

МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ И СТАНДАРТИЗАЦИИ

УДК 547.857.5;616.379.008.64

©Коллектив авторов

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЭНДОГЕННОГО АЛЛОКСАНА В КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Д.А. Корженевский^{1}, А.А. Селищева^{1,2}, С.В. Савельев¹*

¹АНО Институт биомедпроблем, 117105, Москва, Новоданиловская наб, д. 4а;
эл. почта: biomedpro@biomedpro.ru

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Биологический
факультет, 119998, Москва, Ленинские горы, д.1.

Для определения аллоксана в крови здоровых добровольцев проводили его стабилизацию понижением рН среды до 2,0. Аллоксан определяли методом спектрофотометрии после образования цветного продукта с *o*-фенилендиаминном с использованием калибровки по внутреннему стандарту. Анализ крови 75 здоровых добровольцев показал, что уровень аллоксана у большинства людей колеблется в пределах от 41 до 265 мкМ. Вместе с тем, обнаружена небольшая группа людей, которые являются здоровыми, несмотря на то, что уровень аллоксана в их крови существенно выше указанного предела.

Ключевые слова: кровь, аллоксан, спектрофотометрия.

ВВЕДЕНИЕ. Внимание исследователей к аллоксану - продукту превращения мочевой кислоты - было привлечено после того, как в 1943 году продемонстрировали его способность вызывать у лабораторных животных диабет при внутривенном введении [1] за счет подавления секреции инсулина [2]. Относительно механизма его действия существует множество предположений. Известно, что основным путем его проникновения в клетку является взаимодействие с инсулинзависимым транспортером глюкозы. Наиболее общепринятым является мнение, согласно которому аллоксан под действием внутриклеточного антиоксиданта глутатиона обратимо превращается в диалуровую кислоту [3]. Эта кислота в дальнейшем распадается, генерируя активные формы кислорода, вызывающие окислительный стресс β -клеток, которые имеют более слабую антиоксидантную систему, чем большинство других клеток организма [4]. Однако из числа потенциальных причин аллоксанового диабета нельзя исключать и его способность ингибировать глюкокиназу из-за окисления двух SH-групп [5].

Вместе с тем следует отметить небольшое количество исследований, посвящённых действию эндогенного аллоксана, несмотря на то, что основные методы количественного определения аллоксана были описаны достаточно давно [6]. Наиболее приемлемым из них является цветная реакция аллоксана с *o*-фенилендиаминном (ОФД). Отчасти такая ситуация может быть объяснена невысокой стабильностью водных растворов аллоксана при физиологических значениях рН, однако за прошедшие десятилетия проблема стабилизации таких растворов неоднократно подвергалась изучению и даже увенчалась созданием патентованного стабилизатора для инъекционных растворов [7]. Параллельно совершенствовались аналитические методы, и в последнее время для изучения метаболизма аллоксана широко применяется ВЭЖХ в сочетании как с традиционным спектрофотометрическим обнаружением веществ, так и с высокочувствительными электрохимическими детекторами [3]. Тем не менее, практически единственным исследованием клинического значения эндогенного аллоксана можно считать

* - адресат для переписки

исследование [8], в котором было изучено содержание аллоксана в крови детей, больных инсулинзависимым диабетом. Его авторам удалось показать повышение содержания аллоксана в крови при диабете, однако они не уделили большого внимания установлению четких границ, в которых колеблется содержание аллоксана у здоровых людей, без знания которых ценность любых исследований больных существенно падает. В связи с этим нам представлялось важным произвести дополнительное уточнение этих границ с использованием максимально жестких критериев понятия “здоровья”.

МЕТОДИКА. В работе использовались *o*-фенилендиамин, аллоксан, HClO_4 , NaH_2PO_4 , K_3PO_4 , муравьиная кислота с индексом чистоты “ACS grade” производства “Sigma-Aldrich Inc” (США), деионизированная вода с сопротивлением >18 МОм.

Образцы крови для анализа были получены у 75 добровольцев (42 женщины, 33 мужчины), в качестве показателей “здоровья” использовались следующие характеристики: общий и биохимический анализ крови, анализ на содержание стероидных и тиреоидных гормонов, инсулина и проинсулина. В окончательную выборку были включены лица, у которых все измеренные показатели находились в пределах границ, установленных ВОЗ [9].

Для оценки стабильности водных растворов аллоксана были приготовлены растворы с концентрацией аллоксана 200 мкМ в буферных системах с pH 2,5 (10 мМ р-р муравьиной кислоты), 4,5 (100 мМ NaH_2PO_4) и 7,4 (50 мМ фосфатный буфер). О стабильности аллоксана судили по спектрам УФ-поглощения в диапазоне 210-280 нМ, снятым немедленно и через 2 ч после приготовления растворов на спектрофотометре (“Cary 50” Varian, США).

Образец крови, предназначенный для измерения аллоксана, немедленно после отбора переносили в пробирку с равным объемом охлаждённого 8% раствора хлорной кислоты и тщательно перемешивали. Осажденные таким образом белки плазмы и фрагменты эритроцитов отделяли центрифугированием (12000 g, 20 мин), после чего полученный экстракт мог быть заморожен для хранения или использован немедленно.

Для измерения содержания аллоксана кислотный экстракт крови нейтрализовали охлажденным 0,5 М раствором фосфата трикалия до значения pH 4,5, которое является оптимальным для протекания цветной реакции. После удаления осадка перхлората калия путем центрифугирования (12000 g, 20 мин) каждый образец разделяли на 3 равных аликвоты. К двум первым добавляли различные объемы раствора аллоксана (0,1 мг/мл) в 0,2% (об/об) муравьиной кислоте, к третьей – 10 мкл 0,2% муравьиной кислоты. В полученные аликвоты вносился в объемном соотношении 1:4 заранее приготовленный раствор ОФД (1 мг/мл) в стабилизирующем 0,5 М фосфатном буфере (pH 4,7), содержащем 40% (об./об.) глицерина. Все образцы тщательно перемешивали и инкубировали 1 ч при комнатной температуре, после чего измеряли их оптическую плотность при длине волны 396 нм. Концентрацию аллоксана в образце рассчитывали на основании полученной таким образом внутренней калибровочной прямой.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы “Statistica 6.0” (StatSoft, Inc., США). Данные представляли в форме среднее (стандартное отклонение) для ситуации нормального распределения измеряемой величины, или медиана (1 квартиль; 3 квартиль), если распределение не удовлетворяло критериям нормальности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Для измерения содержания аллоксана в крови человека применяли модифицированную методику Арчибальда [6], использованную для аналогичных целей в работе [8]. Предварительно изучили влияние pH среды на стабильность аллоксана методом спектрофотометрии. На рисунке 1 представлены УФ-спектры растворов аллоксана после инкубации при различных значениях pH. Для свежеприготовленного раствора аллоксана при pH 2-4,5 на спектре наблюдается максимум поглощения при длине волны 222,7 нм, что соответствует данным, описанным в литературе [10].

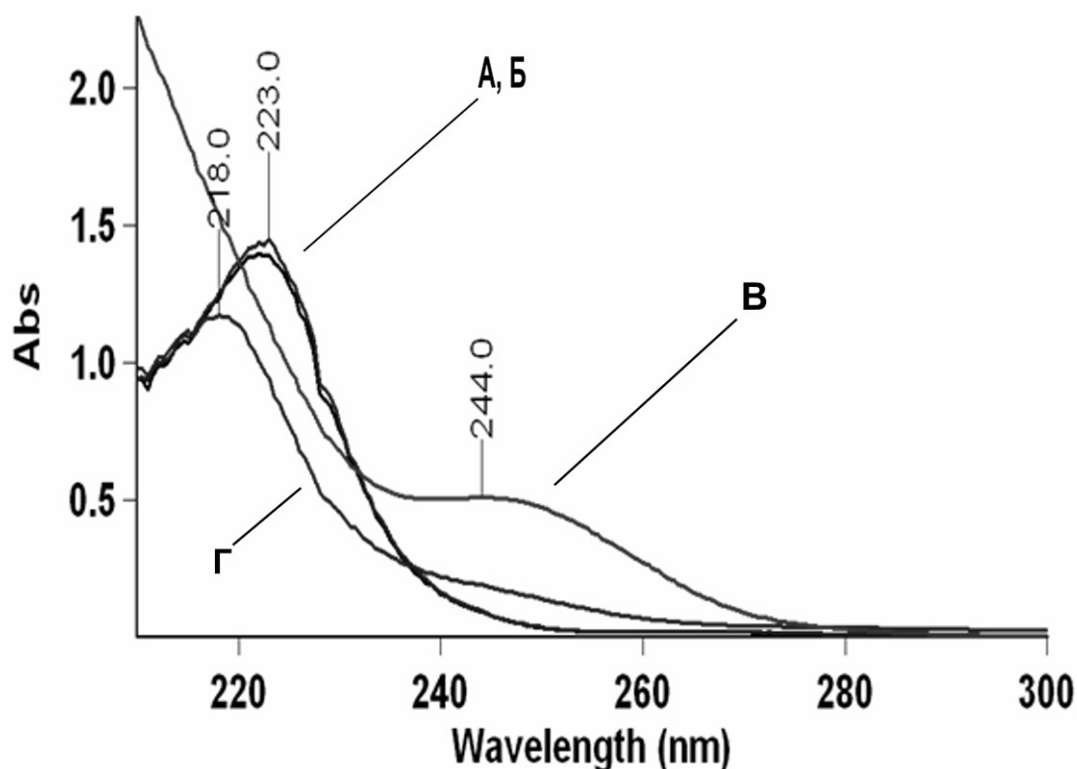


Рисунок 1.

УФ-спектры растворов аллоксана (400 мкМ) при различных значениях pH: А – pH 2,5; Б – pH 4,5; В – pH 7,4; Г – pH 7,4 после 1 ч инкубации.

Положение и интенсивность этого максимума не претерпевали заметных изменений после 2 ч инкубации при pH 2,5 или 4,5. В то же время увеличение pH до физиологических значений существенно изменяло вид спектра аллоксана: исчезал максимум при 222,7 нм, появлялось плечо при 244 нм. При инкубации в течение 1 ч на спектре появлялся максимум в области 218 нм, который, возможно, связан с превращением аллоксана в аллоксановую кислоту [5, 11].

Данный эксперимент подтвердил необходимость использования кислотной экстракции непосредственно после отбора крови, возможность хранения полученных экстрактов в течение значительных промежутков времени и отсутствие разложения аллоксана в процессе протекания аналитической реакции.

В работе [8] для оценки содержания аллоксана использовался калибровочный график по внешнему стандарту, построенный путем измерения оптической плотности (D) на длине волны 396 в серии последовательных разбавлений раствора аллоксана. В такой системе зависимость D_{396} от количества аллоксана в образце является линейной в широком диапазоне концентраций.

Однако эксперименты по добавлению известных навесок аллоксана к заранее приготовленным образцам показали, что содержащиеся в них компоненты оказывают существенное влияние на скорость протекания цветной реакции, причем вносимая ими погрешность является индивидуальной для каждого образца (данные не приводятся). Поэтому для измерений нами был принят метод внутренней калибровочной кривой. Чтобы нивелировать нелинейность, вносимую содержащимся в образце аллоксаном, к аликвотам образца добавляли две различные навески аллоксана, превышающие его ожидаемое экспериментальное

СОДЕРЖАНИЕ АЛЛОКСАНА В КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

содержание. По полученным после протекания цветной реакции значениям D_{396} определяли наклон калибровки K и рассчитывали содержание эндогенного аллоксана по формуле:

$$C = D_{396}(0) \cdot P / K,$$

где $D_{396}(0)$ – оптическая плотность в аликвоте, не содержащей экзогенного аллоксана, P – коэффициент, учитывающий разбавление образца на всех стадиях эксперимента.

Распределение уровней содержания аллоксана, измеренных данным методом в крови всех здоровых добровольцев (75 чел), показано в виде гистограммы на рисунке 2. Можно видеть, что оно неоднородно ($p < 0,05$ в тесте Шапиро-Уилка). Помимо основной группы, в которой концентрация аллоксана колеблется от 40 до 300 мкМ и распределение близко к нормальному (вставка на рис. 2, $p > 0,20$), имеется выраженная группа людей (5 чел) со значительно повышенным (до 350-500 мкМ) содержанием аллоксана. Статистический анализ результатов, полученных для основной группы, показывает, что концентрация аллоксана в крови здоровых людей может колебаться в широких пределах ($119,5 \pm 49,0$ мкМ).

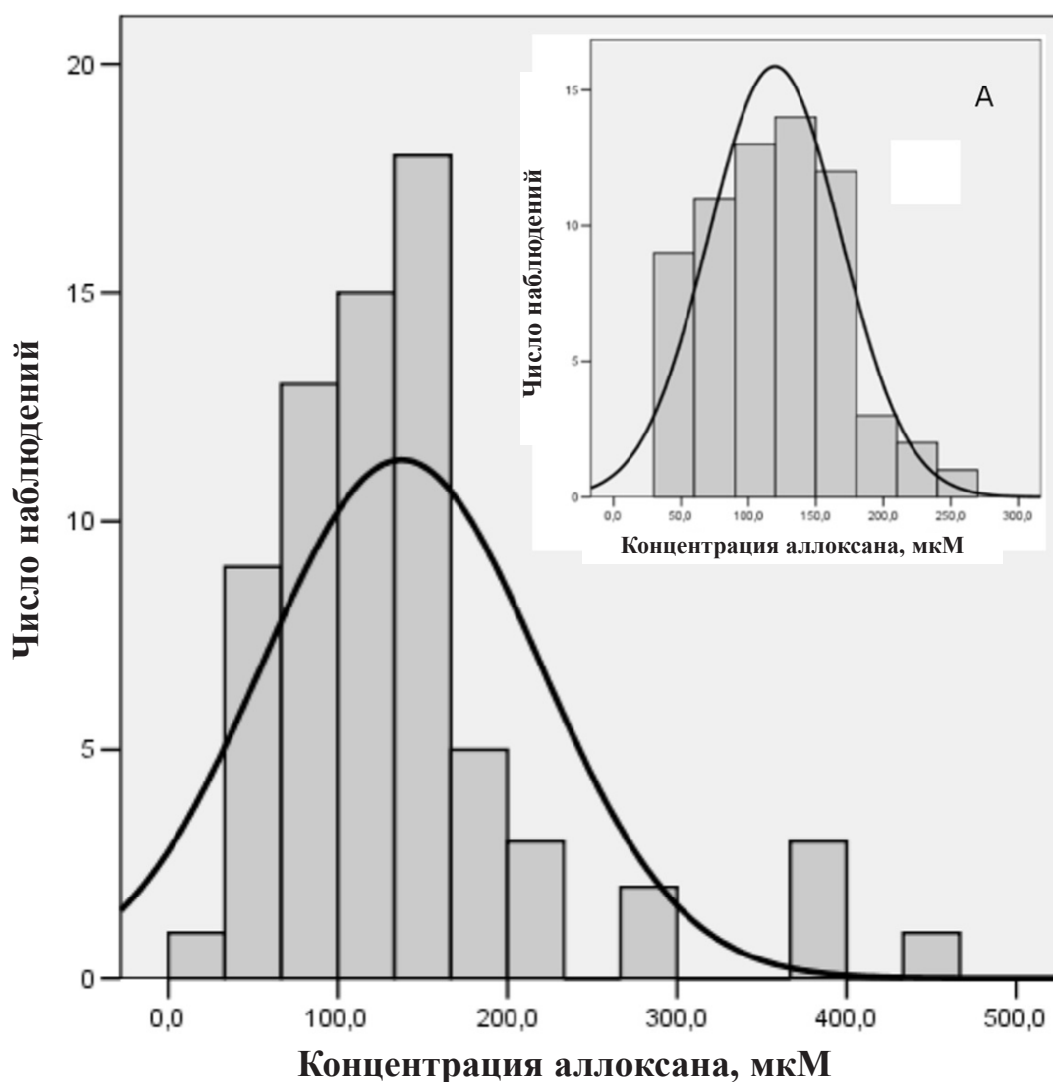


Рисунок 2.

Распределение концентраций аллоксана (в мкМ) в крови здоровых людей (75 чел).
На врезке: то же без учета группы людей с повышенным уровнем аллоксана (70 чел).

Было проведено разделение общей выборки на группы по полу и возрасту (до 30 лет, 31-40, 41-50 и более 51 лет) и продемонстрировано отсутствие значимой корреляции содержания аллоксана в крови с данными параметрами (см. таблицу).

Таблица. Описательные статистики содержания эндогенного аллоксана (мкмоль/л) в плазме крови у мужчин и женщин разных возрастных групп. n - число наблюдений; M - среднее; SD - стандартное отклонение; Me - медиана; q25 - 1-й квартиль; q75 - 3-й квартиль; CV - коэффициент вариации.

Возрастная группа	Пол	n	M (SD)	Me (q25; q75)	CV, %
До 30 лет	Мужчины	6	157,37 (66,50)	151,94 (150,36; 204,30)	42,26
	Женщины	12	141,09 (111,15)	111,62 (76,35; 148,77)	78,78
	Все	18	145,88 (98,27)	117,97 (84,60; 171,21)	67,37
31-40 лет	Мужчины	9	134,08 (66,37)	119,95 (117,28; 138,67)	49,50
	Женщины	12	130,97 (98,36)	130,85 (64,07; 140,11)	75,10
	Все	21	132,37 (83,36)	129,62 (72,69; 139,39)	62,98
41-50 лет	Мужчины	6	135,52 (34,06)	131,19 (106,78; 155,23)	25,13
	Женщины	8	116,21 (60,32)	113,17 (74,86; 140,32)	51,90
	Все	14	125,86 (47,78)	117,40 (101,42; 155,23)	37,96
От 51 года	Мужчины	12	147,63 (81,69)	136,68 (86,76; 169,90)	55,33
	Женщины	10	137,32 (95,29)	121,37 (73,79; 155,77)	69,39
	Все	22	142,72 (86,32)	136,68 (84,67; 163,65)	60,48
Мужчины		33	142,92 (65,26)	137,75 (104,15; 163,65)	45,66
Женщины		42	133,44 (93,93)	117,97 (73,79; 151,49)	70,39
Все		75	137,64 (82,06)	126,99 (84,60; 155,23)	59,62

Тем не менее, люди, попавшие в группу с повышенным содержанием аллоксана, также имеют нормальные показатели биохимического и клинического анализа крови. Анализ состава данной группы показал, что такой результат не является следствием наличия возрастной **зависимости** или систематической ошибки в серии экспериментов. Возможно, повышенный уровень аллоксана у небольшой группы людей может быть обусловлен изменением скорости отдельных стадий метаболизма аллоксана или соединений, регулирующих его содержание.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. В результате данной работы нами было установлено, что содержание аллоксана в крови здоровых людей колеблется в широких пределах и при этом его распределение является неоднородным. Вместе с тем, поскольку доля людей, у которых его содержание повышено в норме, невелика, мы считаем оправданным принятие в качестве границ нормального содержания эндогенного аллоксана величин 41 нМ и 265 нМ, что соответствует интервалу, в который попадают 95% измеренных значений ($M \pm 2\sigma$). Данные величины можно использовать в дальнейших исследованиях, касающихся возможности использования эндогенного аллоксана в качестве прогностического фактора, или его роли в патогенезе диабета.

СОДЕРЖАНИЕ АЛЛОКСАНА В КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Для понимания особенностей действия эндогенного аллоксана в организме человека и животных следует учитывать несколько моментов. В первую очередь следует отметить, что в организме животных диабет индуцируется введением больших доз аллоксана – 30-60 мг/кг веса [12], после чего его концентрация в крови достигает 3-10 мМ [10]. Такие концентрации влияют на различные свойства β -клеток (мембранный потенциал, вход кальция внутрь клеток [13], антиоксидантный статус [4]). Установлено, что величина эффекта аллоксана зависит от концентрации глюкозы в среде инкубации и что высокие концентрации глюкозы предотвращают гибель β -клеток под его действием [14].

Ясно, что цитируемые результаты, полученные в исследованиях на экспериментальных животных, нельзя непосредственно использовать для интерпретации данных, полученных для человека, в том числе и потому, что клетки поджелудочной железы человека более устойчивы к аллоксану, чем клетки животных [15]. Тем не менее, хочется обратить внимание на то, что даже самая высокая измеренная концентрация аллоксана в крови здоровых добровольцев (450 мкМ) в пересчете на объем крови и вес тела составит около 3 мг/кг, что на порядок меньше дозы, при введении которой развивается диабет у животных.

Авторы выражают свою благодарность сотрудникам Отделения лабораторной диагностики Центральной клинической больницы Гражданской авиации за помощь в подборе добровольцев и проведение клинических анализов крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dunn J.S., Sheehan H.L., Mc Lethie N.G.B. (1943) Lancet, №1, 484-487.
2. Janjic D., Maechler P., Sekine N., Bartley C., Annen A.S., Wollheim C.B. (1999) Biochem. Pharmacol., **57**, 639-649.
3. Broemme H.J., Weinandy R., Peschke D., Peschke E. (2001) Horm. Metabol. Res., **33**, 106-109.
4. Davis J.L., Shalu Mendiratta, May J.M. (1998) Biochem. Pharmacol., **55**, 1301-1307.
5. Szkudelski T. (2001) Physiol. Research, **50**, 536-546.
6. Archibald R.M. (1945) J. Biol. Chem., **158**, 347-373.
7. EP № 0 021 953 B1, 1985.
8. WHO (1999) In WHO Bulletin, 1-59.
9. Mrozkiewicz A., Kielczewska-Mrozkiewicz D., Lowicki Z., Chmara E., Korzeniowska K., Mrozkiewicz P.M. (1994) Acta Diabetologica, **31**, 236-237.
10. Patterson J.W., Lazarow A. (1949) J. Biol. Chem., **177**, 187-196.
11. Broemme H.J., Ebel H., Peschke D.E. (1999) Cell Mol. Life Sci., **55**, 487-493.
12. Frerichs H. (1971) In "Handbuch der experimentellen pharmakologie", Dorzbach H., (ed), Springer, Berlin, vol. **32**, pp. 159-202.
13. Drews G., Kramer C., Dufer M., Krippeit-Drews P. (2000) Biochem J., **323**, 389-397.
14. Rho H-W., Lee J-N, Kim H-R., Park B-H., Park J-W. (2000) Experim. Mol. Med., **32**(1), 12-17.
15. Eiziric D.L., Pipeleers D.G., Ling Z., Wesh N., Hellerstrom C., Andersson A. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **91**, 9253-9256.

Поступила: 18. 06. 2008.

MEASUREMENT OF THE ENDOGENOUS ALLOXANE IN HUMAN BLOOD

D.A. Korzhenevskiy¹, A.A. Selischeva^{1,2}, S.V. Saveliev¹

¹Institute of Biomedical Problems, Novodanilovskaya nab., 4a, Moscow, 117105 Russia;
e-mail: biomedpro@biomedpro.ru

²Department of Biology, Lomonosov Moscow State University, Vorobiovy gori, 1, Moscow, 119998 Russia

To determine the endogenous alloxane content in blood of healthy donors we stabilized it by rapid lowering of pH in the sample to 2.0. Alloxane was then allowed to form a colored product in a reaction with *o*-phenylenediamine and its content was measured by spectrophotometry using an internal calibration curve. The experiment showed that the concentration of alloxane in blood of most of the healthy donors varied from 41 to 265 $\mu\text{mol/l}$. However, a small group of healthy people was had their blood alloxane level greatly exceeding the above-mentioned values.

Key words: blood, alloxane, spectrophotometry.