиентная программа

Время, мин	Состав подвижной фазы		Режим элюирования
	А, %	Б, %	
0 → 15	100 → 75	0 → 25	линейный градиент
15 → 20	75	25	изократический режим
20 → 22	75 → 100	25 → 0	линейный градиент
22 → 30	100	0	изократический режим

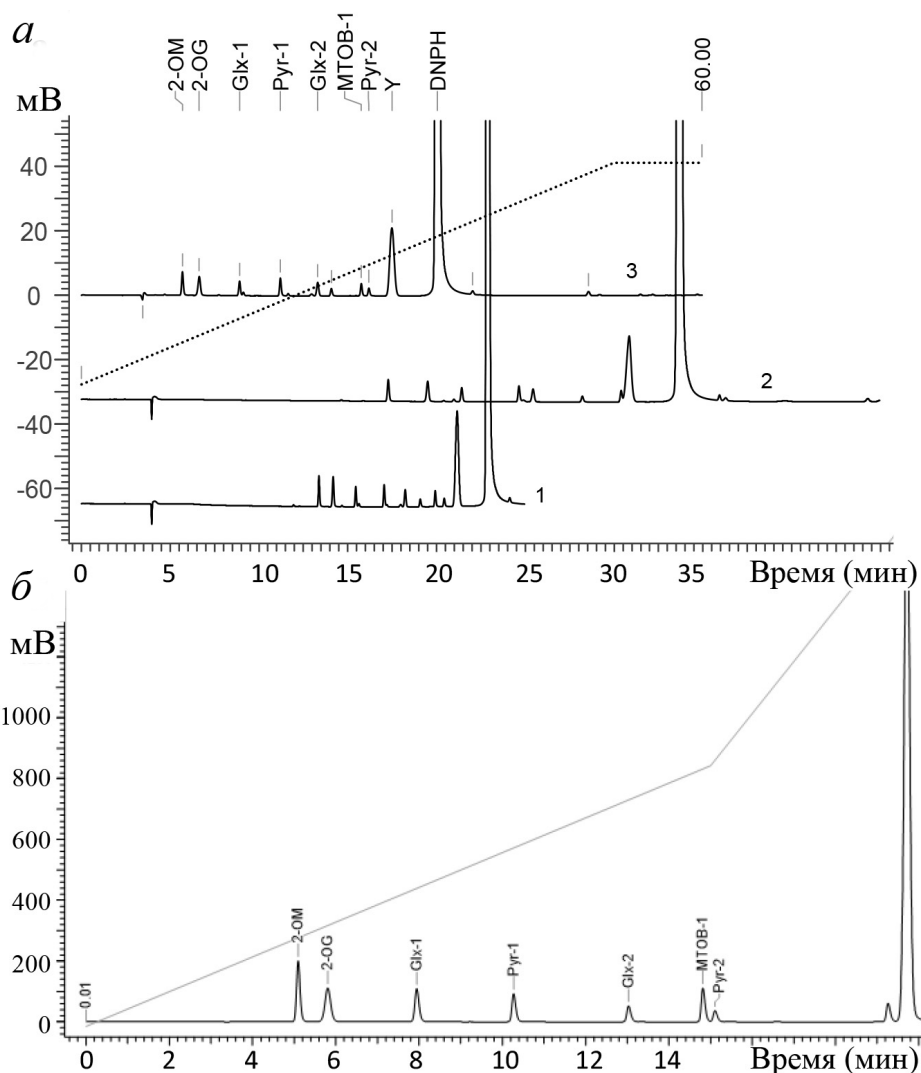


Рис. 3. *a* – Хроматограммы для построения моделей зависимости удерживания смеси 2-оксокислот от концентрации ацетонитрила в подвижной фазе. Градиент 5–50% (Б) за 20 мин (1), градиент 5–50% (Б) за 40 мин (2), градиент 20–60% (Б) за 30 мин (3). *б* – Хроматограмма модельной смеси 2-оксокислот, полученная с использованием оптимизированной градиентной программы (условия представлены в табл. 2). Пик Y – побочный продукт дериватизации 2-оксокислот (не идентифицирован)

ких и научных лабораториях, были основаны на ферментативных NADH-зависимых реакциях с последующей регистрацией изменения поглощения или флуоресценции. Реакции этого типа легко проводимы и достаточно надежны как минимум для одностадийных методик. Многостадийные методы менее используемы; они зачастую требуют дополнительных веществ и ферментов и, следовательно, более дорогие и менее надежные. Тем не менее большинство ферментативных тестов применимо для количественного определения только одного вещества одновременно. Вышеупомянутые трудности в детекции 2-оксокислот удавалось частично разрешить при использовании аналитической ВЭЖХ

совместно с дериватизацией анализируемых соединений [10, 11]. Так, в случае *o*-фенилендиамина, 2-оксокислотные производные которого могут быть детектированы спектрофотометрически или флуориметрически [16], результаты хроматографического анализа 2-оксокислот с разветвленной цепью (2-оксоизовалерата, 2-оксокизокапроата и 2-оксо-3-метилвалерата) в плазме крови давали схожие результаты с традиционным ферментативным методом [35], что позволило использовать его для определения и других 2-оксокислот [17, 36]. Производное *o*-фенилендиамина, 4,5-метилendioкси-1,2-диаминобензол, также зарекомендовал себя в качестве дериватирующего агента ввиду более

Таблица 3. Валидационные характеристики разработанного метода

Параметр валидации	Критерий приемлемости	Значения				
		2-OM	2-OG	МТОВ-1	Glx-1 + Glx-2	Pyг-1 + Pyг-2
Линейность в аналитическом диапазоне 1-200 мкМ	коэффициент корреляции (R) $\geq 0,99$	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
		98,7%	99,8%	107,6%	99,4%	106,0%
Правильность в аналитическом диапазоне 1-200 мкМ	среднее значение восстановления должно быть от 90,0 до 110,0%	2,5%	3,3%	10,8%	2,5%	8,5%
	коэффициент вариации (RSD) $\leq 15,0\%$					
Предел количественного определения	минимальная концентрация, при которой отношение сигнал/шум ≥ 10	Среднее отношение сигнал/шум пиков 2-оксокислот при концентрации 1 мкМ				
		141	111	89	97 / 25	90 / 18
Стабильность аналитических растворов при комнатной температуре	отклонение площадей, рассчитанное для 24 ч относительно «нулевой» точки, не должно превышать 10,0%	2,3%	2,3%	-25,0%	2,5%	2,0%

высокой чувствительности методик с его использованием [6]. Однако, несмотря на наличие исследований, использующих фенилгидразин для ОФ ВЭЖХ определения 2-оксокислот в биологических образцах [10, 11], работы с применением его более стабильного производного, DNPН, отсутствуют.

Определенное в нашей работе с помощью ОФ ВЭЖХ и DNPН среднее содержание пирувата в головном мозге крысы близко к таковому, определенному с помощью ферментативных методов по данным литературы (табл. 4). Glx в норме не детектируется в головном мозге (табл. 4), как и в других тканях, за исключением

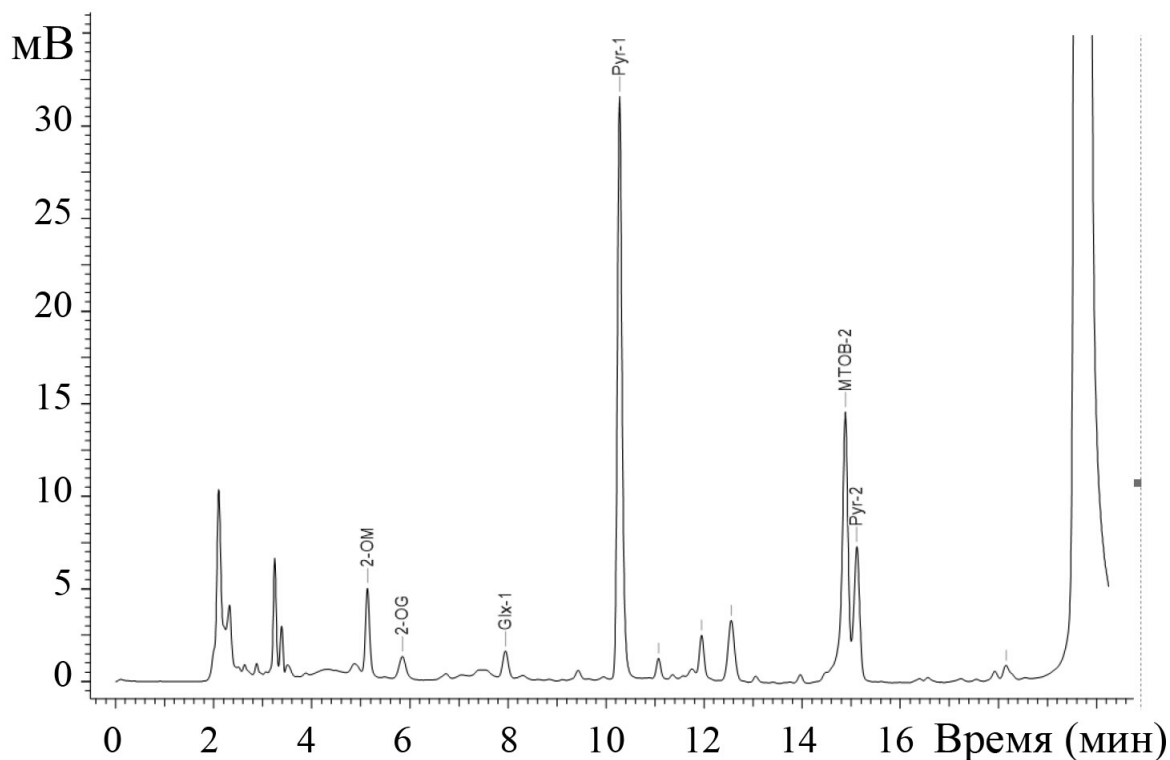


Рис. 4. Хроматографическое разделение 2-оксокислот в экстракте головного мозга крысы с использованием разработанной градиентной программы (рис. 3, б и табл. 2)

Таблица 4. Сравнение содержания 2-оксокислот в головном мозге крысы, полученных в настоящем исследовании, с литературными данными

2-Оксокислоты	Метод	Значения, нмоль/г	Ссылки
Pyr	ВЭЖХ с DNPH	86 ± 14	данная работа
	спектрофотометрия с ЛДГ	129 ± 22	[25–27]
	флюориметрия с ЛДГ	115 ± 6	[28–32]
	флюориметрия с пируватоксидазой и Amplex Red	56	[33]
	экстракция производного с DNPH	59	[34]
2-OG	ВЭЖХ с DNPH	2,6 ± 0,5	данная работа
	спектрофотометрия с ГДГ	190	[27]
	флюориметрия с ГДГ	115 ± 4	[28, 29, 31]
Glx	ВЭЖХ с DNPH	3,1 ± 0,7	данная работа
	бумажная хроматография с DNPH	<1	[34]
МТОВ	ВЭЖХ с DNPH	38 ± 5	данная работа
2-OM	ВЭЖХ с DNPH	5,0 ± 0,4	данная работа

Примечание. ЛДГ – лактатдегидрогеназа, ГДГ – глутаматдегидрогеназа.

почек, однако может определяться при тиаминном дефиците у животных [34]. Измерение содержания 2-ОМ и МТОВ в мозге животных не описано в литературе, хотя концентрация последнего в плазме здоровых людей составляет порядка 0,15 мкМ [37]. Тем не менее при анализе экстрактов мозга крыс измеряемая концентрация 2-ОГ была много ниже концентрации Pyr, несмотря на их близкое содержание в мозге согласно данным литературы (табл. 4). Эта особенность может свидетельствовать об исчезновении 2-ОГ на разных стадиях анализа. Причинами низких уровней данного метаболита в анализируемых экстрактах мозга могут быть низкое содержание 2-ОГ в мозге по сравнению с другими тканями, потери 2-ОГ при хранении и высушивании экстрактов, быстрая деградация данного метаболита в промежутке между декапитацией и полной заморозкой коры больших полушарий (не более нескольких минут). Так, одной из причин низкого содержания 2-ОГ в экстрактах мозга может быть его восстановительное аминирование до глутамата, которое в том числе может идти неферментативно в метанол-содержащих экстрактах тканей с использованием пиридоксамина, и в особенности мочевины, в качестве доноров аминогруппы [38]. В некоторых работах наблюдали миллимолярные концентрации мочевины в мозге млекопитающих

[39], что на порядок выше концентрации 2-оксоглутарата по данным литературы (табл. 4). Таким образом, нельзя исключить неферментативное превращение 2-ОГ в глутамат при пробоподготовке и хранении метанол-уксусных экстрактов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе предложен новый метод ОФ ВЭЖХ для измерения уровней 2-оксокислот, Glx, 2-ОГ, 2-ОМ, Pyr и МТОВ, использующий спектрофотометрическую детекцию продуктов химической дериватизации 2-оксокислот 2,4-динитрофенилгидразином. Определены валидационные характеристики метода и содержание 2-оксокислот в метанол-уксусных экстрактах мозга крыс. В дополнение к ранее разработанным методам определения аминокислот [20, 21] данный метод количественного определения 2-оксокислот может быть полезен для определения маркерной роли 2-оксокислот во взаимодействии путей метаболизма углеводов и аминокислот. Известно, что именно в таких узлах пересечения метаболизма локализованы полиферментные комплексы дегидрогеназ 2-оксокислот, которые являются основными регуляторами концентрации данных молекул в

клетках в силу осуществляемых комплексами процессов необратимой деградации 2-оксокислот. Более того, в случае нейродегенеративных заболеваний показано снижение функций 2-оксоглутаратдегидрогеназного и пируватдегидрогеназного комплексов, связанное с характерным для таких патологий метаболическим стрессом [40]. Информация об уровнях 2-оксокислот, в дополнение к определению аминокислот и ферментативных активностей в образцах, будет способствовать лучшему пониманию метаболизма головного мозга животных в норме и при патологических состояниях.

Финансирование. Работа поддержана грантом РНФ № 18-14-00116 (руководитель В.И. Буник).

Благодарности. Авторы выражают благодарность А.В. Граф (НИИ физико-химической биологии и биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова) за предоставленные образцы коры головного мозга крыс.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Graham, D. E. (2011) 2-oxoacid metabolism in methanogenic CoM and CoB biosynthesis, *Methods Enzymol.*, **494**, 301-326, doi: 10.1016/B978-0-12-385112-3.00015-9.
- Muhling, J., Paddenberg, R., Hempelmann, G., and Kummer, W. (2006) Hypobaric hypoxia affects endogenous levels of alpha-keto acids in murine heart ventricles, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **342**, 935-939, doi: 10.1016/j.bbrc.2006.02.054.
- Hutson, S. M., and Harper, A. E. (1981) Blood and tissue branched-chain amino and alpha-keto acid concentrations: Effect of diet, starvation, and disease, *Am. J. Clin. Nutr.*, **34**, 173-183, doi: 10.1093/ajcn/34.2.173.
- Hoang, M., and Joseph, J. W. (2020) The role of alpha-ketoglutarate and the hypoxia sensing pathway in the regulation of pancreatic beta-cell function, *Islets*, **12**, 108-119, doi: 10.1080/19382014.2020.1802183.
- Kronberger, L., Semmelrock, H. J., Schaur, R. J., Schauenstein, E., Schreibmayer, W., et al. (1980) Tumor host relations. VI. Is alpha-ketoglutarate a tumor marker? Association with tumor extent in humans – correlation with tumor size in rats, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **97**, 295-299, doi: 10.1007/BF00405781.
- Shibata, K., Nakata, C., and Fukuwatari, T. (2016) High-performance liquid chromatographic method for profiling 2-oxo acids in urine and its application in evaluating vitamin status in rats, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **80**, 304-312, doi: 10.1080/09168451.2015.1083395.
- Bertrand, M., Decoville, M., Meudal, H., Birman, S., and Landon, C. (2020) Metabolomic nuclear magnetic resonance studies at presymptomatic and symptomatic stages of Huntington's disease on a Drosophila model, *J. Proteome Res.*, **19**, 4034-4045, doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00335.
- Kondoh, H., Teruya, T., and Yanagida, M. (2020) Metabolomics of human fasting: new insights about old questions, *Open Biol.*, **10**, 200176, doi: 10.1098/rsob.200176.
- Losman, J. A., Koivunen, P., and Kaelin, W. G., Jr. (2020) 2-Oxoglutarate-dependent dioxygenases in cancer, *Nat. Rev. Cancer*, **20**, 710-726, doi: 10.1038/s41568-020-00303-3.
- Petrarulo, M., Pellegrino, S., Bianco, O., Marangella, M., Linari, F., et al. (1988) High-performance liquid chromatographic determination of glyoxylic acid in urine, *J. Chromatography*, **432**, 37-46, doi: 10.1016/s0378-4347(00)80631-3.
- Lange, M., and Malysz, M. (1994) Fast method for the simultaneous determination of 2-oxo acids in biological fluids by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatography. B Biomed. Appl.*, **662**, 97-102, doi: 10.1016/0378-4347(94)00383-1.
- Tonhazy, N. E., White, N. G., and Umbreit, W. W. (1950) A rapid method for the estimation of the glutamic-aspartic transaminase in tissues and its application to radiation sickness, *Arch. Biochem.*, **28**, 36-42.
- Reitman, S., and Frankel, S. (1957) A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases, *Am. J. Clin. Pathol.*, **28**, 56-63, doi: 10.1093/ajcp/28.1.56.
- De Ochs, S. M., Fasciotti, M., Barreto, R. P., de Figueiredo, N. G., Albuquerque, F. C., et al. (2010) Optimization and comparison of HPLC and RRLC conditions for the analysis of carbonyl-DNPH derivatives, *Talanta*, **81**, 521-529, doi: 10.1016/j.talanta.2009.12.036.
- Wahed, P., Razzaq, M. A., Dharmapuri, S., and Corrales, M. (2016) Determination of formaldehyde in food and feed by an in-house validated HPLC method, *Food Chem.*, **202**, 476-483, doi: 10.1016/j.foodchem.2016.01.136.
- Singh, B. K., Szamosi, I., and Shaner, D. (1993) A high-performance liquid chromatography assay for threonine/serine dehydratase, *Anal. Biochem.*, **208**, 260-263, doi: 10.1006/abio.1993.1043.
- Hayashi, T., Tsuchiya, H., Todoriki, H., and Naruse, H. (1982) High-performance liquid chromatographic determination of alpha-keto acids in human urine and plasma, *Anal. Biochem.*, **122**, 173-179, doi: 10.1016/0003-2697(82)90267-6.
- Martis, S., Droux, B. M., Deboudard, F., Nasser, W., Meyer, S., et al. (2020) Separation and quantification of 2-Keto-3-deoxy-gluconate (KDG) a major metabolite in pectin and alginate degradation pathways, *Anal. Biochem.*, **619**, 114061, doi: 10.1016/j.ab.2020.114061.
- Marangella, M., Petrarulo, M., Bianco, O., Vitale, C., Finocchiaro, P., et al. (1991) Glycolate determination detects type I primary hyperoxaluria in dialysis patients, *Kidney Int.*, **39**, 149-154, doi: 10.1038/ki.1991.19.
- Ksenofontov, A. L., Boyko, A. I., Mkrtychyan, G. V., Tashlitsky, V. N., Timofeeva, A. V., et al. (2017) Analysis of free amino acids in mammalian brain extracts, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 1183-1192, doi: 10.1134/S000629791710011X.
- Trofimova, L., Ksenofontov, A., Mkrtychyan, G., Graf, A., Baratova, L., et al. (2016) Quantification of rat brain amino acids, *Anal. Data Consistency*, **12**, 349-356, doi: 10.2174/1573411011666151006220356.
- Artiukhov, A. V., Kazantsev, A. V., Lukashev, N. V., Bellinzoni, M., and Bunik, V. I. (2020) Selective inhibition of 2-oxoglutarate and 2-oxoadipate dehydrogenases by the phosphonate analogs of their 2-oxo acid substrates, *Front. Chem.*, **8**, 596187, doi: 10.3389/fchem.2020.596187.

23. Bligh, E. G., and Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911-917, doi: 10.1139/o59-099.
24. Trofimova, L. K., Araujo, W. L., Strokina, A. A., Fernie, A. R., Bettendorff, L., et al. (2012) Consequences of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase inhibition for neuronal metabolism and survival: Implications for neurodegenerative diseases, *Curr. Med. Chem.*, **19**, 5895-5906, doi: 10.2174/092986712804143367.
25. Schenker, S., McCandless, D. W., Brophy, E., and Lewis, M. S. (1967) Studies on the intracerebral toxicity of ammonia, *J. Clin. Invest.*, **46**, 838-848, doi: 10.1172/JCI105583.
26. Dale, R. A. (1965) Effects of sampling procedures on the contents of some intermediate metabolites of glycolysis in rat tissues, *J. Physiol.*, **181**, 701-711, doi: 10.1113/jphysiol.1965.sp007792.
27. Miller, A. L., Hawkins, R. A., Harris, R. L., and Veech, R. L. (1972) The effects of acute and chronic morphine treatment and of morphine withdrawal on rat brain *in vivo*, *Biochem. J.*, **129**, 463-469, doi: 10.1042/bj1290463.
28. Goldberg, N. D., Passonneau, J. V., and Lowry, O. H. (1966) Effects of changes in brain metabolism on the levels of citric acid cycle intermediates, *J. Biol. Chem.*, **241**, 3997-4003.
29. Holowach, J., Kauffman, F., Ikossi, M. G., Thomas, C., and McDougal, D. B., Jr. (1968) The effects of a thiamine antagonist, pyriothiamine, on levels of selected metabolic intermediates and on activities of thiamine-dependent enzymes in brain and liver, *J. Neurochem.*, **15**, 621-631, doi: 10.1111/j.1471-4159.1968.tb08961.x.
30. Gardiner, M., Smith, M. L., Kagstrom, E., Shohami, E., and Siesjo, B. K. (1982) Influence of blood glucose concentration on brain lactate accumulation during severe hypoxia and subsequent recovery of brain energy metabolism, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **2**, 429-438, doi: 10.1038/jcbfm.1982.49.
31. Folbergrova, J., MacMillan, V., and Siesjo, B. K. (1972) The effect of hypercapnic acidosis upon some glycolytic and Krebs cycle-associated intermediates in the rat brain, *J. Neurochem.*, **19**, 2507-2517, doi: 10.1111/j.1471-4159.1972.tb01310.x.
32. Thurston, J. H., Hauhart, R. E., and Schiro, J. A. (1983) Lactate reverses insulin-induced hypoglycemic stupor in suckling-weanling mice: Biochemical correlates in blood, liver, and brain, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **3**, 498-506, doi: 10.1038/jcbfm.1983.77.
33. Soto, M., Orliaguet, L., Reyzer, M. L., Manier, M. L., Caprioli, R. M., et al. (2018) Pyruvate induces torpor in obese mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 810-815, doi: 10.1073/pnas.1717507115.
34. Liang, C. C. (1962) Studies on experimental thiamine deficiency. Trends of keto acid formation and detection of glyoxylic acid, *Biochem. J.*, **82**, 429-434, doi: 10.1042/bj0820429.
35. Schadewaldt, P., Hummel, W., Trautvetter, U., and Wendel, U. (1989) A convenient enzymatic method for the determination of 4-methyl-2-oxopentanoate in plasma: Comparison with high performance liquid chromatographic analysis, *Clin. Chim. Acta*, **183**, 171-182, doi: 10.1016/0009-8981(89)90333-1.
36. Wendel, U., Even, G., Langenbeck, U., Schadewaldt, P., and Hummel, W. (1992) Determination of (S)- and (R)-2-oxo-3-methylvaleric acid in plasma of patients with maple syrup urine disease, *Clin. Chim. Acta*, **208**, 85-91, doi: 10.1016/0009-8981(92)90024-k.
37. Blom, H. J., Ferenci, P., Grimm, G., Yap, S. H., and Tangerman, A. (1991) The role of methanethiol in the pathogenesis of hepatic encephalopathy, *Hepatology*, **13**, 445-454.
38. Wiese, E. K., Hitosugi, S., Buhrow, S. A., Loa, S. T., Sreedhar, A., et al. (2020) Reductive amination of alpha-Ketoglutarate in metabolite extracts results in glutamate overestimation, *J. Chromatogr. A*, **1623**, 461169, doi: 10.1016/j.chroma.2020.461169.
39. Arieff, A. I., Massry, S. G., Barrientos, A., and Kleeman, C. R. (1973) Brain water and electrolyte metabolism in uremia: Effects of slow and rapid hemodialysis, *Kidney Int.*, **4**, 177-187, doi: 10.1038/ki.1973.100.
40. Bunik, V. (2017) *Vitamin-Dependent Multienzyme Complexes of 2-Oxo Acid Dehydrogenases: Structure, Function, Regulation and Medical Implications*, Nova Science Publisher.

ANALYSIS OF THE 2-OXO ACIDS CONTENT IN RAT BRAIN EXTRACTS USING HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

V. N. Tashlitsky¹, A. V. Artiukhov^{2,3}, N. V. Fedorova², M. A. Sukonnikov¹,
A. L. Ksenofontov^{2*}, V. I. Bunik^{2,3,4}, and L. A. Baratova^{2*}

¹ Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

² Belozersky Institute of Physicochemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; e-mail: baratova@belozersky.msu.ru, ksenofon@belozersky.msu.ru

³ Sechenov University, Department of Biochemistry, 119991 Moscow, Russia

⁴ Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

2-Oxo acids are involved in a number of important metabolic processes and can be used as biomarkers for a number of human diseases. The paper analyzes the available methods for determining the content of 2-oxo acids in the mammalian brain according to the literature. An optimized method for high-performance liquid chromatography of 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatives of 2-oxo acids has been developed. Due to their high chemical stability, the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatives have shown a number of advantages, in comparison with previously used phenylhydrazine derivatives. The validation characteristics of the method are determined. The issues of sample preparation during the analysis of mammalian brain extracts are discussed. Using the derivatizing agent, the concentrations of pyruvate, glyoxylate, 2-oxoglutarate, 2-oxomalonnate, and 4-methylthio-2-oxobutyrate were measured in methanol-acetic extracts of rat brain. The developed method facilitates studying of subtle changes in the cell and tissue content of 2-oxo acids as indicators of metabolism.

Keywords: HPLC, 2-oxo acids, rat brain extracts, 2,4-dinitrophenylhydrazine, method validation