

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПАЛЬМИТОКСИАЦЕТОНА И СТЕАРОКСИАЦЕТОНА В ОБРАЗЦАХ СЫВОРОТКИ КРОВИ, МОЧИ, ЖЕЛЧИ И ПЕЧЕНИ

Хруцкий В. Ю.

*младший научный сотрудник лаборатории химии свободнорадикальных процессов Учреждения Белорусского государственного университета «Научно-исследовательский институт физико-химических проблем», Минск
e-mail для контактов: rv.khruskin@gmail.com*

Едимечева И. П.

кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории химии свободнорадикальных процессов Учреждения Белорусского государственного университета «Научно-исследовательский институт физико-химических проблем», Минск

Федорук А. М.

доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом гепатологии и малоинвазивной хирургии Государственного учреждения «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии», Минск

Кирковский Л. В.

кандидат медицинских наук, доцент, заведующий отделением гепатобилиарной хирургии и портальной гипертензии Государственного учреждения «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии», Минск

Федорук Д. А.

кандидат медицинских наук, врач-хирург отделения гепатобилиарной хирургии и портальной гипертензии Государственного учреждения «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии», Минск

Аннотация. Цель работы заключалась в идентификации продуктов свободнорадикальной фрагментации лизоглицерофосфолипидов, пальмитоксиацетона и стеароксиацетона, в различных типах биоматериала, таких как образцы сыворотки крови, мочи, желчи и печени, методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием с использованием химически синтезированного маргароксиацетона в качестве суррогатного стандарта. Во всех образцах биоматериала было подтверждено наличие аналитов, что позволяет рассматривать их применение в качестве маркеров интенсивности свободнорадикальных

процессов при гипоксии, сопровождающей различные патологические процессы. На данный момент оптимальной по доступности и простоте получения для количественного определения исследуемых аналитов выступает сыворотка крови.

Ключевые слова: пальмитоксиацетон; стеароксиацетон; сыворотка крови; моча; желчь; печень; газовая хроматография.

CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF PALMITOXYACETONE AND STEAROXYACETONE IN BLOOD SERUM, URINE, BILE AND LIVER SAMPLES

Khrutskiy V. Y.

*Junior Researcher, Laboratory of Chemistry of Free Radical Processes, Institution of the Belarusian State University «Research Institute of Physical Chemical Problems», Minsk
e-mail for contacts: rv.khruckin@gmail.com*

Edimecheva I. P.

Candidate of Chemical Sciences, Leading Researcher, Laboratory of Chemistry of Free Radical Processes, Institution of the Belarusian State University «Research Institute of Physical Chemical Problems», Minsk

Fedoruk A. M.

Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Hepatology and Minimally Invasive Surgery, State Institution «Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology», Minsk

Kirkovsky L. V.

Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Head of the Department of Hepatobiliary Surgery and Portal Hypertension, State Institution «Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology», Minsk

Fedoruk D. A.

Candidate of Medical Sciences, Surgeon of the Department of Hepatobiliary Surgery and Portal Hypertension, State Institution «Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology», Minsk

Annotation. *The goal of research was to identify the products of free radical fragmentation of lysoglycerophospholipids, palmitoxyacetone and stearoxyacetone, in various types of biomaterials, such as blood serum, urine, bile and liver samples, by gas chromatography with mass spectrometric detection using synthesized margaroxyacetone as a surrogate standard. The presence of analytes was confirmed in all biomaterial samples, which allows us to consider their use as markers of*

intensity of free radical processes during hypoxia accompanying various pathological processes. At the moment, blood serum is optimal in terms of availability and ease of obtaining for quantitative determination of the analytes.

Keywords: *palmitoxyacetone; stearoxyacetone; blood serum; urine; bile; liver; gas chromatography*

Выход продуктов реакций свободнорадикальной фрагментации (СРФ) в отличие от иных реакций свободнорадикального окисления, таких как пероксидное окисление липидов, возрастает с понижением содержания молекулярного кислорода в системе [1]. При этом определенные реакции СРФ лизофосфолипидов являются источником маркеров, ферментативный путь образования которых в организме человека не известен и по накоплению которых можно оценивать интенсивность СРФ при гипоксии. В частности, при СРФ 1-ацил-2-лизо-sn-глицеро-3-фосфолипидов образуются такие ацилацетоны, как пальмитоксиацетон (ПА; 2-оксопропилгексадеканоеат) и стеароксиацетон (СА; 2-оксопропилгептадеканоеат) [2]. Для рассмотрения ПА и СА в качестве маркеров *in vivo* необходимо подтвердить их наличие в различных типах биоматериала.

Цель исследования заключалась в идентификации продуктов свободнорадикальной фрагментации лизоглицерофосфолипидов, пальмитоксиацетона и стеароксиацетона, в различных типах биологического материала, таких как образцы сыворотки крови, мочи, желчи и печени.

Анализ содержания маркеров свободнорадикальной фрагментации проводили методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu, Япония) с применением в качестве суррогатного стандарта химически синтезированного маргароксиацетона (МА; 2-оксопропилгептадеканоеат), добавленного в образцы перед проведением пробоподготовки. Пробоподготовка образцов сыворотки крови и желчи включала осаждение белков метанолом с добавлением 10% от массы пробы хлорида натрия с целью улучшения межфазового разделения, центрифугирование и экстракцию аналитов гексаном, продувание аргоном до образования липидной пленки и растворение в точном объеме изопропилового спирта. В аналогичной процедуре для образцов мочи в качестве экстрагента и растворителя применяли диэтиловый эфир. Образцы печени после размораживания предварительно высушивали при комнатной температуре и механически гомогенизировали, после чего добавляли МА, экстрагировали аналиты гексаном на ультразвуковой бане в течение 1 ч и получали пленку липида. Хроматографирование образцов сыворотки крови и печени проводили в

режиме мониторинга заданных ионов (SIM) на колонке RTX-65-TG (Restek, USA), образцов мочи и желчи – на колонке Stabilwax DA (Restek, USA). Идентификацию проводили в соответствии с масс-спектрами для стандартных растворов по характеристическим ионам с m/z 98, 116, 239, 253, 267 (рис. 1), полученных в режиме полного сканирования (scan).

Результаты по содержанию аналитов в биоматериале представлены в таблицах 1 и 2. Среди проанализированных образцов, только в образцах мочи содержание стеароксиацетона составило ниже предела количественного определения, поэтому для применения проб мочи в анализе необходимо проводить их концентрирование.

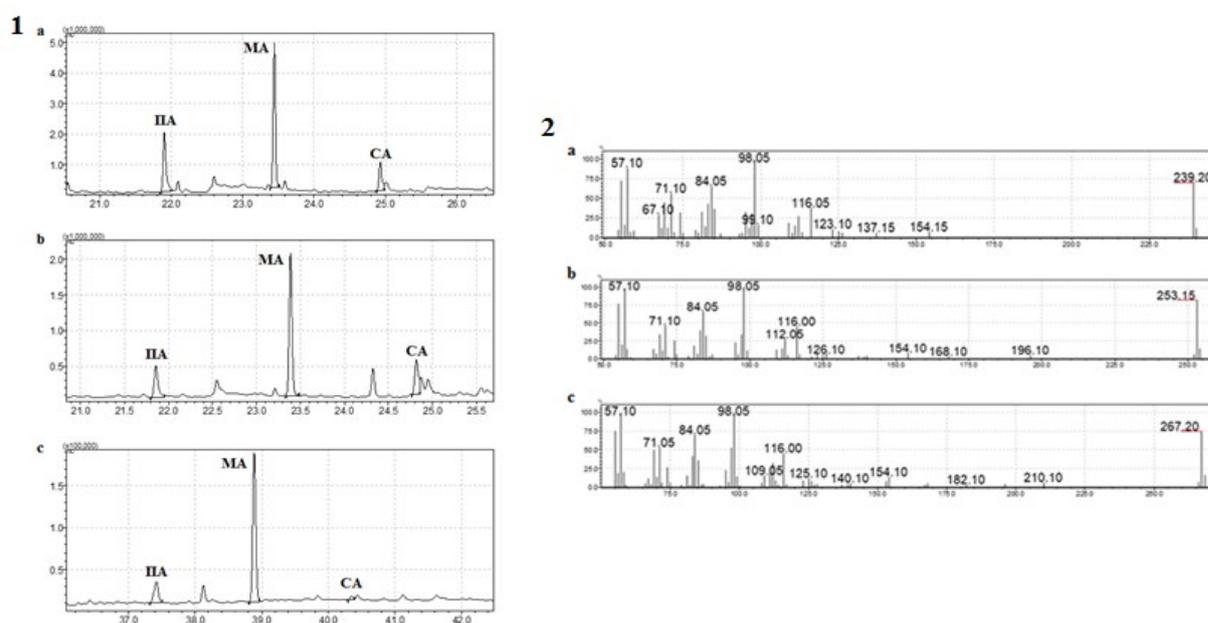


Рисунок 1 – Хроматограммы (1) образцов сыворотки крови (а), печени (b) на колонке RTX-65-TG и желчи (с) на колонке Stabilwax DA в режиме SIM и масс-спектры (2) ПА (а), МА (b) и СА (с) в градуировочном растворе с концентрацией аналита 10,0 мкмоль/л в режиме scan, колонка RTX-65-TG

Таблица 1 – Данные по концентрации пальмитоксиацетона и стеароксиацетона в образцах сыворотки крови, мочи и желчи

Тип исследуемого биоматериала	Концентрация ПА, мкмоль/л	Концентрация СА, мкмоль/л	Суммарная концентрация ПА и СА, мкмоль/л
-------------------------------	---------------------------	---------------------------	--

Образец сыворотки №1	6,07	2,77	8,84
Образец сыворотки №2	3,26	1,58	4,84
Образец сыворотки №3	1,92	0,97	2,89
Образец сыворотки №4	2,33	1,08	3,41
Образец сыворотки №5	3,26	1,39	4,65
Образец сыворотки №6	2,59	1,12	3,71
Образец сыворотки №7	4,64	1,81	6,45
Образец сыворотки №8	2,94	0,93	3,87
Образец сыворотки №9	1,99	0,89	2,88
Образец сыворотки №10	2,57	1,01	3,58
Образец мочи №1	0,20	< 0,1	< 0,30
Образец мочи №2	0,16	< 0,1	< 0,26
Образец мочи №3	0,41	< 0,1	< 0,51
Образец мочи №4	0,18	< 0,1	< 0,28
Образец мочи №5	0,18	< 0,1	< 0,28
Образец желчи №1	6,92	0,49	7,41
Образец желчи №2	9,14	0,39	9,53
Образец желчи №3	8,58	0,35	8,93

Таблица 2 – Данные по содержанию пальмитоксиацетона и стеароксиацетона в образцах печени

Тип исследуемого биоматериала	Содержание ПА, мкг/г	Содержание СА, мкг/г	Суммарное содержание ПА и СА, мкг/г
Образец печени №1	82,7	124,1	206,8
Образец печени №2	125,5	78,0	203,5
Образец печени №3	71,8	87,8	159,6

Полученные результаты свидетельствуют об наличии исследуемых аналитов в различных типах биоматериала, что позволяет рассматривать ПА и СА в качестве потенциальных биомаркеров для анализа интенсивности свободнорадикальных процессов при гипоксии и их взаимосвязь с сопровождаемыми гипоксией патологическими изменениями.

Таким образом, в результате количественного анализа ПА и СА были идентифицированы во всех образцах сыворотки крови, мочи, желчи и печени. Наиболее оптимальным выбором из различных типов биоматериала с учетом доступности, простоты получения и липофильных свойств аналитов является сыворотка крови.

Исследование выполнено в рамках НИР № 20221204 по заданию «Разработать и внедрить метод медицинской профилактики дисфункции трансплантатов печени в раннем послеоперационном периоде» подпрограммы «Клеточная терапия и высокотехнологичные методы замещения поврежденных органов и тканей» ГНТП «Научно-техническое обеспечение качества и доступности медицинских услуг» на 2021 – 2025 годы. Образцы биоматериала были предоставлены от пациентов, проходивших обследование и лечение на базе Минского научно-практического центра хирургии, трансплантологии и гематологии в период с 2019 по 2022 г., после получения информированного согласия.

Список литературы

1. Shadyro O. I., Yurkova I. L., Kisel M. A. Radiation-induced peroxidation and fragmentation of lipids in a model membrane // International journal of radiation biology. – 2002. – Vol. 78, n. 3. – P. 211–217.
2. Shadyro O., Samovich S., Edimecheva I. Free-radical and biochemical reactions involving polar part of glycerophospholipids // Free Radical Biology and Medicine. – 2019. – Vol. 144. – P. 6–15.