

МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

УДК 577.112.3:543.544:616.36-002.14

©Поздеев, Поздеев

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩИХ АМИНОТИОЛОВ И НЕЙРОАКТИВНЫХ АМИНОКИСЛОТ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ПРИ ПОМОЩИ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

В.К. Поздеев^{1}, Н.В. Поздеев²*

¹Научно-исследовательский институт гриппа Северо-Западного отделения РАМН, 197376 Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 15/17;

факс: (812)234-6195, (812)234-5720, +7(911)984-17-52, эл. почта: vkpozdeev@mail.ru

²Department of Medicine, Harbor Hospital, 3001 S. Hanover Street, Baltimore, Maryland, 21225, USA; тел.: +1(404) 421-88-60;

эл. почта: nikitapozdeyev@hotmail.com

Описан простой и чувствительный метод определения общего гомоцистеина, общего цистеина, общего глутатиона (GSH+GSSG) и нейроактивных аминокислот (Asp, Glu, Tau, GABA) при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии с предколоночной дериватизацией *орто*-фталевым альдегидом и флуориметрическим детектированием на длинах волн 360 и 470 нм для возбуждения и эмиссии, соответственно. Дериватизацию *орто*-фталевым альдегидом осуществляли в присутствии 2-меркаптоэтанола после S-карбоксиметилирования свободных сульфгидрильных групп йодоуксусной кислотой. Для определения аминотиолов, дисульфидные связи восстанавливали и связанные с белками тиолы высвобождали, добавляя дитиотрейтол к плазме. Преимущество этого метода заключается в возможности одновременного определения как гомоцистеина/цистеина/глутатиона, так и нейроактивных аминокислот в пробе. Уровни исследованных веществ были определены в плазме крови 14 здоровых волонтеров (20-45 лет) и 55 больных хроническим гепатитом С (20-49 лет). Полученные значения соответствовали ранее опубликованным данным об уровнях этих веществ в плазме. Калибровочные кривые были линейными в диапазоне концентраций 5-100 мкМ в плазме крови ($r^2=0,985-0,996$). Коэффициент вариации, рассчитанный по повторным исследованиям пробы, произведенным в один день и в течение нескольких дней, составлял 3-6% и 4-7%, соответственно. Воспроизводимость определения стандартов, добавленных в плазму составляла 94-102%. Лимит детектирования составлял 0,2-0,5 нг в 10 мкл анализируемой пробы (соотношение сигнал/шум - 3).

Ключевые слова: аминотиолы, аминокислоты, плазма, ВЭЖХ, гепатит С.

Принятые сокращения: ДТТ – 1,4-дитиотрейтол; ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота; 2-МЭ – β-меркаптоэтанол; РСА – перхлорная кислота; ИУК – йодоуксусная кислота; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; GSH – восстановленный глутатион; GSSG – окисленный глутатион; tGSH - общий глутатион; Cys – цистеин; tCys - общий цистеин; HСy – гомоцистеин; tHСy - общий гомоцистеин; HCysA -гомоцистеиновая кислота; ОРА- орто-фталевый альдегид; LOD - лимиты детекции.

* - адресат для переписки

ВВЕДЕНИЕ. Информация о содержании биологически активных аминотиолов: гомоцистеина (HCy), цистеина (Cys), глутатиона (GSH) и нейроактивных аминокислот (Glu, Asp, GABA и Tau) необходима для лучшего понимания патогенеза заболевания человека, оценки прогноза и мониторингования эффективности лечения. Ранее было показано, что гипергомоцистеинемия вызывает окислительный стресс и повреждение эндоплазматического ретикулаума посредством активации медиаторов воспаления (NF κ B, IL-6, IL-1b, IL-8) [1-3]. Это способствует прогрессированию заболеваний сердечно-сосудистой системы, нейродегенеративных заболеваний, хронической почечной и печеночной недостаточности [4-6]. Гипергомоцистеинемия в сочетании с гиперцистеинемией оказывает нейротоксичное действие [7]. Низкое содержание цистеина в крови приводит к нарушению функции почек, печени, мышечной системы и кожи, вызывает задержку развития, депигментацию волос и повышенную сонливость [7, 8].

HCy инактивируется посредством его реметилирования в метионин и транссульфирования в Cys, главным образом в печени и почках [3]. Путь синтеза Cys начинается с реакции HCy и серина с образованием цистатионина. Эту реакцию катализирует витамин B₆-зависимый фермент цистатионин- β -синтаза. Затем цистатионин дезаминируется в Cys и оксибутират в реакции, катализируемой другим B₆-зависимым ферментом цистатиониназой [1, 3]. Cys стабилизирует третичную структуру белков, формируя дисульфидные связи. Он также является предшественником GSH [7]. Водорастворимый трипептид GSH (гамма-глутамил-L-цистеинилглицин) присутствует во всех тканях и благодаря наличию реактивной сульфгидрильной группы участвует в многочисленных реакциях метаболизма, в частности, поддерживает функциональную активность мембран, участвует в механизмах передачи нервных импульсов [9], синтезе белков и ДНК, модулировании конформационного состояния белковых молекул, регулировании активности ряда ферментов, механизмах антиоксидантной защиты [10].

Количественное определение уровней нейроактивных аминокислот (Glu, Asp, Asn, Gly, GABA, Tau) в плазме [11, 12], ткани мозга и цереброспинальной жидкости [13, 14] помогает в понимании этиологии и патогенеза неврологических и психиатрических заболеваний.

Результаты количественного определения исследуемых веществ могут быть искажены вследствие неоптимального выполнения различных этапов метода. В настоящей статье мы произвели попытку упростить и повысить надёжность ВЭЖХ метода определения биологически активных аминотиолов и нейроактивных аминокислот.

МЕТОДИКА.

Объекты исследования. 14 здоровых волонтеров (6 мужчин и 8 женщин, 20-45 лет), не принимающих никаких медицинских препаратов и ведущих здоровый образ жизни, были использованы в качестве контрольной группы. Уровни аминотиолов и нейроактивных аминокислот, также были определены в плазме крови 55 больных хроническим гепатитом С (35 мужчин и 20 женщин, 20-49 лет) Диагноз подтверждён серологическими методами, включая HCV Ab, и количественным определением RNA HCV в крови тест-системами “Амплисенс HCV FRT” ЦНИИ эпидемиологии МЗ РФ (Москва, Россия). Стеатоз печени диагностирован у 22 пациентов, у 33 пациентов стеатоз не выявлен.

Химические реагенты и растворы. L-гомоцистеиновая кислота (HCysA), DL-гомоцистеин, DL-цистеин, L-GSH (восстановленный), GSSG (окисленный), калибровочная смесь аминокислот (25 нМ L-Ala, L-Arg, L-Asp, L-Cys, L-Glu, Gly, L-His, L-Ile, L-Leu, L-Lys, L-Met, L-Phe, L-Pro, L-Ser, L-Thr, L-Tyr, L-Val) для флуоресцентной детекции, таурин, гамма-амино-масляная кислота, орто-фталевый альдегид, DL-дитиотрейтол, йодуксусная кислота, 2-меркаптоэтанол, Na₂ЭДТА, додецилсульфат-Na были получены от “Sigma-Aldrich” (США). Ацетонитрил и другие реактивы высокой степени очистки были изготовлены в России. Также использовались фильтры типов HA и HV, размер пор 0,45 мкм от “Millipore Corporation” (Япония).

50 мМ раствор йодуксусной кислоты готовили ежедневно на основе 0,1 М NaBH_4 . Матричный раствор дериватирующего реагента приготавливался посредством растворения 25 мг *o*-фталевого альдегида в 500 мкл метанола с последующим добавлением 100 мкл 2-МЭ. Матричный раствор сохраняет свою активность при хранении при -20°C в течение недели. Рабочий раствор дериватирующего реагента готовили ежедневно, смешивая 60 мкл матричного раствора с 440 мкл 0,13 М NaBH_4 . 30 мМ раствор ДТТ готовили ежедневно на основе 0,5 М Na_2HPO_4 , pH 8,0.

Сбор и приготовление пробы. Кровь собирали в BD вакутейнеры, содержащие 5,4 мг ЭДТА (конечная концентрация EDTA 1,4-1,8 мг/мл крови). После аккуратного перемешивания контейнеры охлаждали на льду и центрифугировали при 4000 g в течение 7 мин при $+4^\circ\text{C}$. Плазму без признаков гемолиза собирали в пластиковые 1,5 мл пробирки таким образом, чтобы после сбора в пробирке содержалось минимальное количество воздуха, и хранили при -70°C до последующего анализа. Перед ВЭЖХ пробу оттаивали при $+4^\circ\text{C}$. HСu и Cys высвобождали из белков посредством добавления 50 мкл 30 мМ раствора ДТТ к 200 мкл плазмы и инкубирования в течение 10 мин при $+4^\circ\text{C}$.

Депротеинизация. 120 мкл 0,75 М раствора HClO_4 добавляли к пробе (200 мкл плазмы + 50 мкл раствора ДТТ) и смесь перемешивали пластиковым шпателем. Затем добавляли 10 мкл калибровочного раствора и пробу центрифугировали при 10000 g в течение 5 мин при $+4^\circ\text{C}$. Супернатант фильтровали через 0,45 мкм фильтр и использовали для дериватизации.

Дериватизация. 20 мкл раствора йодуксусной кислоты и 20 мкл 3 М NaOH добавляли к 100 мкл пробы (конечный pH 12). После 30 сек инкубации при комнатной температуре к пробе добавляли 70 мкл OPA/2-МЭ-реагента и пробу тщательно перемешивали. В течение 1 мин инкубации при комнатной температуре осуществлялась дериватизация, затем реакцию прекращали посредством добавления 15 мкл 3 М H_3PO_4 , что приводило к падению pH до 6-7. Затем 10 мкл реакционной смеси немедленно вводили в ВЭЖХ систему.

ВЭЖХ система и условия разделения. Хроматографию осуществляли при помощи ВЭЖХ системы Agilent Technologies 1100 HPLC, оборудованной двухканальным насосом и флуориметрическим детектором. Длины волн возбуждения и эмиссии были выставлены на 360 и 470 нм, соответственно. Разделение осуществляли на аналитической колонке Biophase ODS (250×3,5 мм, 5 мкм), производства "Bioanalytical Systems Inc." (Великобритания).

В состав подвижной фазы А входили: 30 мМ Na_2HPO_4 , 0,5 мМ $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$, 0,25 мМ додецилсульфат натрия, 10% ацетонитрил (об/об), pH 5,45 (pH доводили ледяной уксусной кислотой). В состав подвижной фазы Б входили: 30 мМ Na_2HPO_4 , 0,5 мМ $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$, 0,25 мМ додецилсульфат натрия и 30% ацетонитрила (об/об), pH 6,3.

GSSG, GSH, Asp и Cys элюировали изократически при помощи подвижной фазы А при скорости потока 1,0 мл/мин (0-8 мин). Остальные вещества разделяли при помощи линейного градиента: 8-14 мин – линейный прирост доли подвижной фазы В до 16% (выход пиков до HСu включительно, pH 5,6); 14-42 мин – линейный прирост доли подвижной фазы В до 58% - последний пик метионина выходил на 42-45 мин (pH 5,9). Затем колонку промывали 50% ацетонитрилом с водой в течение 15 мин, после чего уравнивали 100% подвижной фазой А в течение 20 мин перед впрыском следующей пробы.

Калибровка, воспроизводимость, чувствительность, лимит детектирования. Наиболее стабильные результаты калибровки были получены, когда калибровочные растворы добавляли в суспензию перед центрифугированием HClO_4 -белкового преципитата (табл. 1). Линейные регрессионные коэффициенты (r^2) рассчитывали для следующих концентраций веществ: Asp, GABA, -5, 10, 25, 50 мкМ; GSSG, GSH, HСu, Glu, Tau – 10, 25, 50, 100 мкМ ($r^2=0,985-0,996$). Коэффициент вариации метода рассчитывали по формуле $\text{CV}\% = \text{среднее квадратическое}$

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОТИОЛОВ И НЕЙРОАКТИВНЫХ АМИНОКИСЛОТ ВЭЖХ-МЕТОДОМ

отклонение, делённое на арифметическое среднее, выраженное в процентах. Для оценки вариабельности метода пробу хранили при -70°C , анализировали многократно в течение одного дня и в течение 2 недель (1 повтор каждые 2 дня). Коэффициент вариации в пределах одного дня и в течение 2 недельного периода составлял 4-7% и 3-6%, соответственно. Воспроизводимость, рассчитанную по увеличению площадей пиков при добавлении стандартов в плазму (Asp - 5мкМ, GSH, HCy, Glu по 10 мкМ, Tau-50 мкМ, Cys-100 мкМ), находилась в пределах 94-102%. Лимиты детектирования (LOD) исследуемых веществ при соотношении сигнал/шум - 3 находились в диапазоне 0,2-0,5 нг на 10 мкл инъектируемой пробы. Математическую обработку результатов проводили при помощи Microsoft Excel. Достоверность разностей оценивали при помощи t-критерия Стьюдента, $p < 0,05$ принимали за достоверный уровень значимости.

Таблица 1. Лимиты детектирования, воспроизводимость (%), коэффициент линейной регрессии калибровок (r^2), коэффициенты вариации [C.V.(%)] в пределах одного дня и в течение 2 недельного интервала [C.V.(%)] при определении аминотиолов и аминокислот в плазме крови предлагаемым методом.

Калибровка	GSH	Cys	HCy	Asp	Glu	Tau
Лимит детектирования, нг/10мкл вводимой пробы	0,5	0,5	0,5	0,2	0,5	0,2
r^2	0,987	0,996	0,994	0,985	0,992	0,986
Воспроизводимость, % (n=7)	94±5	99±5	95±7	101±3	102±7	98±4
Коэффициент вариации CV% в пределах одного дня (n=7)	6	5	6	3	4	3
Коэффициент вариации CV% в течение 2 недельного интервала (n=7)	7	6	7	4	6	5

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Для повышения надёжности метода и уменьшения влияния артефактов были предприняты следующие меры: 1) стабилизирующие реагенты и антиоксиданты (ЭДТА, дитиотрейтол, йодуксусная кислота, 2-меркаптоэтанол) использовались на различных этапах метода; 2) кровь собирали в вакутейнеры, содержащие ЭДТА, быстро охлаждали до 0°C и немедленно центрифугировали при $+4^{\circ}\text{C}$ для удаления форменных элементов крови, полученную плазму анализировали немедленно или хранили при -70°C ; 3) в процессе дериватизации GSH, HCy и Cys стабилизировали повышенной концентрацией 2-меркаптоэтанола; 4) перед введением пробы в ВЭЖХ систему, пробы нейтрализовали до pH 6-7; 5) для целей калибровки стандарты известных веществ добавляли в кислотный преципитат плазмы перед центрифугированием (на последнем этапе депротеинизации); 6) для повышения чувствительности метода, концентрации растворов были подобраны таким образом, чтобы уменьшить разведение пробы на этапах её подготовки и дериватизации.

Связывание металлов. ЭДТА – хелатирующий металлы антикоагулянт - широко используемый для предотвращения, катализируемых металлами реакций окисления аминокислот [15]. В нашем методе концентрация ЭДТА во время сбора крови составляла 4-5 мМ (1,4-1,8 мг/мл). На этапе депротеинизации концентрация ЭДТА падала до 0,8-1 мг/мл. Наконец, подвижная фаза для ВЭЖХ содержала 0,45 мМ ЭДТА. Таким образом, чувствительные к окислению вещества были защищены на всех этапах метода.

Восстановление тиолов. Восстановление GSH, HCy и Cys, а также высвобождение их связанной с белками фракции является важным этапом, влияющим на количественное их определение. Значительная часть HCy и Cys

в плазме ковалентно связана с белками. Свободный (восстановленный) HScy составляет только 1% от общего HScy, а 70% HScy связано с белками. Его окисленные (-S-S-) формы составляют 10-20% от общего HScy плазмы [16, 17]. Для восстановления аминотиолов Rizzo и соавторы [18] использовали обработку плазмы ДТТ (конечная концентрация 0,5 мМ) в течение 30 мин при +4°C. Katrusyak и соавторы [19] обнаружили, что 0,2-0,4 мкмоль ДТТ на 100 мкл плазмы (конечная концентрация ДТТ 2,0-4,0 мМ) достаточно для восстановления дисульфидов при 30 мин инкубации при +4°C. Pagoni и соавторы [20] использовали 10 мМ конечную концентрацию ДТТ и 5-минутную инкубацию при комнатной температуре. Мы добавляли 50 мкл 30 мМ раствора ДТТ к 200 мкл пробы (конечная концентрация 6,0 мМ) и инкубировали смесь 10 мин при +4°C. Раствор ДТТ приготавливали ежедневно. Эффективность раствора ДТТ быстро снижалась при хранении при комнатной температуре более 2 дней. Использование ДТТ позволяет измерить содержание общего Cys и общего HScy, которые являются суммой свободной, связанной с белками и окисленной форм [16, 17]. Следует также отметить, что проведение реакции с ДТТ при +4°C и сокращение длительности инкубации уменьшает деградацию GSH и GSSG, катализируемую гамма-глутамилтрансферазой [21].

Калибровка глутатиона. Точная калибровка GSH и GSSG является трудновыполнимой задачей из-за взаимных превращений окисленной и восстановленной форм во время подготовки пробы и дериватизации. Ферменты, оксигемоглобин и активные формы кислорода приводят к окислению GSH до GSSG. С другой стороны, GSSG восстанавливается до GSH под воздействием 2-МЭ на этапе дериватизации. Мы провели попытку количественно оценить процесс окисления/восстановления GSH/GSSG посредством анализа стандартных растворов GSH и GSSG и оценки площадей пиков (рис. 1). Неудивительно, что даже когда стандартные растворов GSH (А) или GSSG (Б) добавляли к плазме по отдельности, это приводило к увеличению размеров обоих пиков GSH и GSSG. Основываясь на измерениях площадей пиков, мы рассчитали, что приблизительно 30% стандарта GSH окислялось до GSSG, и 68% стандарта GSSG восстанавливалось до GSH.

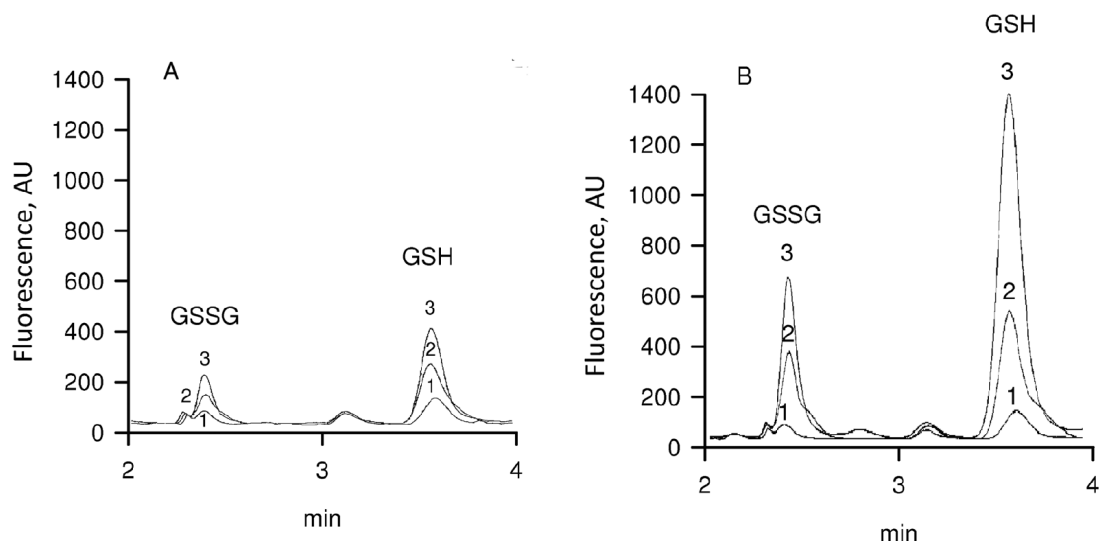


Рисунок 1.

Фрагменты хроматограмм (первый этап - изократическая элюция подвижной фазой А при pH 5,45, флуоресцентная детекция, возбуждение-эмиссия 360-470 нм) плазмы без и с добавлением GSH (А) или GSSG (Б). 1 - плазма здорового волонтера; 2 - в плазму добавлены по 25 мкМ GSH (А) или GSSG (Б); 3 - в плазму добавлены по 50 мкМ GSH (А) или GSSG (Б). При добавлении каждого из веществ оба пика увеличиваются, так как в ходе высвобождения и дериватизации 30% GSH окисляется до GSSG и 68% GSSG восстанавливается до GSH. Путём суммирования площадей пиков GSH и GSSG представляется возможность рассчитывать tGSH.

Asensi и соавторы [22] предложили рассчитывать общий глутатион по формуле $tGSH = GSH + 2GSSG$, что закономерно, учитывая, что 2 молекулы GSH объединяются в одной молекуле GSSG. Однако, эта формула позволяет количественно определить общий глутатион только в том случае, если концентрация GSSG рассчитана без ошибки на базе калибровки внешним стандартом. Согласно нашей методики, в процессе подготовки/derivатизации образца большая часть GSSG восстанавливается до GSH и частично GSH окисляется до GSSG, поэтому мы предлагаем другую формулу для расчета tGSH. Флуоресценция одной молекулы GSSG равна флуоресценции двух молекул GSH (это связано с тем, что число аминокрупп одной молекулы GSSG, участвующих в derivатизации, равно числу аминокрупп в двух молекулах GSH). Общий глутатион мы рассчитывали как $tGSH = GSH + GSSG$, используя общую флуоресценцию добавленного в плазму стандарта GSH, суммируя увеличение площадей пиков GSH и GSSG. Этот метод позволяет определять только общий глутатион. Проблема количественного определения индивидуальных концентраций GSH и GSSG, а также соотношения GSH/GSSG требует дальнейших исследований.

Депротеинизация. Stempak и соавторы [21] исследовали действие перхлорной (PCA), трихлоруксусной, метафосфорной и 5-сульфосалициловой кислот на стабильность определения GSH и GSSG в цельной крови. Они пришли к выводу, что при использовании 5-сульфосалициловой кислоты стабильность проб была недостаточной. Метафосфорная кислота не обеспечивает полного удаления белков, а при использовании трихлоруксусной кислоты образуются дополнительные вызывающие помехи пики. Было предложено использовать перхлорную кислоту в конечной концентрации 15% для определения GSH в цельной крови. При этом предпочтительно исследовать депротеинизат немедленно, но также возможно его хранение без потерь в течение 4 недель при -80°C . Однако, Liu и соавторы [23] показали, что высокая концентрация (23%) перхлорной кислоты приводит к окислению GSH до GSSG. Stein и соавторы [24] установили, что депротеинизация 1,25% концентрацией перхлорной кислоты при исследовании GSH и GSSG в различных биологических жидкостях и тканях (сыворотка крови, желчь, печень, почки) позволяет получать стабильные результаты, сохраняя образцы в течение 7-10 дней при -70°C .

С целью предотвращения окисления тиолов мы депротеинизировали плазму немедленно после инкубации с ДТТ и ЭДТА при $+4^{\circ}\text{C}$. На первом этапе 2,44% концентрация достигалась путём добавления к образцу 120 мкл 0,75 М перхлорной кислоты. После перемешивания преципитата шпателем и добавления 10 мкл калибровочного раствора, финальная концентрация перхлорной кислоты становилась 2,4%. Центрифугирование, derivатизация, хроматография осуществлялись немедленно. В случае необходимости депротеинизат образцов аликвотировали и хранили при -70°C . В этих условиях наблюдались небольшие (2-5%) изменения концентрации веществ: количество GSSG повышалось, GSH и HCy – снижалось, нейроактивных аминокислот – не изменялось. Однако, 2-х часовое хранение депротеинизата при $+4^{\circ}\text{C}$ приводило к 10% снижению концентраций GSSG, GSH, HCy (при 4-х часовом хранении снижение составляло 15-20%). Эти данные согласуются с ранее установленным фактом, что быстрая кислотная депротеинизация и глубокое охлаждение предупреждают гамма-глутамилтрансферазную ферментатическую деградацию GSH и GSSG [21, 25].

Условия хроматографии. Хроматографические условия были подобраны для наилучшего разделения аминотиолов и нейроактивных аминокислот (GSSG, GSH, Cys, HCy, Asp, Glu, Tau, GABA), поэтому ряд аминокислотных пар (Gln+His, Gly+Thr, Phe+Ala, Val+Met) совмещаются или разделяются частично (рис. 2). Для оптимального разделения GSSG, GSH, Cys, Asp была использована изократическая элюция подвижной фазой А, содержащей 10% ацетонитрила (pH $5,45 \pm 0,02$), а затем линейный градиент для элюции Asn, Glu, Ser, HCy, Tau, GABA. На этапе выхода HCy (8-я минута) подвижная фаза содержала 16% фазы В,

pH 5,6. На выходе Met (42-я минута) подвижная фаза содержала 58% фазы В, pH 5,9. Отклонения от этого pH приводило к неполному разделению Glu с Asn или с Ser. При подкислении pH ниже 5,4 время удержания Ser укорачивалось и он совмещался с Glu. Уменьшение концентрации ацетонитрила в подвижной фазе приводило к увеличению времени удержания HCy и его совмещению с Gln. Наилучшее разделение достигалось тогда, когда объём вводимой пробы не превышал 10 мкл.

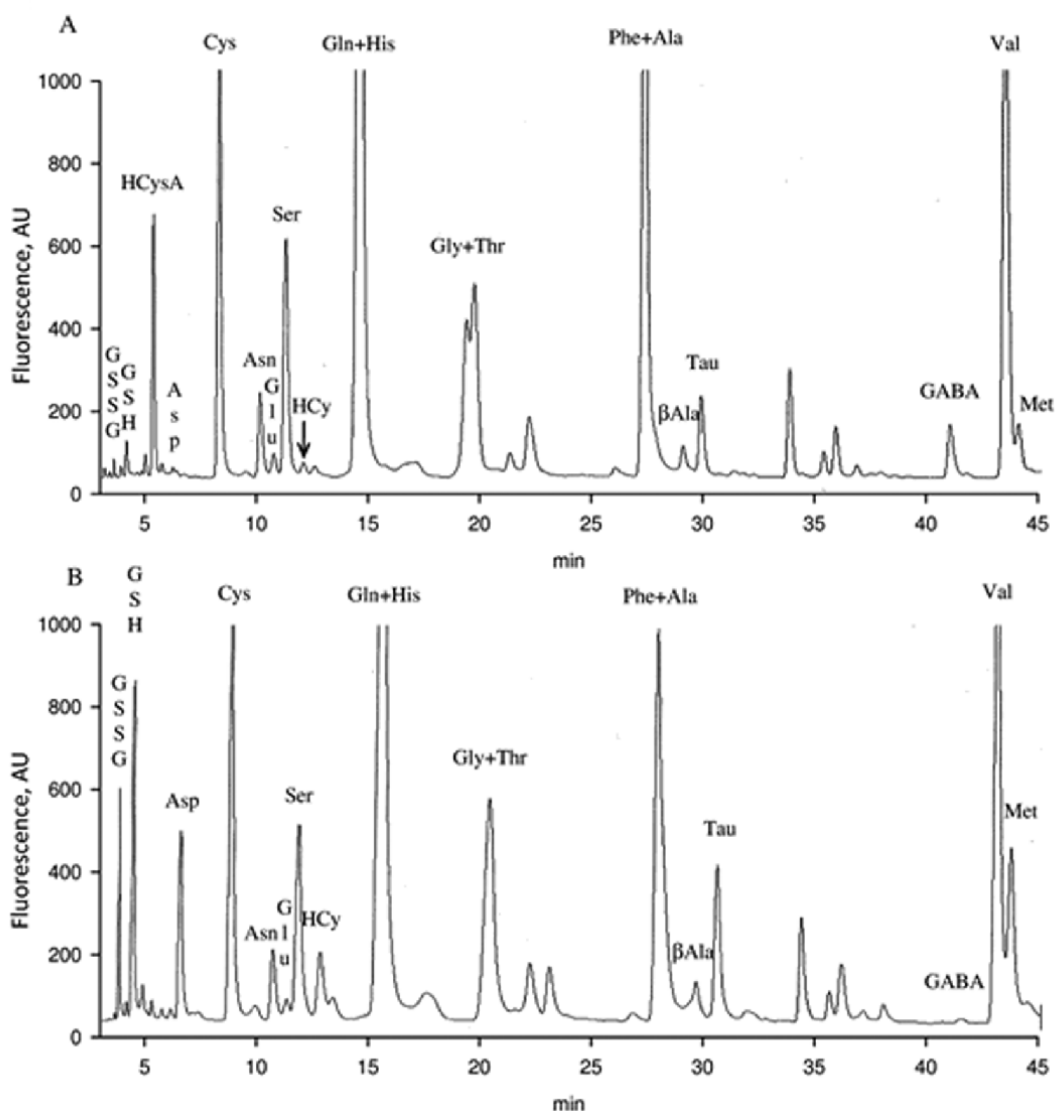


Рисунок 2.

Типичные хроматограммы плазмы здорового волонтера: 0-8 мин - изократическая элюция при pH 5,45, фаза А ; затем линейный градиент с 8 по 14 мин до 16% фазы В (pH5,6) и с 14 по 45 мин содержание фазы В линейно повышалось до 58% (pH 5,9); флуоресцентная детекция, возбуждение-эмиссия 360-470 нм. Для идентификации пиков в плазму добавлены известные вещества эквивалентно их содержанию в плазме крови: А - 50 мкМ гомоцистеиновую кислоту (HCysA), GABA; В - 50 мкМ GSH, Asp, Cys, HCy, Tau, Met.

Melnuk и соавторы [26] для лучшего разделения тиолов в подвижную фазу добавляли 1 мМ L-октансульфоновой кислоты (ион-парный агент). Мы использовали 0,25 мМ додецилсульфат натрия и также получили полное разделение тиолов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОТИОЛОВ И НЕЙРОАКТИВНЫХ АМИНОКИСЛОТ ВЭЖХ-МЕТОДОМ

Идентификация субстратов осуществлялась по сопоставлению времен удержания веществ (пиков) нативной плазмы и при добавлении в преципитат плазмы стандартов. Типичные хроматограммы представлены на рисунках 2 и 3. На рисунке 2 показано разделение GSSG, GSH, Asp, Cys, Asn, Glu, Ser, HCy, Tau, GABA. Добавленные растворы стандартов (GSH, Asp, Cys, HCy, Tau, Met) в преципитат плазмы позволяют идентифицировать пики. Увеличение пика GSSG после добавления GSH (рис. 2B) подтверждает то, что частично GSH окисляется до GSSG в процессе выполнения методики.

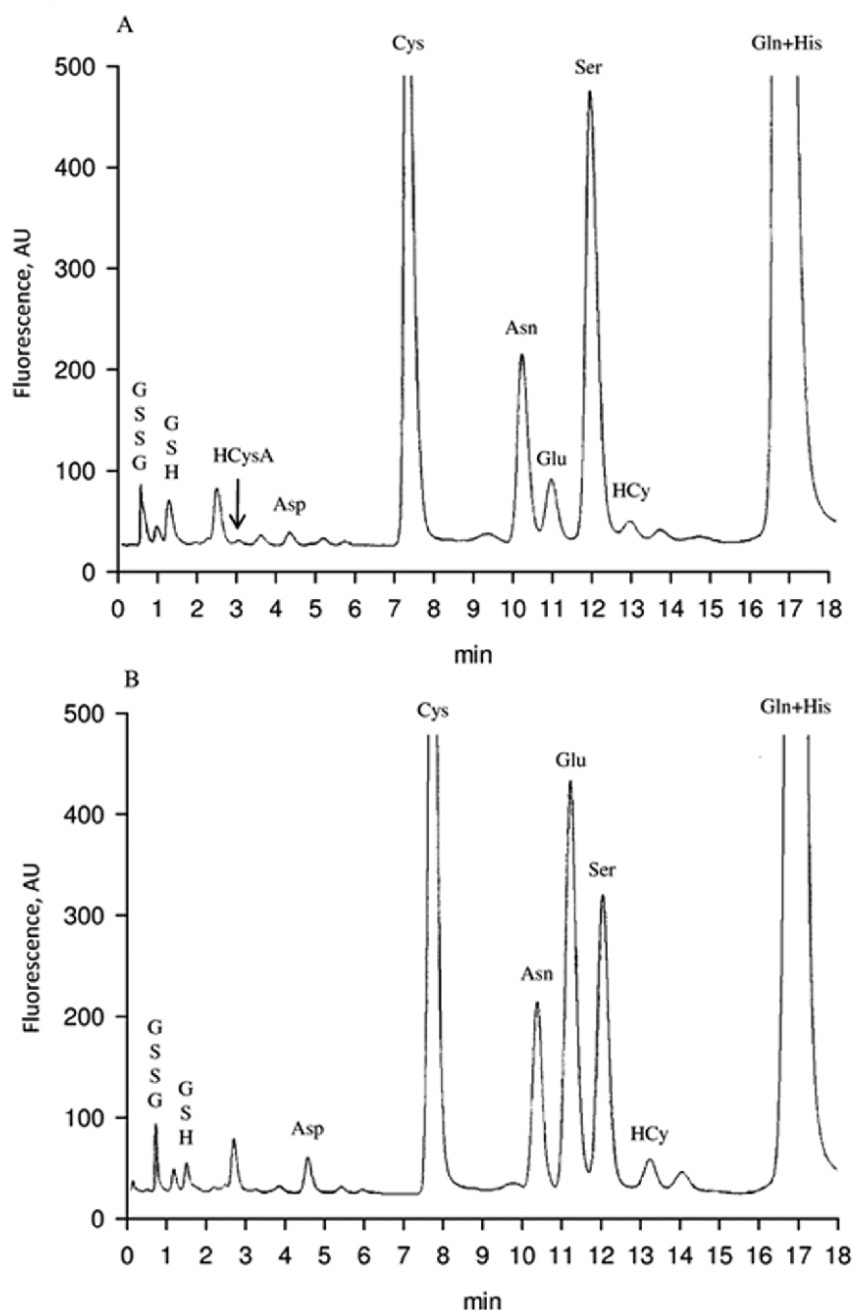


Рисунок 3.

Фрагменты типичных хроматограмм (0-8 мин - изократическая элюция подвижной фазой А при рН 5,45; 8-18 мин линейный градиент - на 14 мин 16% фазы В, рН 5,6; флуоресцентная детекция, возбуждение- эмиссия 360-470 нм) плазмы здорового волонтера (А) и больного вирусным гепатитом С (В). Концентрации веществ в мкМ: А - Asp-1,5, Cys-202,0, Glu-10,5, HCy-6,8, tCys/tHCy-29,7; В - Asp-4,2, Cys-250,3, Glu-46,8, HCy-17,8, tCys/tHCy-14,0.

Дериватизация. Дериватизация GSH *орто*-фталевым альдегидом зависит от pH. Оптимальный pH находится между 9,5-10,0, но реакция возможна и при pH 12,0 [27, 28]. Определение окисленного глутатиона также возможно при использовании высокого pH 12,0 в процессе дериватизации GSSG *орто*-фталевым альдегидом [29]. Мы использовали pH 12,0, чтобы иметь возможность определять как GSH, так и GSSG.

Sakhi и соавторы [30] установили, что 0,4-0,6 mM концентрация OPA-реагента достаточна для дериватизации GSSG при pH 12,0 и +80°C. Увеличение концентрации OPA до 12,4 mM и 2-меркаптоэтанола до 20 мкл/мл в OPA-реагенте позволило нам упростить этот этап метода и проводить дериватизацию при комнатной температуре. В этих условиях получена стабильно высокая флуоресценция GSSG, GSH, HСu и аминокислот. Более низкие концентрации *орто*-фталевых альдегида и 2-МЭ в OPA-реагенте существенно снижают флуоресценцию аминотиолов. Fermo и соавторы [31] использовали более низкую концентрацию 2-МЭ (3:1000 об/об в конечной реакционной смеси) для определения только свободного HСu. Предлагаемый нами метод высвобождения аминотиолов с помощью ДТТ позволяет определять общий GSH, HСu, Cys и, следовательно, ставит задачу предупреждения их окисления на этапе дериватизации. Поэтому концентрация 2-МЭ была повышена до 6:1000 об/об в конечной реакционной смеси, что улучшило воспроизводимость и увеличило площадь пиков GSSG и GSH в 3,4 раза.

Перед OPA-дериватизацией осуществлялось S-карбоксиметилирование сульфгидрильных групп GSH, HСu, Cys с помощью йодуксусной кислоты [31, 32]. ИУК-блокирование сульфгидрильных групп приводит к образованию стабильно флуоресцирующих изоиндолов, хорошей воспроизводимости их определения [31, 32]. В предлагаемом нами методе перед добавлением OPA-реагента концентрация ИУК – 7,1 mM, конечная концентрация – 5,0 mM. Fermo и соавторы [31] использовали близкие к этим концентрации - перед дериватизацией 5,7 mM ИУК, конечная концентрация – 3,8 mM. Tcherkas и Denisenko [32] для блокирования сульфгидрильных групп использовали высокую концентрацию - 0,53 M ИУК, что связано с принятым ими 2-МЭ-способом высвобождения и восстановления HСu, Cys и последующей необходимостью 4-кратного превышения концентрации ИУК по отношению к концентрации 2-МЭ.

Аминотиолы и нейроактивные аминокислоты в плазме здоровых волонтеров и больных вирусным гепатитом С. На рисунке 3 показаны типичные изменения ВЭЖХ-профиля при анализе плазмы больных вирусным гепатитом С. В таблице 2 представлены ранее полученные данные разных авторов о содержании аминотиолов и нейроактивных аминокислот в плазме здоровых волонтеров и при болезни печени. Результаты наших исследований вполне согласуются с этими данными [6, 18, 26, 32-35].

Нами была обнаружена значительная гипергомоцистеинемия в плазме больных гепатитом С (табл. 2). В плазме крови этих больных концентрация HСu (15,9 мкМ) была в 2,5 раза выше по сравнению с таковой у здоровых волонтеров (6,2 мкМ), что соответствует более ранним наблюдениям [6, 36]. HСu - это биохимически активный метаболит, трансформирующийся в HСu-тиолактон, HСu-содержащие дисульфиды, гомоцистеиновую кислоту, S-нитрозо-HСu, которые принимают участие в патогенезе многих заболеваний [37]. HСu-тиолактон интегрируется в структуру белков посредством реакции с ε-аминогруппой лизина, что приводит к утрате функции этих белков и запускает аутоиммунные реакции. Например, в эндотелиальных клетках содержание HСu-тиолактона пропорционально концентрации в них HСu [2, 3]. Повышенный уровень HСu в плазме ассоциирует с увеличением риска развития инфаркта миокарда, инсульта, тромбоэмболии вен, болезни Альцгеймера, дефектов нейрональной трубки, осложнений беременности, остеопороза [3, 37].

Таблица 2. Содержание общих аминотиолов, нейроактивных аминокислот и соотношение tCys/tHSCy в плазме крови здоровых волонтеров (контрольные пробы), больных гепатитом С и циррозом печени. Значения представлены в мкМ как среднее арифметическое \pm стандартное отклонение.

Вещества	Наша результаты		Мельчук и соавторы [26]	Verina и соавторы [6]		Tcherkas и соавторы [32]	Rizzo и соавторы [18]	Palmino и соавторы [34]	Daglas и соавторы [35]	Uhe и соавторы [33]
	Контроль- ные пробы (n=14)	Гепатит С (n=55)	Контроль- ные пробы	Контроль- ные пробы	Цирроз печени	Контроль- ные пробы	Контроль- ные пробы	Контроль- ные пробы	Контроль- ные пробы	Контроль- ные пробы
tGSH**	8,2 \pm 1,4	9,4 \pm 3,4	6,9 \pm 0,5							
tHSCy***	6,2 \pm 2,4	15,9 \pm 5,6*	7,8 \pm 0,3	9,1 \pm 1,2	13,7 \pm 8,1*	8,3 \pm 0,5	7,5 \pm 2,8			
tCys***	172,3 \pm 35,3	252,8 \pm 49,7*	227,1 \pm 4,8			260 \pm 11	118,6 \pm 31,2			
tCys/tHSCy	30,3 \pm 9,9	16,9 \pm 4,9*								
Asp	1,6 \pm 0,6	2,8 \pm 0,8*				8,3 \pm 0,8		4,8 \pm 2,2	2,82 \pm 0,6	7,0 \pm 2,0
Asn	49,0 \pm 10,3	64,7 \pm 15,8*				52,0 \pm 2,8		36,3 \pm 6,0		78,0 \pm 34,0
Gln	11,7 \pm 7,1	32,2 \pm 16,9*				32,0 \pm 3,8		40,3 \pm 11,3	25,99 \pm 6,3	10,0 \pm 6,0
Tau	40,9 \pm 13,2	29,2 \pm 8,8*						34,5 \pm 6,2		62,0 \pm 26,0

Примечание: * - p<0,05, t-тест Стьюдента, ** - tGSH = GSH+GSSG; общий глутатион представляет сумму восстановленной, окисленной и связанной с белками фракций; *** - tHSCy и tCys представляют сумму свободной и связанной с белками фракций.

В плазме больных гепатитом С концентрации Glu и Asp повышены в 2,7 и 1,7 раза, соответственно, на фоне снижения концентрации Tau в 1,4 раза (табл. 2). Таурин – заменимая аминокислота, метаболически связанная с серусодержащими аминокислотами. Основной путь синтеза Tau связан с окислением цистеина в цистеиновую кислоту, которая декарбоксилируется в гипотаурин, окисляющийся до Tau [38-40]. Декарбоксилаза цистеиновой и цистеинсульфиновой кислот использует пиридоксаль-5-фосфат в качестве кофермента [38]. Значительное снижение уровня Tau, ассоциированное с повышением концентрации tCys, у больных гепатитом С, вероятно, связано со снижением активности этого фермента и дефицитом витамина B₆.

Уровень tCys у больных гепатитом С ($252,8 \pm 49,7$ мкМ) по сравнению с контрольной группой ($172,3 \pm 35,3$ мкМ) был повышен в 1,5 раза ($p < 0,02$) и ассоциирован с повышенной концентрацией HСy (табл. 2). Известно, что основной путь инактивации HСy в печени и почках с образованием Cys происходит в результате транссульфирования в ходе реакции HСy с серином [3]. Следовательно, повышение уровня Cys может указывать на компенсаторный механизм детоксикации HСy при гипергомоцистеинемии. Однако, при гепатите С этот механизм недостаточен, так как соотношение концентраций этих веществ – коэффициент tCys/tHСy в 1,9 раза меньше, чем у здоровых волонтеров.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. В настоящей работе представлен метод одновременного определения аминотиолов и нейроактивных аминокислот. Полученные результаты исследования уровней этих веществ в плазме здоровых волонтеров и больных гепатитом С согласуются с данными литературы, что подтверждает полезность метода для выявления метаболических нарушений. Мы надеемся, что метод будет использован для клинико-биохимических исследований при различных заболеваниях, в частности, при поражениях печени, диагностики метаболических нарушений на преклинической стадии и для формирования патогенетически обоснованной терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fowler B. (1997) J. Inherit. Metab Dis., **20**, 270-285.
2. Ji C., Kaplowitz N. (2004) World J. Gastroenterol., **10**, 1699-1708.
3. Jakubowski H. (2004) Cell Mol. Life Sci., **61**, 470-487.
4. Kalra D.K. (2004) Curr. Atheroscler. Rep., **6**, 101-106.
5. Collins T., Cybulsky M.I. (2001) J. Clin. Invest., **107**, 255-264.
6. Ventura P., Rosa M.C., Abbati G., Marchini S., Grandone E., Vergura P., Tremosini S., Zeneroli M.L. (2005) Liver Int., **25**, 49-56.
7. Wang W., Rusin O., Xu X., Kim K.K., Escobedo J.O., Fakayode S.O., Fletcher K.A., Lowry M., Schowalter C.M., Lawrence C.M., Fronczek F.R., Warner I.M., Strongin R.M. (2005) J. Am. Chem. Soc., **127**, 15949-15958.
8. Shahrokhian S. (2001) Anal. Chem., **73**, 5972-5978.
9. Kosower N.S., Kosower E.M. (1978) Int. Rev. Cytol., **54**, 109-160.
10. Ketterer B. (1986) Xenobiotica, **16**, 957-973.
11. Reilmann R., Rolf L.H., Lange H.W. (1994) J. Neurol. Sci., **127**, 48-53.
12. Grant S.L., Shulman Y., Tibbo P., Hampson D.R., Baker G.B. (2006) J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci., **844**, 278-282.
13. Pozdeev V.K. (1981) In: Psychophysiology Today and Tomorrow, (Bechtereva, N.P., Ed.), Pergamon Press, Oxford, New York, pp. 227-235.
14. Pozdeev V.K. (1985) Acta Neurol. (Napoli), **7**, 186-190.
15. Stadtman E.R. (1993) Annu. Rev. Biochem., **62**, 797-821.
16. Andersson A., Lindgren A., Hultberg B. (1995) Clin. Chem., **41**, 361-366.
17. Togawa T., Sengupta S., Chen H., Robinson K., Nonevski I., Majors A.K., Jacobsen D.W. (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun., **277**, 668-674.

18. *Rizzo V., Montalbetti L., Valli M., Bosoni T., Scoglio E., Moratti R.* (1998) *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **706**, 209-215.
19. *Katrusiak A.E., Paterson P.G., Kamencic H., Shoker A., Lyon A.W.* (2001) *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **758**, 207-212.
20. *Paroni R., De V. E., Cighetti G., Arcelloni C., Fermo I., Grossi A., Bonini P.* (1995) *Clin. Chem.*, **41**, 448-454.
21. *Stempak D., Dallas S., Klein J., Bendayan R., Koren G., Baruchel S.* (2001) *Ther. Drug Monit.*, **23**, 542-549.
22. *Asensi M., Sastre J., Pallardo F.V., Garcia de la A.J., Estrela J.M., Vina J.* (1994) *Anal. Biochem.*, **217**, 323-328.
23. *Liu S., Ansari N.H., Wang C., Wang L., Srivastava S.K.* (1996) *Curr. Eye Res.*, **15**, 726-732.
24. *Stein A.F., Dills R.L., Klaassen C.D.* (1986) *J. Chromatogr.*, **381**, 259-270.
25. *Anderson M.E.* (1985) *Methods Enzymol.*, **113**, 548-555.
26. *Melnyk S., Pogribna M., Pogribny I., Hine R.J., James S.J.* (1999) *J. Nutr. Biochem.*, **10**, 490-497.
27. *Cereser C., Guichard J., Draï J., Bannier E., Garcia I., Boget S., Parvaz P., Revol A.* (2001) *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **752**, 123-132.
28. *Yan C.C., Huxtable R.J.* (1995) *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.*, **672**, 217-224.
29. *Lenton K.J., Therriault H., Wagner J.R.* (1999) *Anal. Biochem.*, **274**, 125-130.
30. *Sakhi A.K., Blomhoff R., Gundersen T.E.* (2007) *J. Chromatogr. A*, **1142**, 178-184.
31. *Fermo I., Arcelloni C., De V.E., Vigano S., Paroni R.* (1992) *J. Chromatogr.*, **593**, 171-176.
32. *Tcherkas Y.V., Denisenko A.D.* (2001) *J. Chromatogr. A*, **913**, 309-313.
33. *Uhe A.M., Collier G.R., McLennan E.A., Tucker D.J., O'Dea K.* (1991) *J. Chromatogr.*, **564**, 81-91.
34. *Palmio J., Huuhka M., Saransaari P., Oja S.S., Peltola J., Leinonen E., Suhonen J., Keranen T.* (2005) *Psychiatry Res.*, **137**, 183-190.
35. *Dagilas A., Kimiskidis V., Aggelopoulou M., Kapaki E., Fiteli C., Libitaki G., Papagiannopoulos S., Kazis D., Kazis A., Aidonis A.* (2005) *Otol. Neurotol.*, **26**, 476-480.
36. *Bhattacharya R., Shuhart M.C.* (2003) *J. Clin. Gastroenterol.*, **36**, 242-252.
37. *Chwatko G., Jakubowski H.* (2005) *Anal. Biochem.*, **337**, 271-277.
38. *Hope D.B.* (1955) *Biochem. J.*, **59**, 497-500.
39. *Jacobsen J.G., Smith L.H. Jr.* (1963) *Nature*, **200**, 575-577.
40. *Brand A., Leibfritz D., Hamprecht B., Dringen R.* (1998) *J. Neurochem.*, **71**, 827-832.

Поступила: 01. 10. 2009.

**DETERMINATION OF TOTAL AMINOTHIOLS AND NEUROACTIVE AMINO ACIDS
IN PLASMA BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH
FLUORESCENCE DETECTION**

V.K. Pozdeev¹, N.V. Pozdeyev²

¹Saint-Petersburg Research Institute of Influenza, Russian Academy of Medical Sciences, Northwestern Branch, Saint-Petersburg, prof. Popov str., 15/17, 197376 Russia;

tel.: +7 (812) 234-57-20, +7 (911) 984-17-52; fax: +7 (812) 234-61-95; e-mail: vkpozdeev@mail.ru

²Department of Medicine, Harbor Hospital, 3001 S. Hanover Street, Baltimore, Maryland, 21225, USA;
tel.: +1(404) 421-88-60; e-mail: nikitapozdeyev@hotmail.com

This paper describes a simple and sensitive reversed-phase HPLC method for the determination of total homocysteine, total cysteine, total glutathione (GSH+GSSG), and neuroactive amino acids (Asp, Glu, Tau, GABA) using precolumn derivatization with ortho-phthaldialdehyde and fluorimetric detection at 360 and 470 nm for emission and excitation, respectively. Derivatization was performed with ortho-phthaldialdehyde in the presence of 2-mercaptoethanol after alkylation of the free sulfhydryl groups with iodoacetic acid. For determination of total aminothiols, the disulfide bonds were reduced and protein-bound thiols were released by addition of dithiothreitol to the plasma sample. The advantage of this method is the simultaneous determination of both homocysteine/cysteine/glutathione and neuroactive amino acids in the sample. The plasma levels of studied compounds were determined in 14 healthy volunteers (20-45 years old) and 55 patients with chronic hepatitis C (20-49 years old) and the resulting numbers were in a good agreement the studies published earlier. The calibration curves were linear over a concentration range of 5-100 μ M in plasma ($r^2=0.985-0.996$). The intraday and interday coefficients of variation were 3-6% and 4-7%, respectively. The recovery of the standards added to the plasma samples ranged from 94 to 102%. The limits of detection (LOD) were 0.2-0.5 ng per 10 μ l injection volume (signal-to-noise ratio of 3).

Key words: aminothiols, amino acids, plasma, HPLC, hepatitis C.