

2. Характеристика обмена триптофана и серусодержащих аминокислот в плазме крови, тромбоцитах больных ИБС с желудочковыми нарушениями ритма и ХСН / Е.М. Дорошенко [и др.] // Актуальные проблемы медицины. Материалы ежегодной итоговой научно-практической конференции 22 января 2013 г. – Гродно: УО «ГрГМУ», 2013. – В 2-х частях. Ч. 1. – С. 231–235.
3. Непомнящих, Л.М. Морфометрия и стереология гипертрофии сердца / Л.М. Непомнящих, Е.Л. Лушникова, Т.И. Непомнящих. Новосибирск: Наука, 1986. – 303 с.
4. Влияние тритарга на спектр протеиногенных аминокислот в сыворотке крови и лимфоцитах / В.М. Шейбак, А.Ю. Павлюковец, М.В. Горецкая, Е.М. Дорошенко // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2011. – Т. 74, № 9. – С. 32–34.
5. Дорошенко, Е. М. Структура пула свободных аминокислот и их производных плазмы крови у пациентов с ишемической болезнью сердца и проявлениями хронической сердечной недостаточности / Е. М. Дорошенко, В. А. Снежицкий, В. В. Лелевич // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2017. – Т. 15, № 5. – С. 551-556.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФОНДА СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ: ОПЫТ РАЗРАБОТКИ МЕТОДОВ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

Дорошенко Е.М.

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

Актуальность темы. При заболеваниях внутренних органов и интоксикациях нарушения обмена свободных аминокислот (СА) являются постоянно встречающимися проявлениями метаболических расстройств [1]. Изучение взаимосвязи между компонентами пула СА позволило бы судить о механизмах метаболических расстройств и обосновывать способы метаболической коррекции.

Анализ СА требует существенно более высокой разрешающей способности, чем анализ белковых гидролизатов: требуется одновременное определение белковых аминокислот (АК), в том числе образующихся при посттрансляционных модификациях (метилгистидины, оксипролин, оксилизин, метиларгинины, метиллизины), АК, не содержащихся в белках (ГАМК,

α -аминомасляная кислота, β -аминоизомасляная кислота, α -аминоадипиновая кислота, β -аланин), производных АК (фосфоэтаноламин, этаноламин, цистеиновая кислота, таурин, фосфосерин, цистатионин и др.). При анализе биологических проб методом ВЭЖХ критически важным является разрешение АК и интерферирующих пиков, так как в пробах одновременно присутствуют соединения, выходящие соседними пиками, в концентрациях, различающихся до 3 порядков. Данная задача обычно решается с помощью методов с ограниченным разрешением, для определения лишь нескольких интересующих соединений: ГАМК в СМЖ и ее транспортных форм (гомокарнозин), серосодержащих АК и родственных соединений (L-гомоцистеин), «медиаторных» АК (аспартат, глутамат, глицин, таурин, ГАМК), аргинина и метиларгининов. Типичное количество биологического материала для анализа составляет порядка 20 мкг для тканей и 100 нл для биологических жидкостей.

Цель исследования: разработать методы разделения компонентов пула свободных аминокислот, оптимизированные для экспериментальных и клинических биохимических исследований.

Материалы и методы исследований

Нами использовано разделение ВЭЖХ производных АК с *o*-фталевым альдегидом и 3-меркаптопропионовой кислотой с детектированием по флуоресценции. Материал - хлорнокислые экстракты плазмы крови и тканей [2].

Результаты и их обсуждение

Так как проблемой разделения ОРА-производных АК является растворение силикагеля при высоких рН подвижной фазы (при рН ниже 5,5 интенсивность флуоресценции ОРА-3-МРА-производных АК снижается), нами использованы только ацетатные буферные системы с рН не выше 6,25. Тем не менее, удовлетворительное разделение всего спектра СА у животных и человека, не удалось получить при использовании бинарного градиентного элюирования. Удовлетворительное разрешение для определения СА получено только с использованием «медленного» градиента, т.е. когда объем элюирующихся пиков существенно превосходит объем ввода, а линейная скорость потока не превышает 1 мм/с, независимо от размера частиц сорбента.

Направлениями улучшения разрешения были: использование 2 органических модификаторов (метанола и ацетонитрила) в переменном соотношении, градиент рН в ходе анализа с локальными сдвигами рН в зоне выхода отдельных пиков, изменение температуры в ходе анализа (прямой и обратный градиент температуры). Это подразумевает использование 4-градиентной системы подачи растворителей. Удовлетворительное разделение таурина, гипотаурина и гистидинсодержащих дипептидов (карнозина и ансерина) удалось достичь только использованием метанола и ацетонитрила в переменном соотношении. Основной проблемой являлся различный характер зависимости удерживания ОРА-производных АК от рН, причем изменение рН на 0,1 изменяет порядок элюирования пиков. Получить приемлемую селективность удалось с применением сложного профиля градиента рН, включающего его локальные сдвиги в области выхода пиков альфа-аминоадипиновой кислоты (аААА), фосфоэтанолamina (ФЭА), цистатионина, с целью отделения от пиков глутамина, треонина и норвалина соответственно.

Оптимизация включала подбор оптимальной температуры колонки. Так как зависимость удерживания ОРА-производных АК от температуры различна, критичность этого параметра весьма высока: разделение в зоне локальных сдвигов рН может быть нарушено изменением температуры на 1°C. Для дополнительной оптимизации селективности (например, разделение метиларгининов и таурина), возможно использование программирования температуры колонки.

В оптимизированном методе достигнуто разделение соединений, составляющих пул СА и их производных у человека и животных. Сорбент Zorbax Eclipse Plus C₁₈, 3,5 мкм (диаметр колонки 2,1 мм). Подвижная фаза: 0,1 М Na-ацетатный буфер, рН 6,15 (А); ацетонитрил/вода 7/3 (об/об) (В), метанол/вода 7/3 (об/об) (С), 0,1 М Na-ацетатный буфер, рН 5,55 (D). Разделение проводили с градиентным элюированием от 3,5 до 100% В, с изменением соотношения В/С и А/D в ходе анализа, за 69,5 мин; температура колонки 35°C. Профиль градиента приведен на рис. 1, хроматограмма свободных АК плазмы – на рис. 2.

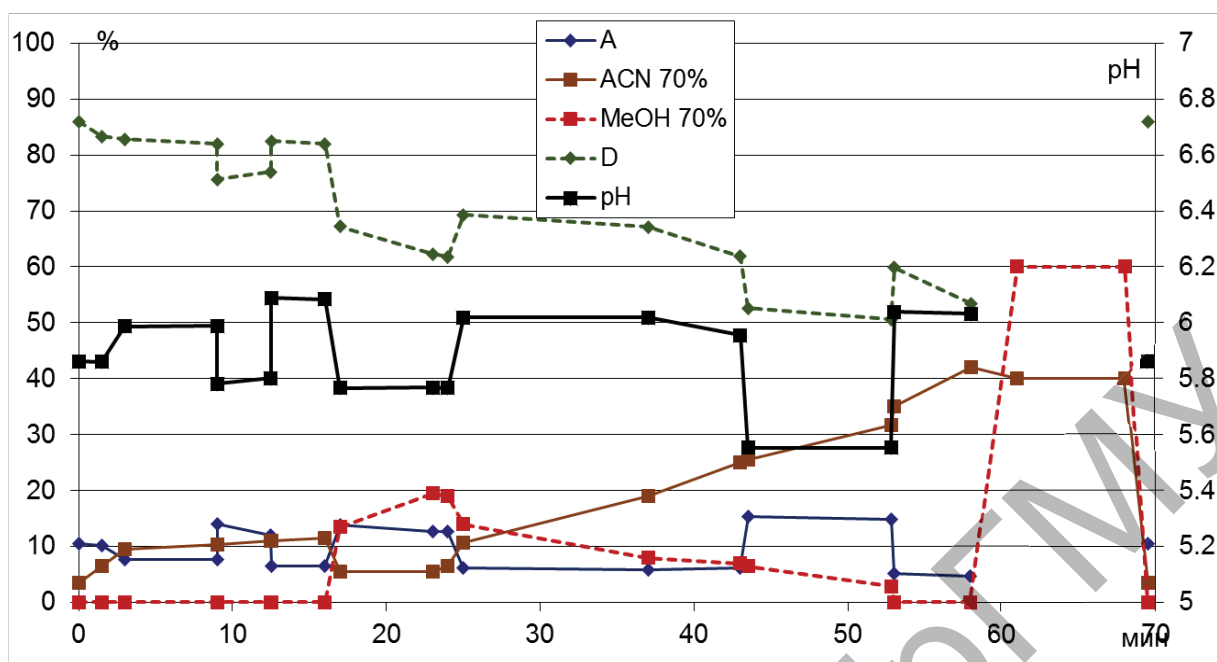


Рисунок 1. – Профиль градиента при определении ОРА-производных аминокислот методом ВЭЖХ

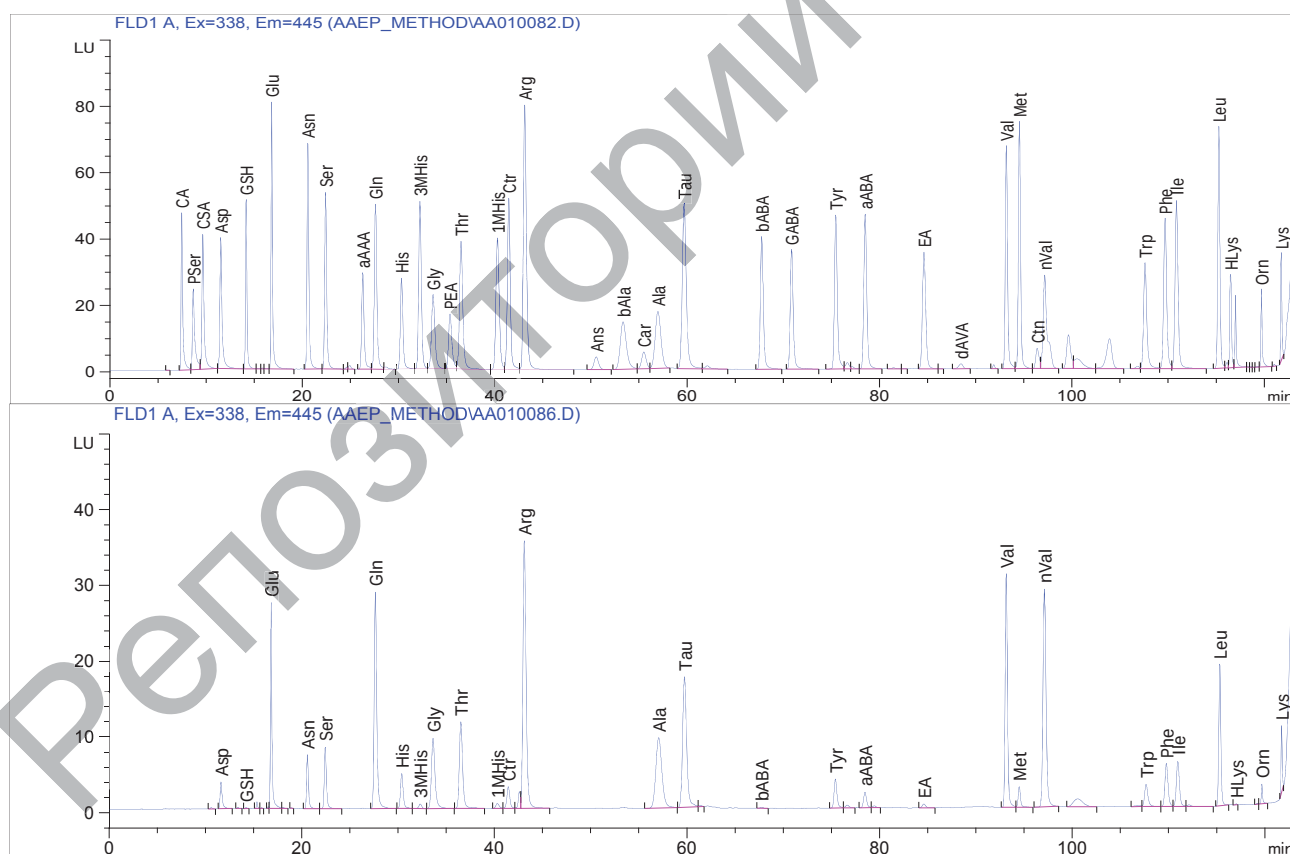


Рисунок 2. – Хроматограмма смеси аминокислот и свободных аминокислот плазмы крови человека при их разделении методом ВЭЖХ с предколоночной дериватизацией и детектированием по флуоресценции

Выводы

Разработана модификация метода ВЭЖХ для анализа свободных аминокислот и родственных им соединений в тканях и биологических жидкостях человека и животных. Новыми подходами к улучшению разрешающей способности аминокислотного анализа могут быть использование сложного комбинированного градиентного элюирования (градиент pH, двух органических компонентов), а также программирование температуры.

ЛИТЕРАТУРА

1. Metabolite profiling identifies pathways associated with metabolic risk in humans / S. Cheng [et al.] // Circulation. – 2012. – V. 125, N. 18. – P. 2222-2231.
2. Дорошенко, Е. М. Структура пула свободных аминокислот и их производных плазмы крови у пациентов с ишемической болезнью сердца и проявлениями хронической сердечной недостаточности / Е. М. Дорошенко, В. А. Снежицкий, В. В. Лелевич // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2017. – Т. 15, № 5. – С. 551–556.

ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ В РАЗВИВАЮЩИХСЯ ГИСТАМИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНАХ ГИПОТАЛАМУСА КРЫСЫ

Заерко А. В., Зиматкин С. М.

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

Гистаминергические нейроны играют важную роль в регуляции многих функций, систем и реакций организма. У взрослых млекопитающих и человека тела гистаминергических нейронов головного мозга расположены исключительно в гипоталамусе, преимущественно в его туберомамиллярной части, где образуют пять скоплений – ядер (Е1 – Е5). При этом ядро Е2 является самым крупным: составляет 40% от общего объёма гистаминергических ядер и содержит более половины гистаминергических нейронов гипоталамуса [1]. В литературе описана локализация, пространственная организация, строение, особенности метаболизма и функции гистаминергических нейронов гипоталамуса у взрослых