

## ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ НА МЕЖФАЗНЫХ ГРАНИЦАХ

УДК 544.07:543.07:543.08:543.2:543.9

### МЕТОДИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ *цис*-ЖИРНЫХ КИСЛОТ ЭНДОГЕННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ

© 2020 г. З. Б. Хесина<sup>1,\*</sup>, С. Д. Ярцев<sup>1</sup>, А. К. Буряк<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина Российской академии наук,  
Ленинский проспект, 31, корп. 4, Москва, 119071 Россия

\*e-mail: maldi-ms@yandex.ru

Поступила в редакцию 30.01.2019 г.

После доработки 05.01.2020 г.

Принята к публикации 10.01.2020 г.

Разработан подход, позволяющий проводить количественное определение эндогенных *цис*-жирных кислот в присутствии *цис*- и *транс*-жирных кислот, не включающий трудоемкую и длительную стадию их хроматографического разделения. Подход основан на использовании ингибитора, блокирующего действие фермента Elovl6, участвующего в синтезе жирных кислот в организме. Методом жидкостной хроматографии, масс-спектрометрии последовательно исследуются образцы, полученные без использования ингибитора и с его использованием. Разработанный подход применен для анализа эндогенных *цис*-жирных кислот, синтезирующихся в раковых клетках.

DOI: 10.31857/S0044185620030171

#### ВВЕДЕНИЕ

На протяжении нескольких десятков лет большое внимание уделяется обнаружению и количественному определению жирных кислот (ЖК) в биологических жидкостях, клетках и тканях человека. Ведутся исследования о влиянии ЖК на ожирение, диабет II типа, сердечно-сосудистые и онкологические заболевания [1, 2].

Одним из типов рака, ассоциированных с содержанием ЖК, является рак молочной железы (РМЖ). Он занимает первое место среди злокачественных заболеваний у женщин по частоте и смертности. Ежегодно регистрируется более 1.5 миллиона новых случаев РМЖ и около трети из них заканчиваются летальным исходом [3].

Так как ЖК входят в состав липидов, образующих клеточные мембраны, они могут оказывать значительное влияние на метастатический потенциал раковых клеток. Различия в составе липидов часто коррелируют с агрессивностью и молекулярным подтипом РМЖ.

Показано, что большую роль в распространении рака играет гидрогенизирование полиненасыщенных жирных кислот с образованием “транс-жиров” [4, 5]. Этот процесс применяется при изготовлении маргарина, а также кондитерских и хлебопекарных изделий низкого качества. При их производстве жидкие *цис*-ненасыщенные жиры, такие как растительные масла, частично

гидрируются с образованием насыщенных жиров, которые имеют более желательные физические свойства. В ходе частичного гидрирования ненасыщенных жиров происходит побочный процесс изомеризации под действием катализатора, применяемого для гидрирования: *цис*-двойные связи частично переходят в *транс*-двойные [6].

В организмах млекопитающих все синтезируемые ЖК образуются исключительно в изогнутой *цис*-конфигурации, что придает этим молекулам дополнительную жесткость. Попадание в организм живых существ *транс*-ЖК, образовавшихся в результате частичного гидрирования ненасыщенных *цис*-ЖК, может иметь негативные последствия. Молекулы *транс*-ЖК имеют не изогнутую, а прямую конфигурацию, вследствие чего состоящие из таких молекул липиды не способны должным образом выполнять свои функции в составе клеточных мембран [7].

В настоящее время механизм биосинтеза ЖК в организме млекопитающих, а также катализирующие этот процесс ферменты изучены достаточно полно. Установлено, что в цитоплазме клеток печени синтезируется пальмитиновая кислота (C16 : 0), а в митохондриях из уже синтезированной в цитоплазме пальмитиновой кислоты или из жирных кислот экзогенного происхождения образуются ЖК из 18, 20 и 22 углеродных атомов.

При изучении метаболизма жирных кислот важно отделить *цис*-изомеры, образующиеся в

организме эндогенно, от *цис*- и *транс*-изомеров, поступающих из пищи.

Для того, чтобы различить *цис*- и *транс*-изомеры ЖК, традиционно используют ИК-спектроскопию [8], однако этот метод не позволяет проводить количественное определение, и в целом характеризуется невысокой точностью. Альтернативным подходом является применение газовой хроматографии с использованием капиллярных колонок большой длины с сильнополярной неподвижной фазой. Указанный подход также не лишен недостатков, среди которых необходимость дериватизации (эта дополнительная стадия усложняет пробоподготовку образцов, приводит к появлению на хроматограммах пиков компонентов, не имеющих отношения к разделяемым кислотам) [9], плохое разделение большого числа изомеров [10]. Указанные недостатки могут быть частично устранены применением масс-спектрометрического детектирования [11], а в отношении плохого разделения некоторых изомеров может быть использована двумерная хроматография [12].

Также применяются методы, основанные на использовании жидкостной хроматографии. Так как прямое разделение кислот методом ВЭЖХ затруднено (вследствие близости их времен удерживания), применяются различные косвенные методы, такие как разделение фенациловых [13] или метиловых [14] эфиров кислот на ион-обменной неподвижной фазе, содержащей ионы серебра, с выделением фракций и их последующим анализом методом ГХ-МС в режиме off-line.

Использование капиллярного зонного электрофореза позволяет провести разделение изомеров небольшого числа жирных кислот [15].

Описано использование спектроскопии ионной подвижности для разделения *цис*- и *транс*-изомеров кислот [16, 17], этот метод используется для разделения пространственных изомеров, и, будучи соединенным с хроматографическим разделением и масс-спектрометрическим детектированием, позволяет разделить большое число изомеров жирных кислот. Однако вследствие сложности и высокой стоимости подобного оборудования, метод в настоящее время не может быть применен для массовых анализов.

В целом, следует отметить, что, несмотря на постоянное совершенствование инструментальных методов аналитической химии, проблема разделения пространственных изомеров жирных кислот не решена, и разработанные к настоящему времени подходы либо не обеспечивают желаемого разделения, либо сопряжены с трудоемкой пробоподготовкой и использованием сложного оборудования.

Поэтому стоит задача разработки подхода, позволяющего определять *цис*-изомеры жирных кислот эндогенного происхождения в присут-

ствии *цис*- и *транс*-изомеров, попавших в организм из пищи, при этом не включающего стадию хроматографического разделения изомеров.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### *Подготовка образцов раковых клеток для ВЭЖХ-МС анализа*

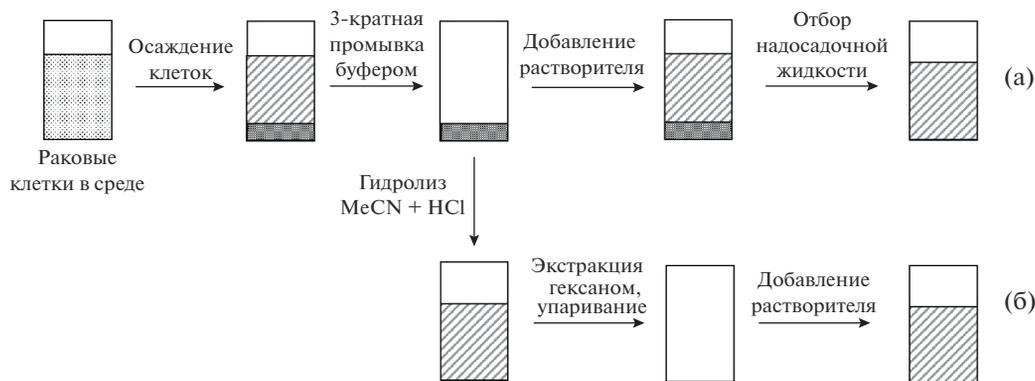
Клеточные линии рака РМЖ MDA-MB-231 (эстроген-рецептор отрицательная) и MCF7 (эстроген-рецептор положительная) культивировали в 24-луночной планшете (по  $2 \times 10^5$ /лунку) в присутствии 100 мкМ ингибитора фермента элонгазы Elov16 (ингибитор был предоставлен НТЦ “Био-клиникум”) и в его отсутствии согласно методике, описанной в статье [18]. Лунки промывали фосфатным буфером (Dulbecco’s Phosphate-Buffered Saline- DPBS), после чего проводили кислотный гидролиз суспензии раковых клеток. Для этого вносили 500 мкл смеси ацетонитрил-соляная кислота (4 : 1 по объему), инкубировали 2 ч при 90°C в термошейкере и оставляли на ночь при комнатной температуре [19].

Затем в вials вносили по 1 мл гексана и инкубировали на шейкере в течение 1 ч, отбирали верхний слой (экстракт ЖК) и переносили его в пластиковые флаконы на 2 мл, после чего упаривали досуха на ротаторном вакуумном испарителе. В микропробирки вносили по 150 мкл смеси 20 мМ ацетата аммония с метанолом (15 : 85 по объему) и инкубировали 1 ч в термошейкере Thermomixer (Eppendorf) при 30°C и 900 об./мин.

### *ВЭЖХ-МС анализ ЖК в раковых клетках*

Полученные растворы ЖК переносили в стеклянные вials и проводили анализ методом жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС). Разделение выполняли с использованием колонки Eclipse Plus C18 (Agilent) ( $4.6 \times 250$  мм, 5 мкм) на хроматографе Agilent 1260 Infinity I, оснащенный градиентным четырехканальным насосом, дегазатором, автосэмплером и термостатом колонок. Подвижная фаза А – 20 мМ водный раствор ацетата аммония, фаза В – метанол. Хроматографирование проводили в градиентном режиме: 0–11 мин – 87% В; далее 11–13 мин – линейно повышали до 99% В; 13–15 мин – линейно понижали до 87% В; 15–20 мин – 87% В. Температура термостата колонок: 40°C; скорость расхода подвижной фазы: 0.6 мл/мин.

Детектирование проводили с использованием масс-спектрометра Bruker Maxis Impact в режиме ионизации отрицательных ионов и детектирования выбранных ионов, соответствующих анионам исследуемых кислот (C16 : 0 – 255.23 Да; C18 : 0 – 283.27 Да; C16 : 1 – 253.22 Да; C18 : 1 – 281.25 Да).



**Рис. 1.** Схема пробоподготовки образцов раковых клеток для определения содержания жирных кислот без стадии кислотного гидролиза (а) и со стадией кислотного гидролиза (б).

Частота детектирования — 1 Гц; температура источника — 180°C; давление газа в распылителе — 0.6 бар; поток осушающего газа — 4 л/мин; напряжение на капилляре — 4500 В).

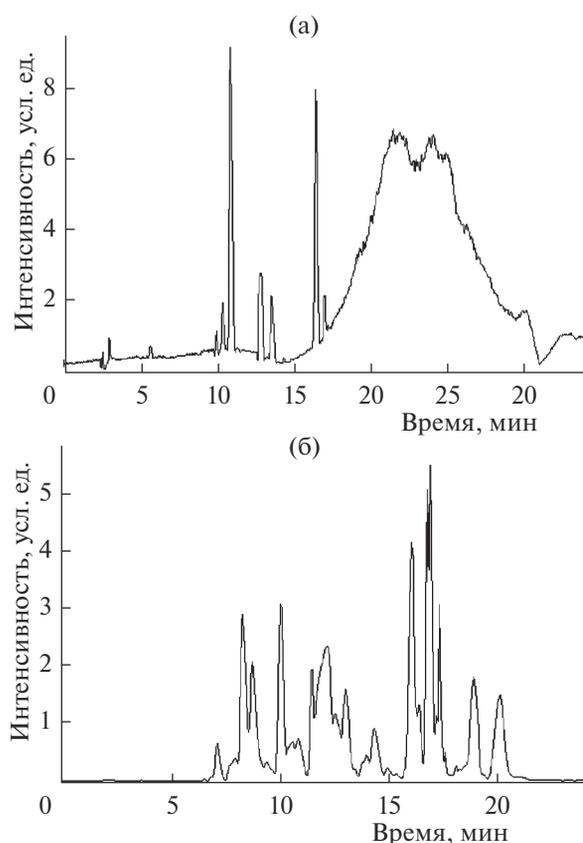
## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

### *Методические особенности хроматографического разделения ЖК, входящих в состав клеточных мембран*

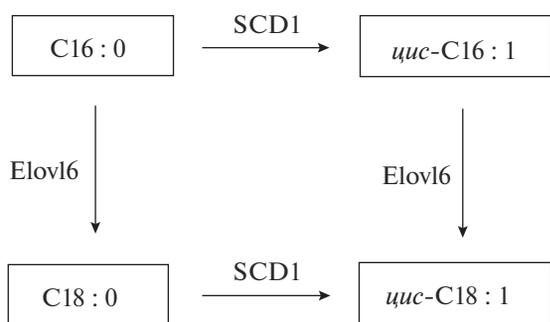
Фосфолипиды и триглицериды, в состав которых входят *цис*-ЖК, являющиеся объектом исследования, составляют мембрану клетки. Первоначальная предполагаемая схема анализа ЖК заключалась в хроматографическом разделении триглицеридов и фосфолипидов, их фрагментации и определении ЖК по MRM-переходам (мониторинг заданных реакций), где масса иона-предшественника — это масса липида клеточной мембраны, а масса иона-продукта — это масса аниона ЖК (рис. 1а). Однако хроматографическое разделение фосфолипидов и триглицеридов оказалось крайне затруднительным: близкие по строению и свойствам липиды, в состав которых входят исследуемые ЖК, образовывали на хроматограммах большую область неразрешенных пиков (рис. 2а). На масс-спектрах фрагментных ионов, зарегистрированных во время выхода описанной области неразрешенных пиков, наблюдали сигналы, соответствующие анионам исследуемых кислот, однако из-за плохого хроматографического разделения достоверно определить содержания кислот не представлялось возможным.

Для того чтобы успешно выполнить количественное определение ЖК, внесли изменение в процедуру пробоподготовки с целью выделить ЖК из липидов и перевести их в свободную форму. В качестве дополнительной стадии пробоподготовки предложен кислотный гидролиз исходных образцов с последующей экстракцией ЖК

гексаном (рис. 1б). Предложенный вариант пробоподготовки позволил выделить ЖК из липидов в свободном виде, после чего хроматографически разделить ЖК (рис. 2б). Количественное определение ЖК проводили методом масс-спектромет-



**Рис. 2.** Хроматограммы, полученные при анализе образцов раковых клеток. Пробоподготовка без стадии кислотного гидролиза (а) и со стадией кислотного гидролиза (б). Детектирование по полному ионному току отрицательных ионов.



**Рис. 3.** Схема образования *цис*-ненасыщенных кислот в организме из пальмитиновой кислоты под действием ферментов десатуразы (SCD1) и элонгазы (Elovl6).

рии в режиме детектирования выбранных ионов (SIM). Это дало возможность не проводить длительное хроматографическое разделение липидов с последующим детектированием их фрагментов (ЖК), а получить непосредственно сами ЖК с гораздо меньшей массой и большими различиями в строении, чем у липидов.

*Подход к определению цис-ЖК (C16 : 1 и C18 : 1), образующихся эндогенно под действием ферментов, в присутствии экзогенных цис- и транс-ЖК*

В отличие от растительных, ткани животных обладают весьма ограниченной способностью превращать насыщенные ЖК в ненасыщенные.

Установлено, что две наиболее распространенные мононенасыщенные ЖК – пальмитоолеиновая (C16 : 1) и олеиновая (C18 : 1) – синтезируются из пальмитиновой (C16 : 0) и стеариновой (C18 : 0) кислот под действием ферментов десатурации и элонгазы. Процессы десатурации и элонгации (удлинения) происходят попеременно и многократно повторяются. На рис. 3 представлены пути превращения пальмитиновой кислоты в реакциях десатурации и элонгации.

*Стеароил-КоА-десатураза (SCD1)* – интегральный фермент, который катализирует образование двойной связи между 9 и 10 атомами углерода в ЖК. Десатурация с SCD1 всегда ведет к образованию *цис*- двойной связи [20].

*Элонгаза жирных кислот Elovl6* была идентифицирована, клонирована и охарактеризована в 2001–2002 годах [21, 22]. Elovl6 удлиняет насыщенные и мононенасыщенные ЖК. Этот фермент, так же как и десатураза SCD1, играет определяющую роль в изменении состава липидов клеточных мембран и процессах метаболизма ЖК в клетках, так как его действие влияет на соотношение C16 и C18 ЖК [23, 24]. Ингибирование действия фермента элонгации (Elovl6) приводит к

преимущественной десатурации насыщенных ЖК с образованием мононенасыщенных *цис*-ЖК.

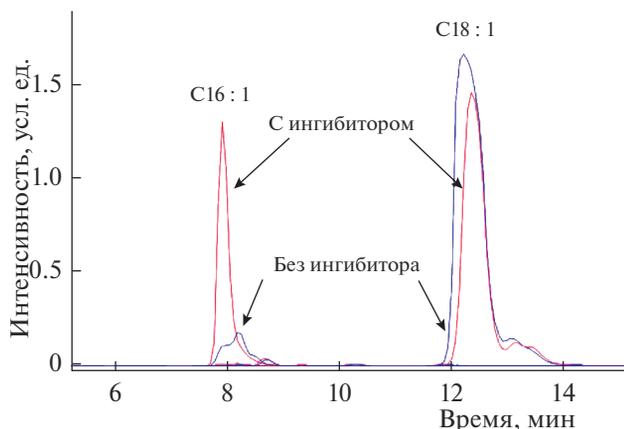
При проведении ВЭЖХ-МС анализа кислоты C18 : 1 в раковых клетках, культивированных в отсутствие ингибитора, можно определить суммарное содержание эндогенной *цис*-ЖК C18 : 1 и экзогенных *цис*- и *транс*-C18 : 1. При этом не представляется возможным отделить эндогенно образовавшуюся кислоту от экзогенных. Однако это возможно в случае, если дополнительно провести анализ тех же клеток, но культивированных в присутствии ингибитора фермента элонгазы. При этом образование кислоты C18 : 1 по эндогенному механизму практически подавлено и, следовательно, площадь хроматографического пика, соответствующего этой кислоте, уменьшается. В этом случае указанный пик соответствует уже не суммарному содержанию эндогенной и экзогенной кислот, а только *цис*- и *транс*-C18 : 1, поступившим из пищи. Таким образом, по разности площадей хроматографических пиков кислоты C18 : 1, выделенной из клеток, культивированных в отсутствие ингибитора и в присутствии его, можно определить суммарное содержание эндогенной *цис*-ЖК C18 : 1 в клетках. То есть, таким способом возможно отделить *цис*-ЖК, образующиеся в организме, от смеси *цис*- и *транс*-ЖК, поступающих из пищи.

Аналогично эксперименту, описанному выше, можно также провести ингибирование фермента десатуразы SCD1. При этом эндогенное образование *цис*-C16 : 1 подавлено и весь хроматографический пик, соответствующий этой кислоте, будет отвечать только экзогенным *цис*- и *транс*-C16 : 1. Необходимо вычислить площади пиков, соответствующих этой кислоте, в случае анализа клеток, культивированных без ингибитора и с ним. Разность найденных площадей будет соответствовать эндогенно образующейся *цис*-C16 : 1.

*Определение эндогенной цис-ЖК C18 : 1 в присутствии экзогенных цис- и транс-ЖК C18 : 1 в раковых клетках*

На хроматограмме, полученной при исследовании образцов клеток, культивированных в отсутствие ингибитора (рис. 4), пик, соответствующий ЖК C16 : 1, отвечает смеси эндогенно образовавшихся *цис*-ЖК и экзогенно поступивших в организм *цис*- и *транс*-ЖК. Аналогично для кислоты C18 : 1: соответствующий ей пик отвечает *цис*-ЖК C18 : 1, образовавшейся из C16 : 1 под действием Elovl6 и из C18 : 0 под действием SCD1. Отделить только по этой хроматограмме эндогенные *цис*-ЖК от экзогенных *цис*- и *транс*-ЖК не представляется возможным.

На хроматограмме образцов, культивированных в присутствии ингибитора Elovl6, пик, соот-



**Рис. 4.** Наложение хроматограмм образцов раковых клеток, полученных в присутствии и в отсутствии ингибитора элонгазы Elovl6 на стадии культивирования. Детектирование в режиме выбранных ионов, соответствующих анионам кислот.

ветствующий кислоте C16 : 1, значительно выше, чем в первом случае, за счет того, что удлинение ЖК было практически подавлено, а, значит, почти все кислоты подвергались десатурации с образованием мононенасыщенной ЖК. Площадь пика, соответствующего кислоте C18 : 1, напротив, падает в эксперименте, проведенном в присутствии ингибитора, за счет того, что ЖК теперь преимущественно десатурирует, а не удлиняется, доля эндогенных *цис*-C18 : 1 оказывается незначительной. А значит, можно утверждать, что разница площадей пиков C18 : 1 в первом и втором экспериментах (культивирование в отсутствии и в присутствии ингибитора) отвечает эндогенно образующейся в организме кислоте *цис*-C18 : 1. Такой подход дает возможность проводить определение эндогенной *цис*-кислоты в присутствии экзогенных *цис*- и *транс*-кислот C18 : 1.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложен подход к количественному определению *цис*-ЖК эндогенного происхождения в смеси с *цис*- и *транс*-ЖК экзогенного происхождения без хроматографического разделения пространственных изомеров.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Christie W.W. // *Lipids*. 1998. Is. 4. V. 33. P. 343.
2. Zelles L. // *Biology and Fertility of Soils*. 1999. I. 2. V. 29. P. 111.
3. Jemal A., Bray F., Ward E. et al. // *A Cancer J. Clinicians. Global Cancer Statistics*. 2011. I. 2. V. 61. P. 69.
4. Slattery M.L., Benson J., Ma K. et al. // *Nutrition and Cancer*. 2001. I. 2. V. 39. P. 170.
5. Gebauer S.K., Chardigny J.M., Jakobsen M.U. et al. // *Advances in Nutrition*. 2011. I. 4. V. 2. P. 332.
6. Liu W.H., Inbaraj B.S., Chen B.H. // *Food Chemistry*. 2007. I. 4. V. 104. P. 1740.
7. Katan M.B., Zock P.L., Mensink R.P. // *Annual Review of Nutrition*. 1995. V. 15. P. 473.
8. Costa T.G., Castilho H.S., Sanches S.A. // *Trends in Food Science and Technology*. 2011. V. 22. P. 543.
9. Roach J.A., Mossoba M.M., Yuraweczka M.P. et al. // *Analytica Chimica Acta*. 2002. V. 465. P. 207.
10. Berdeaux O., Dutta P.C., Dobarganes M.C. et al. // *Food Analytical Methods*. 2009. V. 2. P. 30.
11. Zhang M., Yang X., Zhao H.T. et al. // *Food Control*. 2015. V. 57. P. 293.
12. Kulsing C., Nolvachai Y., Zeng A.X. et al. // *ChemPlus-Chem* 2014. I. 79. V. 6. P. 790.
13. Christie W.W., Grace H.M. // *J. Chromatography A*. 1989. V. 469. P. 261.
14. Kraft J., Kramer J.K., Hernandez G. et al. // *Lipid Technology*. 2014. I. 26. V. 2. P. 39.
15. Stolyhwo A., Rutkowska J. // *Food Anal. Methods*. 2013. V. 6. P. 457.
16. Kyle J.E., Zhang X., Weitz K.K. et al. // *Analyst*. 2016. I. 141. V. 5. P. 1649.
17. Damen C.W., Isaac G., Langridge J. et al. // *J. Lipid Research*. 2014. V. 22. P. 382.
18. Захарова Г.С., Полозников А.А., Астахова Л.А. и др. // *Известия АН. Серия химическая*. № 12. С. 2307.
19. Mutay A., Özcan F., Aslan I. et al. // *Lipids in Health and Disease*. 2013. I. 3. V. 169. P. 189.
20. Gutiérrez-Juárez R., Pocaí A., Mulas C. // *J. Clin. Invest.* 2006. V. 169. P. 1686.
21. Moon Y.A., Shah N.A., Mohapatra S. et al. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 45358.
22. Matsuzaka T., Shimano H., Yahagi N. et al. // *J. Lipid Res.* V. 43. P. 911.
23. Green C.D., Ozguden-Akkoc C.G., Wang Y. et al. // *J. Lipid Res.* 2010. V. 51. P. 1871.
24. Shi H.B., Wu M., Zhu J.J., Zhang C.H. // *J. Dairy Sci.* 2017. V. 100. P. 4987.