

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМИНОТИОЛОВ, ВКЛЮЧАЯ ПОКАЗАТЕЛИ ГАММА-ГЛУТАМИЛЬНОГО ЦИКЛА, В ПЛАЗМЕ КРОВИ

Дорошенко Е.М., Новгородская Я.И.

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

Актуальность. Среди компонентов аминокислотного пула особая роль принадлежит серосодержащим аминокислотам, реакции превращения которых сопряжены с обменом других аминокислот, синтезом ряда биологически активных соединений (гормонов, медиаторов, глутатиона). Промежуточным продуктом превращений серосодержащих соединений является гомоцистеин, являющийся цитотоксичным соединением, а его уровень в плазме рассматривают как диагностически информативный показатель, в частности, при сердечно-сосудистых заболеваниях. Однако, практически не разработан вопрос о диагностической информативности уровней дипептидов гамма-глутамильного пути транспорта аминокислот в клетку – цистеинилглицина и гамма-глутамилцистеина. Предметом нашего интереса является также транссульфурирование гомоцистеина. Имеются данные о связи метилирования ДНК и полиморфизма цистатионин-β-синтазы [1]. Конечным продуктом транссульфурирования является цистеин, корректное определение которого затруднительно ввиду того, что он является частью редокс-систем, окисленным компонентом которых может быть любой тиол. Таким образом, метод, позволяющий в одной пробе зарегистрировать уровни общих (после восстановления) цистеина, гомоцистеина, цистеинилглицина, гамма-глутамилцистеина и глутатиона, позволил бы контролировать состояние гамма-глутамильного цикла и транссульфурирования.

Цель работы – разработать модификацию метода одновременного определения общих аминотиолов, позволяющую определять уровни гомоцистеина, цистеина, гамма-глутамилцистеина, глутатиона и цистеинилглицина, в плазме крови.

Методы исследования. При отработке определения использовался прибор ВЭЖХ Agilent 1200, включающий 4-канальную систему подачи растворителя с вакуумным дегазатором, термостатируемый автосамплер, термостат колонок, детектор флуоресценции. Использовались стандарты определяемых соединений Aldrich, трижды дистиллированная вода. При пробоподготовке использовалась центрифуга Biofuge Primo R+ с охлаждаемым ротором. Прием данных и обработка хроматограмм проводились с помощью программы Agilent OpenLab CDS C.01.03.

Результаты и их обсуждение. Метод основан на предколоночной дериватизации SH-содержащих соединений с аммоний-7-фторбензол-2-оксо-1,3-диазола-4-сульфонатом (SBD-F) [2] с последующим разделением полученных производных методом обращенно-фазной ВЭЖХ с изократическим элюированием. Нами модифицировался метод [3]. В качестве внутреннего стандарта использовали N-ацетилцистеин, который добавляли в

плазму до конечной концентрации 100 мкмоль/л. Для восстановления тиолов из дисульфидов использовали трис-(карбоксиэтил)фосфин гидрохлорид (ТСЕР) в собственной модификации процедуры [4].

Метод пробоподготовки был нами оптимизирован для снижения количества материала, требующегося для анализа, и повышения воспроизводимости результатов при работе с малыми объемами. Пробы плазмы крови (50 мкл) смешивали с 5 мкл 2 мМ раствора N-ацетилцистеина (внутренний стандарт) и 5 мкл раствора ТСЕР (100 мг/мл), оставляли на 30 мин, затем осаждали белки добавлением 50 мкл 10% ТХУ и центрифугировали при 4°C 15 мин при 16000 g. Для дериватизации к 4 мкл 1,55 М NaOH, 25 мкл 0,125 М Na-боратного буфера pH 9,5, и 10 мкл раствора SBD-F (1 мг/мл) в таком же буфере добавляли 10 мкл супернатанта и инкубировали 1 час при 60°C. Добавляли по 50 мкл 0,2 М HClO₄ для нейтрализации. В хроматографическую систему вводили 5 мкл реакционной смеси [5]. Колонка Zorbax SB C18, 2,1x150 мм. Подвижная фаза: 0,1 М NaH₂PO₄, 17 мМ H₃PO₄, 20 мг/л ЭДТА (А), CH₃CN/H₂O 7/3 (об.) (В). Скорость потока 0,2 мл/мин, 29°C. Градиентное элюирование: 0 мин: 0% В, 4 мин: 5,3% В, 9 мин: 7,3% В, 15 мин: 12,7% В. Детектирование по флуоресценции, 379/510 нм. Смесь стандартов (100 мкМ) обрабатывали так же, как плазму крови. Раствор ТСЕР (100 мг в 1 мл) перед добавлением к пробам смешивали 1:1 с 2 мМ раствором N-ацетилцистеина (внутреннего стандарта).

Хроматограмма смеси стандартов приведена на рисунке 1, типичная хроматограмма плазмы крови крысы – на рисунке 2.

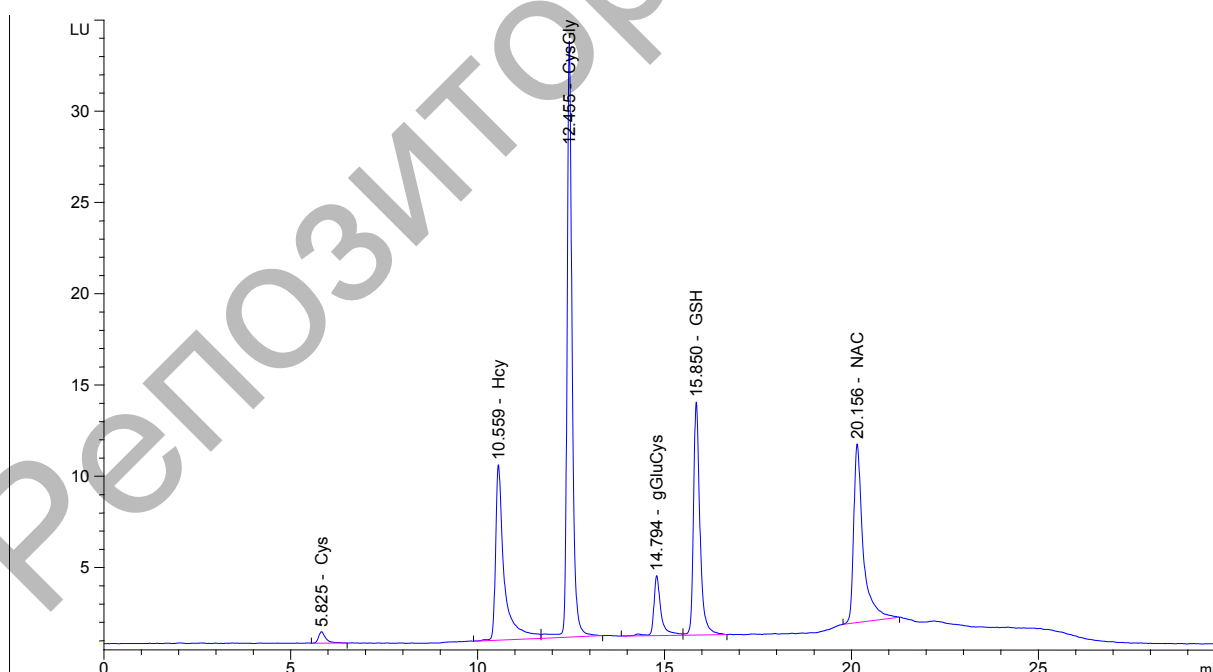


Рисунок 1. – Хроматограмма стандартов (100 мкМ) гомоцистеина (Hcy), цистеина (Cys), цистеинилглицина (CysGly), гамма-глутамилцистеина (gGluCys) и глутатиона (GSH). NAC – N-ацетилцистеин

С помощью данного метода были получены уровни определяемых соединений у интактных крыс, соответствующие данным литературы [4], порог обнаружения веществ ниже 1 мкМ (таблица).

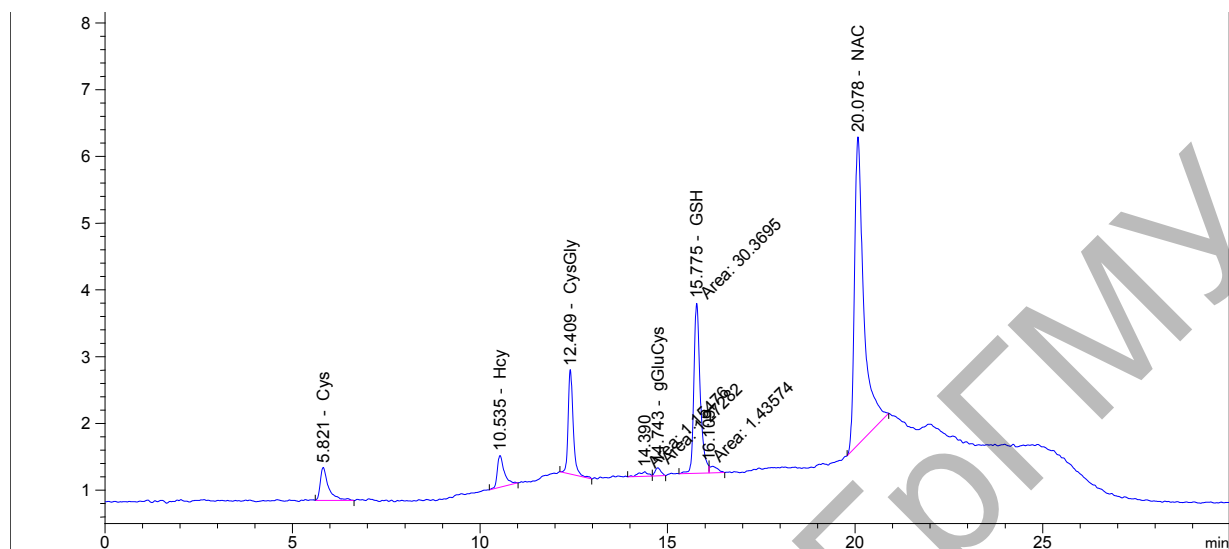


Рисунок 2. – Хроматограмма общих аминоктиолов плазмы крови при разделении их оптимизированным методом

Таблица. – Концентрации общих аминоктиолов после восстановления ТСЕР в плазме крови интактных крыс, мкМ, среднее \pm средняя ошибка среднего

Cys	129,08 \pm 16,195
Hcy	6,79 \pm 0,601
CysGly	3,52 \pm 0,212
gGluCys	9,39 \pm 0,335
GSH	85,02 \pm 8,172

Выводы. Разработанная модификация метода позволяет осуществлять одновременное определение гомоцистеина, цистеина, глутатиона, цистеинилглицина и гамма-глутамилцистеина в объёме от 50 мкл плазмы крови, обеспечивая уверенное детектирование всех определяемых соединений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Methylation and gene expression responses to ethanol feeding and betaine supplementation in the cystathionine beta synthase-deficient mouse / V. Medici, [et al] // Alcohol: Clin. Exp. Res. – 2014. – V. 38, N. 6. – P. 1540-1549.
2. Imai, K. Fluorogenic reagents, having benzofurazan structure, in liquid chromatography / K. Imai, S. Uzu, T. Toyooka // J. Pharm. Biomed. Anal. – 1990. – V. 7. – P. 1395–1403.
3. Ubbink, J. B. Rapid high-performance liquid chromatographic assay for total homocysteine levels in human serum / J. B. Ubbink, W. J. H. Vermask, S. Bissbort // J. Chromatogr. – 1991. – V. 565. – P. 441–446.
4. Gilfix, B.M. Novel reductant for determination of Total Plasma Homocysteine / B. M. Gilfix, D. W. Blank, D. S. Rosenblatt // Clinical Chemistry. –

1997. – V. 43. – P. 687–688.

5. Новгородская, Я.И. Уровни гомоцистеина и показатели пула свободных серосодержащих соединений в плазме крови и печени крыс на фоне острого введения морфина гидрохлорида в различных дозах / Я. И. Новгородская, Е. М. Дорошенко, М. Н. Курбат // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2014. – Т. 45, № 1. – С. 47–50.

ПУЛ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ И РОДСТВЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ КРОВООБРАЩЕНИЯ

Дорошенко Е.М.

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

Актуальность. Исследование метаболического дисбаланса при сердечной недостаточности актуально для расшифровки патогенетических механизмов метаболических расстройств, поиска диагностических и прогностических маркеров её прогрессирования и эффективности терапии, оптимизация методов метаболической коррекции. Среди биохимических сдвигов, выявляемых у пациентов с заболеваниями сердца и сосудов, высока частота нарушений обмена свободных аминокислот – предшественников биологически активных соединений (гормонов, медиаторов), участвующих в регуляции функции сердца [1]. Продемонстрирована возможность влияния на метаболизм ароматических аминокислот, в том числе аминергические механизмы, с помощью введения серосодержащих соединений, а у пациентов с ИБС – снижение уровня гомоцистеинемии введением триптофана [2]. Известна также роль нарушений превращений серосодержащих аминокислот, в том числе гипергомоцистеинемии, при ишемии миокарда [3].

Цель: исследовать пул свободных аминокислот и низкомолекулярных серосодержащих соединений в крови при экспериментальной недостаточности кровообращения (НК).

Методы исследования. НК моделировали путем наложения на брюшную аорту выше места отхождения почечных артерий нихромовой спирали диаметром 1 и 0,7 мм [4]. После операции животных содержали на стандартном рационе вивария со свободным доступом к воде 13 недель. Использовано 75 белых крыс-самцов гетерогенной популяции исходной массой тела 140-200 г. Свободные аминокислоты определяли в хлорнокислых экстрактах плазмы крови методом ВЭЖХ с предколоночной дериватизацией и детектированием по флуоресценции [5]. Гомоцистеин (Hcy) и другие аминотиолы определяли методом ВЭЖХ после восстановления ТСЕР и предколоночной дериватизации SBD-F с детектированием по флуоресценции [5].

Сравнения групп проводили с помощью t-критерия Стьюдента для независимых выборок с учетом сравнения дисперсий, достоверность при