

УДК 543.54; 612.129

Применение метода ВЭЖХ для определения биоиндикаторов дисфункций организма S-аденозилгомоцистеина и S-аденозилметионина

Лузянин Б.П., Иванов А.В., Вирюс Э.Д., Пальцын А.А., Кожевникова Л.М., Кубатиев А.А.

ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, д.8, e-mail: niiorp@mail.ru

Обсуждаются возможности применения метода ВЭЖХ для определения S-аденозилгомоцистеина (SAH) и S-аденозилметионина (SAM) в плазме крови и тканях с использованием разных видов детектирования. Рассматриваются и обсуждаются трудности, возникающие при анализе, устранение которых позволяет достичь необходимой селективности и чувствительности. Приводятся приемы борьбы с эффектом подавления ионизации при масс-спектрометрическом (МС) детектировании, что крайне необходимо для адекватной оценки содержания SAM и SAH в биологических матрицах.

Ключевые слова: метод ВЭЖХ, хроматография, S-аденозилгомоцистеин, S-аденозилметионин

Список используемых сокращений:

ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография

ГФБК — гептафторбутановая кислота

ДН — диабетическая нефропатия

МЕТ — метионин

МС — масс-спектрометрия

СД — сахарный диабет

СМЖ — спинномозговая жидкость

ССЗ — сердечно-сосудистые заболевания

ТФЭ — твердофазная экстракция

УФД — ультрафиолетовый детектор

ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота

LOD — предел детектирования

PFPP — пентафторированная стационарная фаза

tHcy — восстановленный гомоцистеин

SAM — S-аденозилметионин

SAH — S-аденозилгомоцистеин

tHcy — общий гомоцистеин

Введение

В многочисленных публикациях [1, 25—27, 30] показано, что аминокислоты и их производные могут быть использованы в качестве биоиндикаторов различных дисфункций организма. Для этих целей предложено применение аминокислот и их производных: *общий гомоцистеин (tHcy), восстановленная фракция гомоцистеина (tHcy), S-аденозилгомоцистеин (SAH), S-аденозилметионин (SAM) и соотношение SAH/SAM («индекс метилирования»).*

Гомоцистеину как биоиндикатору и методам его определения в биоматрицах посвящено достаточное число публикаций [2—9, 32].

Представляет большой интерес использование в качестве маркера производных аминокислот SAH и SAM или их соотношения, так как, по данным литературы, они обладают большей прогностической способностью. Соотношение SAM/SAH в качестве «индикатора метилирования» было впервые рассмотрено в работах [13, 21]. Тем не менее, в опубликованных работах нет единого мнения, какой маркер, SAH или соотношение SAH/SAM, является более предпочтительным [14, 15]. Данное соотношение отражает метилирование в разнообразных ферментативных процессах, включая регуляцию активности ДНК и гистонов. Отмечается, что при ингибировании этих SAM-опосредованных

процессов показатель SAH является предпочтительным индикатором таких метаболических изменений. Вместе с этим, высокая дисперсия определяемых уровней SAH и SAM является отличительной чертой экспериментальных данных, представленных в публикациях последних лет.

Влияние температуры и pH среды на стабильность SAM при хранении образцов спинномозговой жидкости (СМЖ) было изучено в работе [47]. Автором этой работы было показано, что высокая стабильность SAM и SAH достигается только в кислой среде (pH = 1). В щелочной среде (pH = 10) SAM полностью разлагался после его хранения 48 ч при температуре 37°C. Уменьшение содержания SAM в СМЖ с образованием SAH может проходить только частично. В работе [47] рассмотрены не только причины нестабильности SAM при хранении, но и предложен вариант повышения этой стабильности. Автор высказал предположение, что возможно не воздействие ферментов, а химический гидролиз приводит к уменьшению содержания SAM и увеличению содержания SAH в образцах при хранении их долгое время при –20°C. Несмотря на высказанные предположения, автор работы считает, что механизм метаболизма SAM в образцах СМЖ носит более сложный характер. Причина уменьшения содержания SAM и возрастания содержания SAH в образцах при физиологических значениях pH при длительном их хра-

нении (более одного года) до сих пор остается не вполне ясной и требует проведения дальнейших исследований. В заключение автор отметил, что результаты анализа образцов СМЖ без предварительной их стабилизации кислотой могут быть некорректны.

Объяснение причин влияния pH и температуры на деградацию SAM было приведено ранее в работе [36]. На рисунке представлена молекула SAM и возможные места структуры, которые могут подвергаться химической или ферментной деградации. Было показано, что прогрев образца (температура не указана) при pH = 4 или pH = 7 в течение 30 мин вызывал процесс гидролиза SAM. Таким образом, расхождение экспериментальных данных, полученных разными исследователями, можно связать именно с применением разных процедур подготовки образцов и условиями их хранения.

При определении содержания этих маркеров в биоматрицах наиболее предпочтительным является метод ВЭЖХ с различными видами детектирования.

Анализ SAM и SAH методом ВЭЖХ с УФ-детектором

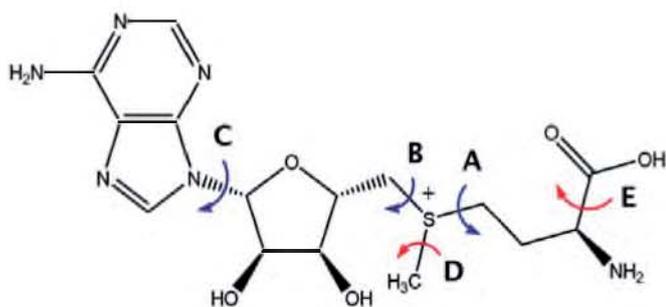
При разработке методик с применением ВЭЖХ необходимо учитывать физико-химические свойства определяемых SAM и SAH:

- наличие в центре структуры молекулы положительного заряда;
- высокую гидрофильность этих соединений;
- отсутствие в их структурах хромофорных групп.

В публикациях отмечается, что при использовании ВЭЖХ, применяя обращенно-фазные колонки и масс-спектрометрического детектирования, высокая гидрофильность и наличие положительного заряда в структурах SAM и SAH приводит их к одновременному выходу этих соединений с солями и другими сопутствующими компонентами, что вызывает эффект подавления ионизации. В связи с этим для отделения солей и сопутствующих компонентов при анализе SAM и SAH необходимо прибегать к дополнительным процедурам:

- использование ион-парных реагентов для «компенсации» заряда;
- применение колонок со слабыми ионообменными свойствами;
- применение процедуры твердофазной экстракции (ТФЭ).

В различных публикациях было показано, что наиболее привлекательным приемом для отделения солей от анализируемых соединений является ввод в подвижную фазу ион-парного реагента, который вызывает увеличение времени удерживания SAM и SAH.



Деградация S-аденозилметионина [53]:

A, B, C — возможные места деградации при химическом гидролизе; D, E — возможные места деградации под действием ферментов.

К этому приему прибегают практически все исследователи. Для соединений SAM и SAH в качестве ион-парных реагентов обычно используют пентил-гексил-, гептил- или октилсульфонат натрия. В некоторых работах имеются ссылки на применение для этой цели муравьиной или бутановой кислот. При разработке методик анализа методом ВЭЖХ следует учитывать и то, что содержание SAH и SAM находится в интервале низких концентраций на уровне нмоль/л. Это обстоятельство диктует применение высокочувствительных детекторов. При использовании масс-спектрометрического детектирования для устранения эффекта подавления ионизации, возможен вариант применения колонок со слабыми ионообменными свойствами, что позволит также увеличить время удерживания SAM и SAH и отделить эти соединения от солей, а также устранить эффект подавления ионизации. Кроме этого, возможно применять твердофазную экстракцию (ТФЭ).

Анализ SAM и SAH методом ВЭЖХ с УФ-детектором

Ниже нами приводится ряд работ, в которых используется метод ВЭЖХ с УФ-детектированием для определения содержания SAM и SAH. Так, в работе [28] SAM и SAH определялись с применением модифицированной обращенно-фазной методики ВЭЖХ, ранее применяемой в работе [10].

Z. Song с соавторами для определения данных соединений в тканях готовили депротенизированные экстракты клеток печени и митохондриальной фракции (4% метафосфорная кислота [42]). Ранее для определения содержания SAM и SAH применялся метод ВЭЖХ с использованием обращенно-фазной колонки Hypersil C-18 (250 мм x 4,6 мм) [40, 41].

В работе [24] представлена методика определения содержания SAM и SAH в эритроцитах с применением подхода, предложенного в работе [18]. Суть подхода заключается в использовании УФ-детектора (УФД) при 260 нм. Для разделения компонентов смеси образец (100 мкл) напрямую вводился на обращенно-фазную колонку C18 (150 мм x 4,6 мм, ESA, Chelmsford, MA, USA) при температуре термостата колонок 35°C. В исследованиях [48] для определения SAM и SAH в тканях крысы было предложено использовать обращенно-фазную ВЭЖХ с УФД.

Авторы работы [38] предложили простой метод ВЭЖХ с ультрафиолетовым детектированием для одновременного определения SAM и SAH в образцах тканей крыс с использованием изократического режима. Предложенный метод ВЭЖХ-УФ (при 254 нм) с изократическим режимом разделения, обеспечивал быстрое определение обоих соединений при анализе экстракта тканей крыс с вычислением соотношения SAM/SAH. В работе применялась колонка TSKgel ODS-80Tm (25 см x 4,6 мм, Tosoh Co., Tokyo, Japan). Предел обнаружения этих компонентов был 25 пмоль в диапазоне линейности 50—2000 пмоль, коэффициент корреляции 0,999. Методика позволяла определять соотношение SAM/SAH в тканях крысы с дефицитом витамина B₆. В работе авторы наблюдали выраженное снижение соотношения SAM/SAH для B₆-дефицитных крыс с резким ростом содержания SAH и при одновременном уменьшении SAM. Образцы ткани были стабильны при хранении в течение 5 дней при температуре -40°C. В работе [48] была использована модернизированная методика ВЭЖХ с обращенно-фазной колонкой

с УФД, которая ранее применялась для определения содержания SAM и SAH в тканях крыс. Пределы детектирования при вводе 25 мкл для SAM и SAH были равны 22 пмоль и 20 пмоль соответственно. Пределы количественного обнаружения при вводе 25 мкл экстракта соответствовали 55 пмоль и 50 пмоль для SAM и SAH с прецизионностью более 98%. В публикации [17] был предложен быстрый метод одновременного определения аденозина, SAH и SAM в почечной ткани и в моче. Анализ нуклеозидов проводился с применением ТФЭ и разделением компонентов на обращенно-фазной колонке ВЭЖХ с ион-парным взаимодействием и с использованием бинарной системы градиента. Этот метод характеризуется прецизионностью более 90% с пределами детектирования нуклеозидов: 0,25–1,0 нмоль/г для почечной ткани и 0,25–0,5 мкмоль/л для мочи. Показано, что содержание аденозина, SAH и SAM в почке крысы составляло $5,64 \pm 2,2$; $0,67 \pm 0,18$ и $46,2 \pm 1,9$ нмоль/г сырого веса (среднее \pm SD, $n = 6$) соответственно. В моче содержание аденозина и SAH человека и крысы находилось в нижнем диапазоне мкмоль/л. В работе [37] была использована методика для определения в эритроцитах содержание SAM и SAH. В основу методики были положены ранее выполненные разработки других исследователей [52, 53]. Супернатант отбирался в пробирки и дважды экстрагировался равными объемами диэтилового эфира и фильтровался. 20 мкл образца наносилось на обращенно-фазную колонку Ultrasphere ODS (25 см \times 0,46 см, сорбент 5 мкм) с предколонкой и подвергалось УФ-детектированию при 254 нм. Калибровка осуществлялась до и после анализа образца. Предыдущие исследования показали, что стандартные кривые, полученные с применением экстрактов RBCs и растворов соляной кислоты, были идентичны [52]. Время удерживания SAM было 10–11 мин, в то время как для SAH — 5 мин. Для дополнительной проверки образцы анализировались дважды. В крови SAM и SAH находятся, главным образом, в эритроцитах и их содержание в клетках меняется в зависимости от биологических условий [19, 52, 53]. Для определения SAM также применялся метод, ранее предложенный в работе [53]. 20 мкл образца экстракта инжестрировалось в хроматограф на колонку Beckman Ultrasphere ODS (250 мм \times 4,6 мм, 5 мкм; Fullerton, CA, USA) с предколонкой. Для детектирования использовалась диодная матрица при 254 нм. При существенном уменьшении времени анализа процедура промывки колонки повторялась. Как это отмечалось выше, в публикации [22] было показано, что именно отсутствие контроля pH приводит к разбросу результатов анализа.

Анализ SAM и SAH методом ВЭЖХ с флуоресцентным детектированием

Принимая во внимание, что в биологических матрицах SAM и SAH содержится в весьма малых концентрациях, для увеличения чувствительности прибегают к флуоресцентному детектированию. При этом, учитывая отсутствие хромофорных групп в анализируемых структурах, необходимо введение в анализируемые молекулы хромофоры для получения флуоресцентных производных. В основном, для этого используется дериватирующий реагент — хлорацетальдегид, который при взаимодействии с анализируемыми компонентами приводит к образованию высокофлуоресцентных 1,N⁶-этенпроизводных SAM и SAH. При анализе производных в мо-

бильную фазу также необходимо вводить ион-парный реагент. Самым большим недостатком такого анализа являлась длительность процесса дериватизации. В работе [47] для анализа SAM и SAH в СМЖ применялся метод ВЭЖХ с флуоресцентным детектором. Оптимизация процесса дериватизации хорошо описана в работах [12, 39, 43, 51]. Согласно данным работы [51], при дериватизации SAM и SAH применялся 5,5 М раствор хлорацетальдегида (pH 3,5–4,0). Реакцию проводили при температуре 39°C в течение 16 ч. Все образцы инкубировались на 16 ч на водяной бане при 39°C. Образцы, содержащие 1,N⁶-этенпроизводные SAM и SAH, проявляли стабильность при комнатной температуре в течение 24 ч. Другие авторы при анализе SAH, SAM и аденозина также использовали обращенно-фазный вариант ВЭЖХ с флуоресцентным детектированием [12, 39, 43, 51]. В работе [43] было показано, что процесс дериватизации с этим реагентом имеет ряд недостатков. В работе [12] удалось уменьшить время дериватизации до 4–8 ч (39°C). В работе [23] для сокращения времени анализа до 1 ч авторы при дериватизации использовали температуру 60°C.

В работах [31, 51] сообщается, что дериватизация осуществлялась хлорацетальдегидом и проводилось детальное изучение влияния условий анализа на разделение 1,N⁶-этенпроизводных SAH и SAM.

В публикации [46] необходимые параметры разделения были достигнуты с применением обращенно-фазных колонок. Наилучшие варианты при подборе мобильных фаз наблюдались с применением ацетонитрила и фосфатного буфера, с гептасульфоновой кислотой (ион-парный реагент).

В работе [16] была предложена методика определения SAM и SAH в плазме крови методом ВЭЖХ с флуоресцентным определением изоиндольных производных этих соединений. Методика включала в себя начальное разделение SAM и SAH в образцах депротеинизированной плазмы методом ВЭЖХ на колонке C8, после чего проводилась дериватизация SAM и SAH с применением реагента нафталиндиальдегида и цианида в течение 10 мин при pH 9,0.

Анализ SAM и SAH методом ВЭЖХ с электрохимическим детектированием

Применение электрохимического детектирования позволяет обеспечить прямое определение соединений SAM и SAH с достижением высокой чувствительности. Так, в работе [34] анализировались образцы плазмы крови, лимфоцитов или ткани. Большим преимуществом метода являлась простая подготовка пробы, отсутствие процесса концентрирования, процесса дериватизации анализируемых компонентов и использование изократического режима элюирования. Более детальные процедуры применения метода ВЭЖХ с электрохимическим детектированием представлены в ранее опубликованных работах [18, 33]. Чувствительность этих методов составляет 200 фмоль/л для SAM и 40 фмоль/л для SAH. При использовании для разделения ВЭЖХ применялась обращенно-фазная колонка C18 (150 мм \times 4,6 мм, сорбент 5 мкм). К недостаткам метода следует отнести использование относительно высокого потенциала (+920 мВ) для окисления анализируемых соединений. Такой потенциал обычно приводит к малой селективности, так как другие многочисленные соединения также хорошо окисляются.

Серьезным недостатком метода является то, что электроды аналитических ячеек подвержены загрязнению и требуют большого времени для очистки.

В работе [54] авторами приводится методика определения гомоцистеина, метионина, SAM и SAH также с электрохимическим детектированием.

Для оценки содержания SAM и SAH использовалась колонка C18 (150 мм x 4,6 мм, сорбент 5 мкм, MCM, Inc., Tokyo, Japan). Анализ осуществлялся в изократическом варианте при температуре окружающей среды. Описание деталей самой методики анализа приводится в работе [33].

Анализ SAM и SAH методом ВЭЖХ

с масс-спектрометрическим детектированием

С развитием тандемной масс-спектрометрии метод ВЭЖХ-МС стал широко применяться в лабораториях во всем мире. Этот метод позволяет не только находить потенциальные маркеры, но и дает возможность изучать патологические механизмы.

В работе [29] представлена разработка метода, который позволил провести точный и быстрый анализ многих аминокислот, включая производные S-аденозилметионин (SAM) и S-аденозилгомоцистеин (SAH). Метод применялся для исследования пациентов с сахарным диабетом (СД) и диабетической нефропатией (ДН). Ион-парное взаимодействие, как утверждают авторы, достигалось путем добавления 0,15% муравьиной кислоты в мобильную фазу. При этом подавление ионизации отсутствовало. Пределы обнаружения для SAH, SAM были на уровне 0,25 нг/мл. В ряде работ предлагались методики анализа аминокислот без использования внутреннего стандарта [49, 50], что, естественно, приводило к снижению точности анализа. Авторы работы [29] сделали заключение, что применение tNsu в качестве биоиндикатора возможно только при заметных изменениях его содержания между контрольной группой и пациентами с ДН. Результаты анализа показали резкое снижение соотношения SAM/SAH у пациентов с нефропатией, что согласуется с гипотезой, представленной авторами работы [44]. В заключение авторы работы [29] отмечают, что соотношение SAH/SAM при развитии сахарного и нефропатического диабета является более чувствительным индикатором, чем использование для этой цели показателя *общего* гомоцистеина.

В работе [20] для очистки образцов использовалась твердофазная экстракция (ТФЭ) на картридже (Varian Inc) с фенилборной кислотой (pH 7–8). Смесь наносилась на картридж ТФЭ для связывания SAM, SAH и внутренних стандартов [²H₃]-SAM и [¹³C₅]-SAH, как это приводилось в работе [45]. Растворимые в воде примеси удалялись промыванием картриджа дважды с применением 1 мл раствора ацетата аммония (20 ммоль/л, pH 7,4) [17]. Очистка образцов от солей методом ТФЭ позволила продлить их стабильность в течение не менее 6 мес. (при –20°C). В работе [44] для анализа SAM и SAH использовался метод ВЭЖХ-МС/МС с изотопным разбавлением. Авторы показали, что соотношение SAM/SAH для мочи было значительно выше, чем для сыворотки крови или для красных клеток крови. В работе [11] авторами для оценки потенциальной возможности метилирования во время эмбрионального развития была разработана методика выявления изменений содержания SAM и SAH в эм-

бриональной экспериментальной системе. Для проведения разделения SAM, SAH и [²H₃]-SAM была выбрана колонка с привитой пентафторфенилпропиловой фазой (PFPP) (Discovery HS F5; 50 мм x 2,1 мм, сорбент 5 мкм, Supelco, Sigma-Aldrich), обладающая дополнительно ионообменными свойствами [35]. Пределы обнаружения для SAM и SAH были на уровне 10 нмоль/л и 2,5 нмоль/л соответственно. Представляет интерес работа, в которой использовалась колонка с адсорбционным наполнителем в виде пористого графита Hurecarb (30 мм x 2,1 мм, сорбент 3 мкм, Thermo Fisher, Inc., USA).

Применение методики ВЭЖХ-МС/МС с изотопным разбавлением ([¹³C₅]-SAH и [²H₃]-SAM) является наиболее простым, точным и оптимальным вариантом анализа этих соединений [30].

Заключение

В обзоре представлена сравнительная оценка прогностической способности аминокислот и их производных, применяемых в качестве биомаркеров. Представлены методы ВЭЖХ с различными видами детектирования, позволяющие проводить количественное определение этих соединений в различных биологических матрицах.

Затронуты причины разброса экспериментальных данных в зависимости от условий проведения подготовки проб и их хранения. Приводятся оптимальные условия этой процедуры с достижением стабильности анализируемых соединений при долгосрочном хранении.

Список литературы

1. Авдонин П.В., Кириенко А.И., Кожевникова Л.М., Шостак Н.А., Бабадаева Н.А., Леонтьев С.Г., Петухов Е.Б., Кубатиев А.А. Корреляция наличия мутации С677Т в гене мителентетрагидрофолатредуктазы у больных из центрального региона России с венозными тромбозами и повышенный риск тромбоэмболии легочных артерий // Терапевтический архив. — 2006. — Т. 78, №6. — С. 70–76.
2. Вирус Э.Д., Иванов А.В., Лузянин Б.П., Пальцын А.А., Кубатиев А.А. Масс-спектрометрия в биологии и медицине XXI века // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 2013. — Вып. 4. — С. 68–75.
3. Жлоба А.А. Лабораторная диагностика при гипергомоцистеинемии // Клинико-лабораторный консилум. — 2009. — Вып. 1. — С. 49–60.
4. Иванов А.В., Лузянин Б.П., Кубатиев А.А. Использование N-этилмалеинимида для масс-спектрометрического детектирования фракций гомоцистеина в плазме крови // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2011. — Т. 152, №9. — С. 256–259.
5. Иванов А.В., Московцев А.А., Лузянин Б.П., Роткина А.С., Кубатиев А.А. Определение восстановленной фракции гомоцистеина в плазме крови с помощью ВЭЖХ-МС // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 2011. — Вып. 2. — С. 55–60.
6. Иванов А.В., Лузянин Б.П., Кубатиев А.А., Московцев А.А., Роткина А.С., Кубатиев А.А. Определение содержания общего гомоцистеина в плазме крови методом капиллярного электрофореза с масс-спектрометрическим детектированием // Журнал аналитической химии. — 2011. — Т. 66. — С. 324–328.
7. Иванов А.В., Кудан П.В., Лузянин Б.П., Кубатиев А.А. Определение основных низкомолекулярных аминокислот в плазме крови методом ВЭЖХ-МС // Патогенез. — 2012. — Т. 10, №2. — С. 68–71.
8. Иванов А.В., Московцев А.А., Мартынова Е.А., Лузянин Б.П., Кубатиев А.А. Общие аминокислоты плазмы крови крыс при внутрибрюшинном и подкожном введении гомоцистеина // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 2013. — Вып. 4. — С. 41–45.

9. Andersson A., Isaksson A., Brattstroem L., Hultberg B. Homocysteine and other thiols determined in plasma by HPLC and thiol-specific postcolumn derivatization // *Clin. Chem.* — 1993. — Vol. 39(8). — P. 1590—1597.
10. Audubert F., Breton M., Colard O. et al. Differential methylation patterns in molecular species of phosphatidylethanolamine derivatives in rat liver membranes // *Biochem. Biophys. Acta.* — 1989. — Vol. 1002 (1). — P. 62—68.
11. Burren K.A., Mills K., Copp A.J., Greene N.D. Quantitative analysis of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in neurulation-stage mouse embryos by liquid chromatography tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. B.* — 2006. — Vol. 844 (1). — P. 112—118.
12. Castro R., Struys E.A., Jansen E.E.W. et al. Quantification of plasma Sadenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine as their fluorescent 1,N6-etheno derivatives: an adaptation of previously described methodology // *J. Pharm. Biomed. Anal.* — 2002. — Vol. 29. — P. 963—968.
13. Cantoni G.L., Richards H.H., Chiang P.K. Inhibitors of S-adenosylhomocysteine hydrolase and their role in the regulation of biological methylation // *Transmethylation / Usdin E., Borchardt R.T., Creveling C.R., eds.* — New York, NY: Elsevier North Holland, 1978. — P. 155—164.
14. Caudill M.A., Wang J.C., Melnyk S. et al. Intracellular S-adenosylhomocysteine concentrations predict global DNA hypomethylation in tissues of methyl-deficient cystathionine beta-synthase heterozygous mice // *J. Nutr.* — 2001. — Vol. 131. — P. 2811—2818.
15. Capdevila A., Decha-Umphai W., Song K.H., Borchardt R.T., Wagner C. Pancreatic exocrine secretion is blocked by inhibitors of methylation // *Arch. Biochem. Biophys.* — 1997. — Vol. 345(1). — P. 47—55.
16. Capdevila A., Wagner C. Measurement of plasma S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine as their fluorescent isoindoles // *Analytical Biochemistry.* — 1998. — Vol. 264. — P. 180—184.
17. Delabar U., Kloor D., Luippold G., Muhlbauer B. Simultaneous determination of adenosine, S-adenosylhomocysteine and S-adenosylmethionine in biological samples using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* — 1999. — Vol. 724. — P. 231—238.
18. Finkelstein J.D. Pathways and regulation of homocysteine metabolism in mammals // *Semin Thromb. Haemost.* — 2000. — Vol. 26. — P. 219—225.
19. Fu W., Dudman N.P.B., Perry M.A., Young K., Wang X.L. Interrelations between plasma homocysteine and intracellular S-adenosylhomocysteine // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2000. — Vol. 271. — P. 47—53.
20. Gellekink H., van Oppenraaij-Emmerzaal D., van Rooij A., Struys E.A., den Heijer M., Blom H.J. Stable-isotope dilution liquid chromatography-electrospray injection tandem mass spectrometry method for fast, selective measurement of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in plasma // *Clin. Chem.* — 2005. — Vol. 51(8). — P. 1487—1492.
21. Hershfield M.S., Kredich N.M., Koller C.A. et al. S-adenosylhomocysteine catabolism and basis for acquired resistance during treatment of T-cell acute lymphoblastic leukemia with 2'-deoxycytosine alone and in combination with 9-beta-D-arabinofuranosyladenine // *Cancer Res.* — 1983. — Vol. 43. — P. 3451—3458.
22. Hendricks C.L., Ross J.R., Pichersky E. et al. An enzyme-coupled colorimetric assay for S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases // *Anal. Biochem.* — 2004. — Vol. 326. — P. 100—105.
23. Herbig K., Chiang E.-P., Lee L.-R., Hills J., Shane B., Stover P.J. Cytoplasmic Serine Hydroxymethyltransferase Mediates Competition between Folate-dependent Deoxyribonucleotide and S-Adenosylmethionine Biosyntheses // *JBC.* — 2002. — Vol. 277(41). — P. 38381—38389.
24. Hirsch S., Ronco A.M., Guerrero-Bosagna C., de la Maza M.P., Leiva L., Barrera G., Llanos M., Alliende M.A., Silva F., Bunout D. Methylation status in healthy subjects with normal and high serum folate concentration // *Nutrition.* — 2008. — Vol. 24(11—12). — P. 1103—1109.
25. Hultberg B., Andersson A., Arnadottir M. Reduced, free and total fractions of homocysteine and other thiol compounds in plasma from patients with renal failure // *Nephron.* — 1995. — Vol. 70. — P. 62—67.
26. Ivanov A.R., Nazimov I.V., Baratova L.A. Determination of biologically active low-molecular-mass thiols in human blood. I. Fast qualitative and quantitative, gradient and isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography with photometric and fluorescence detection // *J. Chromatogr. A.* — 2000. — Vol. 895. — P. 167—171.
27. Ivanov A.R., Nazimov I.V., Baratova L.A., Lobazov A.P., Popkovich G.B. Determination of biologically active low-molecular-mass thiols in human blood. III. Highly sensitive narrow-bore isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection // *J. Chromatogr. A.* — 2001. — Vol. 913. — P. 315—318.
28. Jiang Y.D., Zhang J.Z., Huang Y., Su J., Zhang J.G., Wang L.Z., Han X.Q., Wang S.R. Homocysteine-mediated Aberrant DNA Methylation in Vascular Smooth Muscle Cells and Its Potential Pathogenic Mechanism // *Progress in Biochem. Biophys.* — 2007. — Vol. 34 (5). — P. 479—489.
29. Jiang Z., Liang Q., Luo G., Hu P., Li P., Wang Y. HPLC-electrospray tandem mass spectrometry for simultaneous quantitation of eight plasma aminothiols: Application to studies of diabetic nephropathy // *Talanta.* — 2009. — Vol. 77(2). — P. 1279—1284.
30. Krijt J., Duta A., Kozich V. Determination of S-Adenosylmethionine and S-Adenosylhomocysteine by LC-MS/MS and evaluation of their stability in mice tissues // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* — 2009. — Vol. 877(22—23). — P. 2061—2066.
31. Loehrer F.M., Angst C.P., Brunner F.P., Haefeli W.E., Fowler B. Evidence for disturbed S-adenosylmethionine:S-adenosylhomocysteine ratio in patients with end-stage renal failure: a cause for disturbed methylation reactions? // *Nephrol. Dial. Transplant.* — 1998. — Vol. 13. — P. 656—661.
32. McCully K.S. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis // *Am. J. Pathol.* — 1969. — Vol. 56(1). — P. 111—128.
33. Melnyk S., Pogribna M., Pogribny I.P., Hine R.J., James S.J. A new HPLC method for the simultaneous determination of oxidized and reduced plasma aminothiols using coulometric electrochemical detection // *J. Nutr. Biochem.* — 1999. — Vol. 10(8). — P. 490—497.
34. Melnyk S., Pogribna M., Pogribny I.P., Yi P., James S.J. Measurement of plasma and intracellular S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine utilizing coulometric electrochemical detection: alterations with plasma homocysteine and pyridoxal 5'-phosphate concentrations // *Clin. Chem.* — 2000. — Vol. 46. — P. 265—272.
35. Needham S.R., Jeanville P.M., Brown P.R., Estape E.S. Performance of a pentafluorophenylpropyl stationary phase for the electrospray ionization high-performance liquid chromatography-mass spectrometry-mass spectrometry assay of cocaine and its metabolite ecgonine methyl ester in human urine // *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* — 2000. — Vol. 748(1). — P. 77—87.
36. Parks L.W., Schlenk F. The stability and hydrolysis of S-adenosylmethionine; isolation of S-ribosylmethionine // *J. Biol. Chem.* — 1958. — Vol. 230. — P. 295—305.
37. Poirier L.A., Wise C.K., Delongchamp R.R., Sinha R. Expand + Blood Determinations of S-Adenosylmethionine, S-Adenosylhomocysteine, and Homocysteine Correlations with Diet // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* — 2001. — Vol. 10. — P. 649—655.
38. She Q.B., Nagao I., Hayakawa T., Tsuge H. A simple HPLC method for the determination of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in rat tissues: the effect of vitamin B6 deficiency on these concentrations in rat liver // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1994. — Vol. 205(3). — P. 1748—1754.
39. Shugart L. Identification of fluorescent derivatives of adenosylmethionine and related analogues with high-pressure liquid chromatography // *J. Chromatogr.* — 1979. — Vol. 174. — P. 250—253.
40. Song Z., Zhou Z., Chen T., Hill D., Kang J., Barve S., McClain C. S-adenosylmethionine (SAME) protects against acute alcohol induced hepatotoxicity in mice // *J. Nutr. Biochem.* — 2003. — Vol. 14. — P. 591—597.
41. Song Z., Zhou Z., Uriarte S., Wang L., Kang Y.J., Chen T., Barve S., McClain C.J. Sadenosylhomocysteine sensitizes to TNF-alpha hepatotoxicity in mice and liver cells: a possible etiological factor in alcoholic liver disease // *Hepatology.* — 2004. — Vol. 40. — P. 989—997.
42. Song Z., Zhou Z., Song M., Uriarte S., Chen T., Deaciuc I., McClain C.J. Alcohol-induced S-adenosylhomocysteine Accumulation in the Liver Sensitizes to TNF Hepatotoxicity: Possible Involvement of Mitochondrial S-adenosylmethionine // *Transport. Biochem. Pharmacol.* — 2007. — Vol. 74(3). — P. 521—531.
43. Sonoki S., Tanaka Y., Hisamatsu S. et al. High-performance liquid chromatographic analysis of fluorescent derivatives of adenine and adenosine and its nucleotides. Optimization of derivatization with

chloroacetaldehyde and chromatographic procedures // *J. Chromatogr.* — 1989. — Vol. 475. — P. 311–319.

44. Stabler S.P., Allen R.H. Quantification of serum and urinary S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine by stable-isotope dilution liquid chromatography-mass spectrometry // *Clin. Chem.* — 2004. — Vol. 50. — P. 365–372.

45. Struys E.A., Jansen E.E., de Meer K., Jakobs C. Determination of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in plasma and cerebrospinal fluid by stable-isotope dilution tandem mass spectrometry // *Clin. Chem.* — 2000. — Vol. 46(10). — P. 1650–1656.

46. Valko K., Hamedani M.P., Ascah T.L., Gibbons W.A. A comparative study of the reversed-phase HPLC retention behaviour of S-adenosyl-L-methionine and its related metabolites on Hypersil ODS and Supelcosil LC-ABZ stationary phases // *J. Pharm. Biomed. Anal.* — 1993. — Vol. 11(4–5). — P. 361–366.

47. Vezmar S. Methotrexate-induced biochemical alterations of the folate and methyl-transfer pathway in the CNS: Dissertation. — Bonn, 2005.

48. Wang W., Kramer P.M., Yang S., Pereira M.A., Tao L. Reversed-phase high-performance liquid chromatography procedure for the simultaneous determination of S-adenosyl-L-methionine and S-adenosyl-L-homocysteine in mouse liver and effect of methionine on their concentrations // *J. Chromatography B.* — 2001. — Vol. 762. — P. 59–65.

49. Wang Y. H., Zhang Y., Liang Q.L., Yang H.H., Wang Y.M., Liu Q.F., Hu P., Zheng X.Y., Song X.M., Chen G., Zhang T., Wu J.X., Luo G.A. Simultaneous quantification of 11 pivotal metabolites in neural tube defects by HPLC-electrospray tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. B.* — 2008. — Vol. 863(1). — P. 94–100.

50. Wang W.X., Zhou H.H., Lin H., Roy S., Shaler T.A., Hill L.R., Norton S., Kumar P., Anderle M., Becker C.H. Quantification of proteins and metabolites by mass spectrometry without isotopic labeling or spiked standards // *Anal. Chem.* — 2003. — Vol. 75(18). — P. 4818–4826.

51. Wagner J., Hirth Y., Claverie N. et al. A sensitive high-performance liquid chromatographic procedure with fluorometric detection for the analysis of decarboxylated S-adenosylmethionine and analogs in urine samples // *Anal. Biochem.* — 1986. — Vol. 154. — P. 604–617.

52. Wise C.K., Cooney C.A., Ali S.F., Poirier L.A. Measuring S-adenosylmethionine in whole blood, red blood cells, and cultured cells using a fast preparation method and high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. B Biomed.* — 1997. — Vol. 696. — P. 145–152.

53. Wise C.K., Fullerton F.R. Analytical procedure for determination of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine, and S-adenosylmethionine in the same isocratic HPLC run, with a procedure for preparation and analysis of the analog S-adenosylhomocysteine sulfide // *J. Liq. Chromatogr.* — 1995. — Vol. 18. — P. 2005–2017.

54. Yi P., Melnyk S., Pogribna M., Pogribny I.P., R.J., James S.J. Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation // *JBC.* — 2000. — Vol. 275(38). — P. 29318–29323.

Поступила 2.11.2013

Applying of HPLC for S-adenosylhomocysteine and S-adenosylmethionine determination as dysfunction bioindicators of organism

Lusyanin B.P., Ivanov A.V., Virus E.D., Paltsyn A.A., Kozhevnikova L.M., Kubatiev A.A.

Institute of General Pathology and Pathophysiology, Russian Academy of Medical Sciences,
8, Baltiyskaya Str., 125315, Moscow, Russia; e-mail: niiopp@mail.ru

The article discusses the possibility of using the HPLC method for the determination of S-adenosylhomocysteine (SAH) and S-adenosylmethionine (SAM) in plasma and tissues using different types of detection. We review and discuss the difficulties encountered in the analysis and their solutions, allowing to achieve the necessary selectivity and sensitivity. The article presents techniques fight against the ion suppression effect in case of the mass spectrometric detection. These approaches are essential for an adequate assessment of the SAH and SAM content in biological matrices.

Key words: HPLC, chromatography, S-adenosylhomocysteine, S-adenosylmethionine