

© Коллектив авторов, 2016
УДК 577.125.8:615.217.4+616.12-008.331.1

Сухоруков В.Н.¹, Камон Л.², Ломм М.², Карагодин В.П.^{1,3}, Чепмен Д.², Контуш А.², Орехов А.Н.^{1,3}

Модификация метода жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией для анализа липидома ЛПВП

¹ — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

² — «Национальный институт здоровья и медицинских исследований», подразделение 1166; «Университет Пьера и Марии Кюри», Париж, 6; Университетский госпиталь Питье-Сальпетриер, Госпитальный бульвар 83, 75651, Париж, Франция

³ — «НИИ атеросклероза» (Сколково), а/я №21, 121609, Москва, Россия

Цель. Цель исследования — создание универсальной методики для анализа липидома липопротеидов высокой плотности (ЛПВП). Так как фосфолипиды являются основными биоактивными липидами, входящими в состав ЛПВП, в ходе данного исследования был охарактеризован фосфосфинголипидом основных нормолипидемических подфракций ЛПВП. **Методика и ее модификация.** В статье приводятся основные методики, применяемые для анализа липидома, обосновывается выбор в пользу той или иной методики для использования в анализе липидома ЛПВП. На основе существующих методик анализа липидома была разработана оригинальная методика анализа липидома ЛПВП при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с ионизацией в электро-спрее с тандемной масс-спектрометрией (LC-ESI/MS/MS). Эта методика использовалась для анализа 5 нормолипидемических субпопуляций ЛПВП. **Заключение.** Разработанная методика позволила выявить 162 индивидуальные липидные молекулы, принадлежащие к 9 подклассам липидов, включая 23 вида фосфатидилхолина, 22 вида сфингомиелина, 9 видов лизофосфатидилхолина, 25 видов фосфатидилэтаноламина, 17 видов фосфатидилинозитола, 11 видов фосфатидилглицерина, 24 вида церамида, 18 видов фосфатидилсерина и 13 видов фосфатидной кислоты, в 5 нормолипидемических подфракциях ЛПВП и измерить концентрации этих молекул.

Ключевые слова: ВЭЖХ; масс-спектрометрия; ЛПВП; липидом; сфинголипиды; фосфолипиды

Для корреспонденции: Сухоруков Василий Николаевич, мл. науч. сотр. лаб. ангиопатологии, e-mail: vnsukhorukov@gmail.com

Для цитирования: Сухоруков В.Н., Камон Л., Ломм М., Карагодин В.П., Чепмен Д., Контуш А., Орехов А.Н. Модификация метода жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией для анализа липидома ЛПВП. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(3): 95–100.

Финансирование. Работа проведена при финансовой поддержке Национального института здоровья и медицинских исследований (INSERM, Франция) и CODDIM Ile-de-France (Париж, Франция) с участием Минобрнауки России (проект RFMEFI61614X0010).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 31.07.15

Sukhorukov V.N.¹, Camont L.², Lhomme M.², Karagodin V.P.¹,
Chapman M.J.², Kontush A.², Orekhov A.N.^{1,3}

Novel liquid chromatography-mass spectrometry method to analyze hdl lipidome

¹ — Institute of General Pathology and Pathophysiology, Russian Academy of Medical Sciences, 8, Baltiyskaya Str., 125315, Moscow, Russia

² — INSERM UMR 1166 ICAN, University of Pierre and Marie Curie — Paris 6, Pitie-Salpetriere University Hospital, 75651 Paris Cedex 13, Bd de l'Hopital 83

³ — Institute for Atherosclerosis Research, Skolkovo Innovative Center, PO Box #21, 121609, Moscow, Russia

Subject. High-density lipoprotein (HDL) is highly heterogeneous in function, structure, and composition. Components of HDL can be assayed using various techniques, including LC/MS approaches. The purpose of this study was to develop a novel method for the analysis of the HDL lipidome. Since phospholipids represent a major bioactive lipid component of HDL, the phosphosphingolipidome of major normolipidemic HDL subpopulations was characterized in this study. **Methods and Results.** The article describes the methodology used for the analysis of the HDL lipidome. Based on existing methods of lipidomic analysis, an original method of analyzing lipidome of HDL by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI/MS/MS) was developed. This technique was used to analyze the lipidome of five normolipidemic HDL subpopulations. **Conclusions.** The developed method allowed to identify and quantify 162 indi-

vidual molecular lipid species in five normolipidemic HDL subpopulations across nine lipid subclasses, including 23 phosphatidylcholine, 22 sphingomyelin, 9 lysophosphatidylcholine, 25 phosphatidylethanolamine, 17 phosphatidylinositol, 11 phosphatidylglycerol, 24 ceramide, 18 phosphatidylserine, and 13 phosphatidic acid species.

Keywords: HPLC; mass spectrometry; HDL; lipidome; sphingolipids; phospholipids

For correspondence: Sukhorukov V.N., Junior Researcher work Institute of General Pathology and Pathophysiology, Russian Academy of Medical Sciences, 8, Baltiyskaya Str., 125315, Moscow, Russian Federation, e-mail: vnsukhorukov@gmail.com.

For citation: Sukhorukov V.N., Camont L., Lhomme M., Karagodin V.P., Chapman M.J., Kontush A., Orekhov A.N. Novel liquid chromatography-mass spectrometry method to analyze hdl lipidome. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (3): 95–100. (in Russ).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. These studies were financially supported by INSERM (France) and CODDIM Ile-de-France (Paris, France), with a participation of the Ministry of Education of Russia (project RFMEFI61614X0010).

Information about authors:

Sukhorukov V.N., <http://orcid.org/0000-0002-0312-3773>

Karagodin V.P., <http://orcid.org/0000-0003-0501-8499>

Orekhov A.N., <http://orcid.org/0000-0002-6495-1628>

Received 31.07.15

Список сокращений:

ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография
 МС — масс-спектрометрия
 LC-ESI/MS/MS — ВЭЖХ с ионизацией в электроспрее с тандемной масс-спектрометрией
 ESI — электроспрей
 ЛПВП — липопротеиды высокой плотности
 ФЛ — фосфолипиды
 ФХ — фосфатидилхолин

ЛФХ — лизофосфатидилхолин
 ФЭ — фосфатидилэтанолламин
 ФИ — фосфатидилинозитол
 ФГ — фосфатидилглицерин
 ФС — фосфатидилсерин
 ФК — фосфатидная кислота
 СЛ — сфинголипиды
 СМ — сфингомиелин
 Цер — церамиды

Введение

Методика анализа липидома липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) состоит из двух основных этапов: этап разделения исследуемых молекул и этап детектирования этих молекул. Говоря об этапе разделения, нужно отметить, что в последние годы эталоном в изучении липидов стала методика высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). У этой методики есть две разновидности: обращенно-фазовая и нормально-фазовая хроматография. Обращенно-фазовая хроматография используется для разделения, основанного на разности в гидрофобности исследуемых молекул, тогда как нормально-фазовая хроматография применяется для разделения веществ в основном по разности их полярных компонентов [1–4].

Этап детектирования заключается в масс-спектрометрическом анализе. При помощи метода масс-спектрометрии (МС) липиды изучаются уже по меньшей мере в течение пятидесяти лет. Совместно с МС применяется множество методов ионизации: матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация

(MALDI) [5], электроспрей (ESI) [6], а также химическая ионизация при атмосферном давлении — АРСИ (и ее подвид с дополнительной фотоионизацией — АРПИ) [7]. В качестве масс-анализаторов применяются магнитный и электростатический секторный [1], квадрупольный [7] и времяпролетный [1] приборы, а также масс-анализаторы ионно-циклотронного резонанса с Фурье-преобразованием [8] и ионная ловушка [6]. Метод масс-спектрометрии — самый подходящий метод для анализа липидома, так как он обеспечивает:

- 1) высокий уровень специфичности определения сложных веществ посредством их молекулярной массы, особенно с использованием тандемной МС (МС/МС);
- 2) уровень чувствительности, который на порядки выше, чем у других методик, таким образом вещества могут быть обнаружены, даже если их количество составляет несколько фмоль;
- 3) сигнальный ответ, который может коррелировать с концентрацией анализируемого вещества при условии наличия надлежащим образом подобранных внутренних

стандартов для нормализации различий в ионизации и фрагментации отдельных видов молекул [1].

На сегодняшний день самой подходящей для анализа липидома комбинацией является методика ВЭЖХ с ионизацией в электроспрее, в комбинации с тандемной масс-спектрометрией (LC-ESI/MS/MS) [9-11]. При ионизации методом электроспрея жидкость (изучаемые соединения с растворителем) вырывается под давлением вместе с коаксиально подаваемым разогретым газом (азотом) с высокой скоростью из узкого капилляра или иглы, которая находится под повышенным потенциалом в 1-6 кВ, и прямо в этой струе мелкодисперсного тумана с электронных оболочек молекул срываются электроны, превращая молекулы в ионы. В зависимости от режима ионизации образуются положительные или отрицательные ионы, которые затем детектируются в масс-спектрометре [1]. ESI представляет собой метод мягкой ионизации (т.к. при этом образуются ионы с небольшой фрагментацией), и сигнальный ответ часто пропорционален концентрации анализируемого вещества, что практически идеально для количественного анализа. С электроспреем наиболее часто используются тандемные масс-спектрометры (MS/MS). Тандемный масс-спектрометр в общем случае представляет собой два объединенных масс-спектрометра; таким образом формирующиеся ионы из источника ионизации могут быть отобраны в первом масс-спектрометре, затем фрагментированы, и уже затем фрагменты этих ионов анализируются во втором масс-спектрометре. Фрагменты ионов предоставляют важную информацию о структуре и реакционной способности интактных молекулярных ионов, а также могут быть использованы в качестве опознавательного знака, который помогает идентифицировать нужные ионы интереса во втором масс-спектрометре, которые могут иметь такое же, или похожее, соотношение массы заряда, как и в первом масс-спектрометре.

Модификация методики

Для анализа липидома ЛПВП плазмы крови человека в подразделении 1166 Национального института здоровья и медицинских исследований (Париж, Франция) была разработана методика LC-ESI/MS/MS, которая позволяет одновременно анализировать более 160 липидных молекул. Эта методика была разработана путем модификации существующих методик LC-ESI/MS/MS с целью подбора условий для анализа фосфолипидов и сфинголипидов в одном эксперименте [1, 9, 10, 12, 13].

Целесообразность разработки данной методики заключается в том, что до ее появления не существовало подхода, позволяющего одновременно производить количественный анализ всех фосфо- и сфинголи-

пидных молекул, входящих в состав ЛПВП. Поэтому были подобраны такие условия для метода ESI-LC/MS/MS, которые позволили бы напрямую анализировать полностью все липидные молекулы, входящие в состав ЛПВП.

Материалы

В нашей работе, как и в исходных методиках, были использованы следующие липидные стандарты: 1-пальмитоил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолин (LPC 16:0), 1-стеароил-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфохолин (LPC 18:0), 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (PC 14:0/14:0), 1-миристоил-2-пальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (PC 14:0/16:0), 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (PC 16:0/16:0), 1-пальмитоил-2-стеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (PC 16:0/18:0), 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (PC 16:0/18:1), 1-пальмитоил-2-линолеил-sn-глицеро-3-фосфохолин (PC 16:0/18:2), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (PC 18:0/18:0), 1-стеароил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (PC 18:0/18:1), 1-стеароил-2-линолеил-sn-глицеро-3-фосфохолин (PC 18:0/18:2), 1-стеароил-2-арахидоноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (PC 18:0/20:4), 1-пальмитоил-2-докозагексаноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (PC 16:0/22:6), 1-стеароил-2-докозагексаноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (PC 18:0/22:6), 1-стеароил-АПБ-2-гидрокси-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин (LPE 18:0), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин (PE 18:0/18:0), 1-гептадеканоил-2-9Z-тетрадеценил-sn-глицеро-3-фосфо-1'-мио-инозит (PI 17:0/14:1), N-стеароил-D-эритро-сфингозин (CerD 18:1/18:0), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфат (PA 18:0/18:0), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфо-1'-рац-глицерин (PG 18:0/18:0) и 1-пальмитоил-2-линолеил-sn-глицеро-3-фосфо-L-серин (PS 16:0/18:2) были куплены у AvantiPolarLipids (Alabaster, AL, USA). Применяемые стандарты соответствуют исследуемым веществам.

Градиентные растворители для ВЭЖХ/МС были получены от Sigma-Aldrich (Сент-Луис, штат Миссури, США) или VWR (WestChester, PA, USA) и использованы без дальнейшей очистки.

Подготовка проб

Пять подфракций ЛПВП были выделены из нормолипидемических образцов человеческой плазмы методом изопикнического ультрацентрифугирования в градиенте плотности [14]. Липиды были экстрагированы из субпопуляций ЛПВП согласно адаптированной методике, описанной Лариджани [15]. Для этого 30 мкг общей массы фосфолипидов, определенных при помощи коммерческого теста, были добавлены к 4 мл холодного CHCl_3 /подкисленного CH_3OH

(5:2 об/об), содержащего следующие стандарты: 4 мкг РСd9 32:0, 100 нгРІ 25:0, 80 нг РЕ 25:0, 80 нг РА 25:0, 40 нг PS 25:0, 20 нг РС 25:0 и 20 нг Сер 17:0. Негативный контроль (натрий-фосфатный буфер) и положительный контроль (ЛПВП2, полученные из нормолипидемической плазмы) были экстрагированы параллельно с каждой партией проб для обеспечения контроля качества; каждый образец был нормирован относительно отрицательного контроля. Был добавлен раствор K₄EDTA (200 мМ) (1:5 об/об), и смесь была перемешана на вортексе в течение 1 мин и центрифугирована при 3600g в течение 10 мин при 4°C. Органическая фаза была перенесена в 5 мл стеклянные пробирки и высушена в атмосфере азота. Липиды были восстановлены в 150 мкл смеси изопропанол/гексан/вода (вместо этилацетата использовали гексан) (10:5:2 об/об), перенесены в затемненные виалы со вставками, высушены в атмосфере азота и ресуспендированы в 40 мкл смеси изопропанол/гексан/вода (10:5:2 об/об). Липидные молекулы были проанализированы и количественно измерены с помощью ВЭЖХ/МС/МС.

Анализ

Семь основных подклассов фосфолипидов: фосфатидилхолин (ФХ), лизофосфатидилхолин (ЛФХ) фосфатидилэтанолламин (ФЭ), фосфатидилинозитол (ФИ), фосфатидилглицерин (ФГ), фосфатидилсерин (ФС) и фосфатидная кислота (ФК) и два основных подкласса сфинголипидов (СЛ) (сфингомиелин (СМ) и церамиды (Цер)), которые в совокупности содержат более 160 видов индивидуальных липидных молекул и отвечают за 95% всех ФЛ и СМ плазмы, анализировали с помощью метода ВЭЖХ тандемной масс-спектрометрии. Подклассы липидов подразделяются на основные (те, содержание которых больше 1% от общего числа ФЛ+СЛ, то есть ФХ, СМ, ЛФХ, ФЭ и ФИ) и миноритарные (те, содержание которых меньше 1% от общего числа ФЛ+СЛ, то есть, ФГ, Цер, ФС и ФК) [16].

Количественная оценка липидов была проведена при помощи метода жидкостной хроматографии с ионизацией распылением в электроспрее с масс-спектрометрическим анализом с использованием масс-спектрометра QTrap 4000 (AB Sciex, Framingham, MA, USA), оснащенного турбоисточником ионизации в электроспрее (работающего при 300°C), объединенного с системой ВЭЖХ LC20AD, автоматическим пробоотборником SIL-20AC (Shimadzu, Kyoto, Japan) и системой сбора данных Analyst 1.5 (AB Sciex, Framingham, MA, USA). В методиках, взятых за основу, указано, что температуру источника ионов можно изменять в диапазоне от 300 до 500°C в зависимости от состава

растворителя и масс-спектрометра [9]. Для целей данного исследования после ряда пробных экспериментов температура 300°C оказалась наиболее подходящей для ионизации ионов. Ионизация в электросрее была выбрана как самый подходящий способ ионизации липидов, так как при этом способе максимально минимизируется фрагментация исследуемого вещества при ионизации [1]. В соответствии с рекомендациями, приведенными в оригинальных статьях, был выбран способ ионизации для фосфолипидов и сфинголипидов [9, 17]. В итоге после оптимизации метода для всех ФЛ и СЛ была выбрана положительная ионизация, за исключением ФИ, для которого больше подходила отрицательная ионизация. Измерение ФЛ и СЛ осуществлялось в режиме положительно заряженных ионов, за исключением ФИ, который измеряли в режиме отрицательно заряженных ионов. В качестве способа ионизации был выбран электроспрей, или ионизация распылением в электрическом поле (ESI, англ. electrospray ionization) — метод, применяемый в масс-спектрометрии для получения ионов в газовой фазе из раствора [12].

В зависимости от природы биологического образца могут быть использованы различные условия хроматографического разделения СЛ и ФЛ. Так, в зависимости от наличия разного типа СЛ и ФЛ, могут быть использованы хроматографические колонки различной длины от 50 до 250 мм [9, 18]. Для разделения основных классов липидов (ФЛ и СЛ) достаточно использовать короткую колонку (50 мм). При хроматографическом разделении сфинголипидов и фосфолипидов используется как нормально-фазовая, так и обращенно-фазовая ВЭЖХ. Например, сфингоидные основания, 1-фосфаты сфингоидных оснований и церамид-1-фосфаты анализируются при помощи обращенно-фазовой хроматографии с использованием колонки Supelco 2.1 (i.d.) x 50 mm Discovery C18 (Sigma, St. Louis, MO) и бинарной системы растворителей при скорости потока 1 мл/мин. Если эта скорость потока не позволяет осуществить полную десольватацию (как правило, при зубчатом профиле элюции), скорость потока может быть уменьшена и/или скорость потока газового источника ионов может быть увеличена. Церамиды, сфингомиелин, моногексоцилцерамиды и дигексоцерамиды анализируются с использованием нормально-фазовой ВЭЖХ при помощи колонки Supelco 2.1 (i.d.) x 50 mm LC-NH₂ при скорости потока 1 мл/мин [9, 10]. Выбор колонки (обращенно-фазовая, нормально-фазовая) зависит от растворителей, используемых для экстракции образца. Так как для экстракции образцов в данной работе были использованы, в основном, полярные растворители (изопропанол, вода), то для ВЭЖХ использовалась колонка для обращенно-фа-

зовой хроматографии SymmetryShield RP8 3,5 мкм 2,1x50 мм (Waters Corporation, Milford, MA, USA). В методиках, описанных ранее, для ВЭЖХ использовали скорость потока от 0,02 мл/мин до 1 мл/мин [1, 11, 13]. На основе этих данных была проведена оптимизация скорости потока под задачи данной работы, наилучшего результата удалось добиться при скорости 0,1 мл/мин.

На практике для получения ESI масс-спектров используют такие полярные и относительно летучие растворители, как вода, метанол или ацетонитрил [19, 20]. Для усиления процесса образования протонированных частиц к растворам объекта анализа часто добавляют органические кислоты (например, муравьиную кислоту), соли аммония (ацетат или формиат) и гидроксид лития [21]. Эти растворители используются и как мобильная фаза в ВЭЖХ [19]. В данной работе наилучшие результаты давало использование метанола и воды, содержащих 5мМ формиат аммония и 0,1% муравьиную кислоту.

В настоящей методике хроматография проводится при следующих условиях: образец (4 мкл) вводят в колонку SymmetryShield RP8 3,5 мкм 2,1x50 мм с использованием градиента растворителей от 85:15 до 91:9 (об/об) метанол/вода, содержащего 5 мМ формиата аммония и 0,1% муравьиную кислоту при скорости потока в 0,1 мл/мин в течение 30 мин.

Масс-спектрометрия

Различные виды липидов выявлялись с использованием мониторинга нескольких реакций, отражающего фрагментацию полярной группы молекулы каждого класса липидов [17, 22, 23]. В методике, взятой за основу, сфинголипиды были проанализированы с помощью метода ВЭЖХ ESI-МС в режиме положительной ионизации с использованием тройного квадрупольного масс-спектрометра ABI 3000 для сложных сфинголипидов (церамиды, СМ и моногексозилцерамиды). Сфингоидные основания и 1-фосфат-сфингоидные основания были исследованы на масс-спектрометре MDS SCIEX 4000 Q Trap. Фосфолипиды анализировали при помощи масс-спектрометра AppliedBiosystems/MDS SCIEX 4000 QTRAP с ионной ловушкой (AppliedBiosystems, FosterCity, CA) [10]. В настоящей работе все виды липидных молекул анализировали на одном тройном квадрупольном масс-спектрометре с ионной ловушкой QTrap 4000 (AB Sciex, Framingham, MA, USA). ФХ, ЛФХ и СМ выявлялись как ионы с соотношением массы к заряду (m/z) 184, ФЭ, ФС, ФГ и ФК как нейтральные потери с m/z 141, 185, 189 и 115 соответственно, а ФИ как ион с m/z -241. Определение этих молекул осуществлялось согласно стандартным методикам [17, 24]. Воздух использова-

ли в качестве газа для создания дисперсии образца, а N_2 как газ для создания ионов исследуемых веществ. ФЭ, ФС, ФГ, ФИ, ФК и Цер наблюдались по 18 мс; ФХ, ЛФХ и СМ наблюдались по 30 мс в разрешении 0,7 атомных единиц массы на половину высоты пика.

Определение концентраций

Липиды количественно определяли с использованием калибровочных кривых, созданных для каждого из девяти индивидуальных липидных классов, имеющих до 12 различных жирнокислотных остатков. 23 калибровочные кривые были созданы в неразбавленных, 10- и 100-кратно разбавленных матрицах для коррекции матрица-индуцированных ион-подавляющих эффектов. Липиды, которые показывали нелинейный ответ в неразбавленных экстрактах, были измерены в 10- или 100-кратно разбавленных образцах. Для компиляции данных из трех отдельных измерений был использован собственный скрипт для Excel (Microsoft Office 2010, Redmond, WA, USA). Коэффициенты вариации для анализируемых липидов, рассчитанные в одном образце ЛПВП, выделенном из пула нормолипидемической плазмы, были <10% для всех проанализированных подклассов липидов.

Заключение

Методики, взятые за основу данного исследования, позволяли статистически значимо оценивать лишь отдельные классы липидов, тогда как задача состояла в одновременной оценке всех видов липидных молекул. В результате проведенных модификаций методики, предназначенные для анализа разных классов липидных молекул, были объединены в один метод. В итоге данный метод позволил идентифицировать и измерить 162 разные липидные молекулы в 5 нормолипидемических подфракциях ЛПВП. Эти молекулы относятся ко всем 9 подклассам липидов, включая в себя 23 ФХ, 22 СМ, 9 ЛФХ, 25 ФЭ, 17 ФИ, 11 ФГ, 24 Цер, 18 ФС и 13 ФА. Разновидности ФХ были основными видами, составляя от 74% до 80% от общего количества ФЛ+СЛ, следующими по количеству были СМ (14—20%), ЛФХ (1,5—3,3%), ФИ (1,6—2,0%), ФЭ (1,4—2,1%), Цер (0,11—0,19%), ФС (0,03—0,63%), ФГ (0,011—0,015%) и ФА (0,010—0,025%) [3, 25].

Таким образом, настоящая модификация существующих методик позволила использовать для анализа состава ЛПВП не несколько подходов, а один, что существенно упрощает и ускоряет исследование липидома ЛПВП плазмы крови человека.

References

- Merrill A.H. Jr., Sullards M.C., Allegood J.C., Kelly S., Wang E. Sphingolipidomics: high-throughput, structure-specific, and quantitative analysis of sphingolipids by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Methods*. 2005; 36(2): 207-24.
- Orekhov A.N., Mukhamedova N.M., Sviridiov D.D., Karagodin V.P., Melnichenko A.A., Myasoedova V.A. et al. Study of anti-inflammatory effect of high density lipoproteins. *Pathogenesis*. 2012; 10(2): 83-90. (In Russian)
- Camont L., Lhomme M., Rached F., Le Goff W., Negre-Salvayre A., Salvayre R. et al. Small, dense high-density lipoprotein-3 particles are enriched in negatively charged phospholipids: relevance to cellular cholesterol efflux, antioxidative, antithrombotic, anti-inflammatory, and antiapoptotic functionalities. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013; 33(12): 2715-23.
- Melnichenko A.A., Orekhova V.A., Sobenin I.A., Karagodin V.P., Orekhov A.N. Development of novel cell models for the evaluation of cholesterol efflux. *Patogenez*. 2013; 11(4): 39-48. (In Russian)
- Hunnam V., Harvey D.J., Priestman D.A., Bateman R.H., Bordoli R.S., Tyldesley R. Ionization and fragmentation of neutral and acidic glycosphingolipids with a Q-TOF mass spectrometer fitted with a MALDI ion source. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2001; 12(11): 1220-5.
- Houjou T., Yamatani K., Nakanishi H., Imagawa M., Shimizu T., Taguchi R. Rapid and selective identification of molecular species in phosphatidylcholine and sphingomyelin by conditional neutral loss scanning and MS3. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2004; 18(24): 3123-30.
- Butovich I.A. Lipidomic analysis of human meibum using HPLC-MSn. *Methods Mol Biol*. 2009; 579: 221-46.
- Ishida M., Yamazaki T., Houjou T., Imagawa M., Harada A., Inoue K., Taguchi R. High-resolution analysis by nano-electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for the identification of molecular species of phospholipids and their oxidized metabolites. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2004; 18(20): 2486-94.
- Shaner R.L., Allegood J.C., Park H., Wang E., Kelly S., Haynes C.A. et al. Quantitative analysis of sphingolipids for lipidomics using triple quadrupole and quadrupole linear ion trap mass spectrometers. *J Lipid Res*. 2009; 50(8):1692-707.
- Quehenberger O., Armando A.M., Brown A.H., Milne S.B., Myers D.S., Merrill A.H. et al. Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma. *J Lipid Res*. 2010; 51(11): 3299-305.
- Bui H.H., Leohr J.K., Kuo M.S. Analysis of sphingolipids in extracted human plasma using liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Biochem*. 2012; 423(2): 187-94.
- Ivanova P.T., Milne S.B., Byrne M.O., Xiang Y., Brown H.A. Glycerophospholipid identification and quantitation by electrospray ionization mass spectrometry. *Methods Enzymol*. 2007; 432: 21-57.
- Ogiso H., Suzuki T., Taguchi R. Development of a reverse-phase liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry method for lipidomics, improving detection of phosphatidic acid and phosphatidylserine. *Anal Biochem*. 2008; 375(1): 124-31.
- Chapman M.J., Goldstein S., Lagrange D., Laplaud P.M. A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum. *J Lipid Res*. 1981; 22(2): 339-58.
- Larijani B., Poccia D.L., Dickinson L.C. Phospholipid identification and quantification of membrane vesicle subfractions by 31P-1H two-dimensional nuclear magnetic resonance. *Lipids*. 2000; 35(11): 1289-97.
- Chernova E.V., Sobenin I.A., Melnichenko A.A., Karagodin A.P., Orekhov A.N. Serum atherogenicity as a pathogenetic target for direct anti-atherosclerotic therapy. *Pathogenesis*. 2013; 11(2): 28-41.
- Nakanishi H., Ogiso H., Taguchi R. Qualitative and quantitative analyses of phospholipids by LC-MS for lipidomics. *Methods Mol Biol*. 2009; 579: 287-313.
- Temchenko A.V., Nikiforov N.G., Orekhova V.A., Melnichenko A.A., Karagodin V.P., Sobenin I.A. et al. Achievements in therapy of atherosclerosis. *Pathogenesis*. 2013; 11(2): 11-8.
- Xia Y.Q., Jemal M. Phospholipids in liquid chromatography/mass spectrometry bioanalysis: comparison of three tandem mass spectrometric techniques for monitoring plasma phospholipids, the effect of mobile phase composition on phospholipids elution and the association of phospholipids with matrix effects. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2009; 23(14): 2125-38.
- Titov V.N. Statin-induced inhibition of cholesterol synthesis in liver and very low density lipoproteins. Statins, fatty acids and insulin resistance. *Pathogenesis*. 2013; 11(1): 18-26.
- Henderson M.A., McIndoe J.S. Ionic liquids enable electrospray ionisation mass spectrometry in hexane. *Chem Commun (Camb)*. 2006; (27): 2872-4.
- Bielawski J., Pierce J.S., Snider J., Rembiesa B., Szulc Z.M., Bielawska A. Comprehensive quantitative analysis of bioactive sphingolipids by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Methods Mol Biol*. 2009; 579: 443-67.
- Sobenin I.A., Karagodin V.P., Mel'nichenko A.A., Orekhov A.N. Cholesterol of circulating immune complexes as biomarker of atherosclerosis. *Patol Fiziol Eksp Ter*. 2012; (3): 99-103. (In Russian)
- Pulfer M., Murphy R.C. Electrospray mass spectrometry of phospholipids. *Mass Spectrom Rev*. 2003; 22(5): 332-64.
- Kontush A., Lindahl M., Lhomme M., Calabresi L., Chapman M.J., Davidson W.S. Structure of HDL: particle subclasses and molecular components. *Handb Exp Pharmacol*. 2015; 224: 3-51.

Сведения об авторах:

Карагодин Василий Петрович, доктор биол. наук, проф., вед. науч. сотр. лаб. ангиопатологии, e-mail: vprka@mail.ru

Орехов Александр Николаевич, доктор биол. наук, проф., рук. лаб. ангиопатологии, e-mail: a.h.opexob@gmail.com

Контуш Анатолий, PhD, research director, e-mail: anatol.kontush@upmc.fr

Камон Лоран, PhD, research scientist

Ломм Мари, PhD, research engineer

Чепмен Джон, PhD, DSc