

Гумінський Юрій Йосипович - д.мед.н., професор, завідувач кафедри нормальної анатомії, проректор з навчальної роботи Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова; guminsky@vsmu.vinnica.ua;
Очеретна Наталія Петрівна - асистент кафедри анатомії людини Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова; (093) 9311671.

© Ільченко О.В., Михайлова І. В., Сулім О. Г.

УДК: 577.112.386:612.11:543.544

Ільченко О.В.*, Михайлова І. В.***, Сулім О. Г.*

Вінницький Національний медичний університет імені М.І. Пирогова, *кафедра біологічної та загальної хімії; **кафедра фармацевтичної хімії (вул. Пирогова 56, м. Вінниця, Україна, 21018)

ВИЗНАЧЕННЯ ГОМОЦИСТЕЇНУ В ПЛАЗМІ КРОВІ МЕТОДОМ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ НА ОСНОВІ p-ХЛОРМЕРКУРИБЕНЗОАТ НАТРІЮ

Резюме. Розроблено спосіб кількісного визначення гомоцистеїну в плазмі крові методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Обґрунтовано новий підхід до процедури депротейнізації досліджуваного розчину шляхом осадження білків ацетонітрилом з подальшим видаленням його екстракцією в хлороформі. Для хроматографічного дослідження отриманого таким чином водного розчину гомоцистеїну було запропоновано використовувати оптично активний модифікатор пара-хлормеркурібензоат натрію (p-ХМБ), взаємодія якого з цистеїном та гомоцистеїном є кількісною та характеризується достатньою стійкістю утворених кон'югатів. Разом з суттєвим зменшенням собівартості досліджень це робить даний метод доступним для клінічного використання.

Ключові слова: гомоцистеїн, p-хлормеркурібензоат натрію, високоефективна рідинна хроматографія.

Вступ

Той факт, що підвищений вміст гомоцистеїну в крові є незалежним фактором ризику серцево-судинних та деяких інших захворювань, вже став незаперечним. Визначення концентрації гомоцистеїну також дозволяє оцінити статус фолату та вітаміну В12.

Існує кілька методів визначення цистеїну та гомоцистеїну в плазмі крові. Найбільш важливими з них є методи в основі яких лежить високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ). Проте часто використання ВЕРХ ускладнюється з деяких причин.

По-перше, досліджувані речовини присутні в організмі людини у вигляді окислених похідних - дисульфідів, білкових кон'югатів, що вимагає їхнього попереднього відновлення, причому відновлені (тіольні) форми знову швидко окислюються. Так, відповідно до деяких досліджень [Kleinman, Richie, 2000] протягом 30 хвилин втрачається близько 75% доданого до плазми крові відновленого глутатіону (GSH), що проявляється формуванням дисульфідів типу GS-SG (24%) та CS-SG (74%). Подібні зміни мають місце і для інших тіолів, що додаються до плазми крові.

По-друге, концентрація вільного гомоцистеїну в плазмі крові досить невисока і становить 1,57 мкмоль/л, що складає 10-15% від вмісту загального гомоцистеїну [Gautier et al., 1999].

По-третє, речовини типу цистеїну, гомоцистеїну слабо поглинають в середньому та ближньому ультрафіолеті, що ускладнює їх безпосереднє спектрофотометричне визначення і вимагає попередньо проводити перед- або післяколонкову дериватизацію - приєднання флуоресцентної мітки або оптично активної функціональної групи [Пентюк та ін., 2001; Zappacosta et al., 2002].

Можливе також пряме визначення гомоцистеїну в

далекому ультрафіолеті при 190 нм [Jayatilleke, Shaw, 1993]. При цьому не потрібно проводити дериватизацію та відновлення окислених форм гомоцистеїну. Але такий метод потребує дорогих надчистих реактивів та є трудомістким, а його чутливість є невисокою. Доступними для клінічного використання також є методи, засновані на використанні моноклональних антитіл проти гомоцистеїну в його імуноферментному варіанті або з застосуванням техніки поляризації флуоресценції [Brunelli et al., 2001]. Нещодавно був запропонований ензиматичний метод визначення гомоцистеїну, заснований на переносі метильної групи D-метионінметилсульфонію на гомоцистеїну (за участю гомоцистеїнметилтрансферази), з наступним вивільненням D-метионіну, його окисленні оксидазою D-амінокислот з визначенням утвореного пероксиду водню пероксидазним методом [Matsuyama et al., 2001]. Існуючі методи визначення гомоцистеїну в біологічних пробах в усякому випадку характеризуються високою собівартістю досліджень, що в 10-20 разів перевищує собівартість більшості стандартних біохімічних процедур, наприклад, визначення холестерину плазми. В значній мірі це обумовлено дороговизною відновника та флуоресцентної мітки. Вартість відновників складає: ТСЕР - 40-45 доларів США за 1 г, дитіеритріолу та дітіотреїтолу - 10-12 доларів США за 1 грам. Такий достатньо дешевий відновник, як тетрагідроборат натрію, ціною 1 долар США за 1 грам, - тверда речовина. Через її нестійкість робота з нею вимагає високої кваліфікації персоналу, що ускладнює проведення масових рутинних досліджень.

Вартість таких флуоресцентних модифікаторів як SBD-F, ABD-F, NDB, DBD-F, монобромбіману, йодацетамидофлуоресцеїну може складати від 2 до 5 тисяч

доларів США за 1 грам. Відносно дешевшими є УФ-модифікатори: ортофталевий альдегід (ОФА), наприклад, коштує 10-15 доларів США за 1 грам.

Слід зауважити також, що майже всі флуоресцентні похідні тіолів є нестійкими сполуками, що розкладаються навіть в темряві за час від декількох хвилин до декількох годин. А похідні тіолів з ціано-нітропрусидним реагентом є стійкими протягом не більше 3 хвилин. Це обмежує можливості дослідника, примушуючи його до надзвичайної ретельності в роботі.

Крім того, будь-яке хроматографічне дослідження вимагає попередньої депротейнізації досліджуваного розчину. Майже всі існуючі методи депротейнізації органічними розчинниками або розчинами неорганічних речовин призводять до розведення проб, тобто до зменшення концентрації цільової речовини, зниження чутливості методу та появи в них додаткових речовин, що здатні негативно впливати на хід визначення. Отже, вдосконалення процедури депротейнізації біологічної рідини, позбавленої цих недоліків, залишається актуальною проблемою.

Мета роботи - розробка нового доступного для клінічного застосування способу кількісного визначення гомоцистеїну в плазмі крові методом високоефективної рідинної хроматографії з використанням оптично активного модифікатора *п*-хлормеркурібензоат натрію (*п*-ХМБ).

Матеріали та методи

Осадження білків з досліджуваної рідини проводили шляхом додавання ацетонітрилу з подальшим його видаленням екстракцією в хлороформі. При цьому гомоцистеїн, цистеїн та інші гідрофільні речовини практично повністю залишаються у водній фазі. При депротейнізації плазми крові наведеним способом у розчині залишається не більше 0,1% від початкової кількості білків, що відповідає ступню очищення за допомогою чистої сульфосаліцилової кислоти [Ільченко та ін., 2001].

Водна фаза, яку одержують після депротейнізації, не містить сторонніх заважаючих речовин. Це дало можливість використовувати в якості оптично активного модифікатора речовину, що досі не використовувалася в високоефективній хроматографії, а саме *п*-хлормеркурібензоат натрію (*п*-ХМБ), вартість якого є надзвичайно низькою (5 доларів за 1 грам). При взаємодії *п*-ХМБ з тіолами утворюється оптично активна сполука, що має максимум поглинання світла в області 250 нм. Взаємодія *п*-ХМБ з цистеїном, гомоцистеїном та ін. відбувається практично миттєво і є кількісною, оскільки цю речовину застосовують для титриметричного визначення сульфгідрильних груп [Кочетов, 1980]. Неабиякою перевагою *п*-ХМБ є те, що його кон'югати з цистеїном і гомоцистеїном стійкі як мінімум протягом двох діб.

Також, при розробці нового метода визначення гомоцистеїну з метою його здешевлення в якості відновника було застосовано трибутилфосфін (ТБФ), вартість якого майже на 2 порядки нижча за таку для інших відновників (лише 0,15-0,18 долару США за 1 грам).

Таблиця 1. Оцінка відтворюваності результатів визначення концентрації гомоцистеїну в водних розчинах.

№ проби	Концентр., мкг/мл	Час, хв	Площа, од	Статистичні параметри
1	10	5,57	937	N=5 p=0,95
2	10	6,02	883	
3	10	6,12	893	$\bar{S}=920,2$
4	10	6,05	902	$\sigma_{n-1}=40,39$
5	10	6,01	896	$\sigma_n=36,13$
6	3	6,23	284	N=5 p=0,95
7	3	6,58	268	
8	3	6,61	270	$\bar{S}=279,4$
9	3	6,60	298	$\sigma_{n-1}=12,16$
10	3	6,62	277	$\sigma_n=10,87$
11	1	6,64	95	N=5 p=0,95
12	1	6,66	87	
13	1	6,65	89	$\bar{S}=91,0$
14	1	6,68	92	$\sigma_{n-1}=3,08$
15	1	6,72	92	$\sigma_n=2,76$

Плазму крові одержували додаванням 5 мл крові до пробірки, що містила 10 мг сухого фториду натрію та 10 мг ЕДТА. Після ретельного перемішування проводили центрифугування проби протягом 10 хв при 1000 об/хв.

Розчин *п*-ХМБ (концентрацією 3 мг/мл) готували додаванням до його наважки невеликого об'єму дистильованої води та 2-3 крапель 1 М розчину гідроксиду натрію. Після перемішування та розчинення наважки об'єм розчину доводили водою. Розчин не є стійким і має бути приготованим в день роботи.

До 0,5 мл плазми додавали 0,05 мл 10% ТБФ в диметилформаміді. Після ретельного перемішування суміш витримували протягом 1 години при кімнатній температурі для завершення процесу відновлення. Потім до проби додавали 1,5 мл ацетонітрилу. Вміст пробірки перемішували протягом 1 хвилини та центрифугували при 1000 об/хв протягом 5 хвилин. Надосадову рідину зливали, до неї додавали 3 мл хлороформу, суміш струшували протягом 5 хвилин та центрифугували при 3000 об/хв протягом 15 хвилин.

Відбирали 0,2 мл водної фази, до якої додавали 1 мл 0,5 М ацетатного буфера (pH=4,6) і 0,1 мл водного розчину *п*-ХМБ з концентрацією 3 мг/мл. Суміш ретельно перемішували та залишали на термін від 1 години до 2 діб. В ході реакції в розчині утворюється певна кількість осаду, тому рідину можна вводити до колонки лише після очищення центрифугуванням при 6000 об/хв протягом 30-60 хвилин. Об'єм проби, що вводився до колонки, складає 20 мкл. Визначення проводили на колонці 2,1x15 cm Zorbax Eclipse XDB C8. Швидкість елювання - 0,2 мл/хв. Елюент: 0,03-0,05 М ацетатний буфер (pH 4,6) - ацетонітрил (95:5). Температура колонки складала 20 С. Регенерування колонки проводили ацетонітрилом.

Результати. Обговорення

Згідно наведеної методики приготування проби для хроматографічного дослідження пік цистеїну дуже добре відокремлюється (рис. 1). Час виходу цистеїну складає 3,687 хв, час виходу гомоцистеїну - 4,735 хв.

Аналогічна хроматограма при дещо змінених умовах елюювання наведена на рис. 2.

Точний розрахунок концентрації гомоцистеїну проводили методом абсолютного стандарту - за площею піку гомоцистеїну стандартного розчину, обробленого паралельно сироватці крові. Для цього застосовували L-цистеїна гідрохлорид "ч" (REANAL) (М.М. 175.64), D,L-гомоцистеїн (SIGMA) (М.М. 135.2), глутатіон відновлений, HPLC-grade (REANAL) (М.М. 307.33) у концентраціях 20-30 мкмоль/л.

Виявилося, що запропонованим методом можна визначати гомоцистеїн не тільки у плазмі, а навіть у гомогенатах тканин (рис. 3).

При метрологічному дослідженні методу оброблено 15 проб, що містили від 1 до 10 мкг/мл гомоцистеїну (табл. 1).

Наведені в таблиці дані доводять, що площа піка гомоцистеїну пропорційна його концентрації в пробі, а внутрішньосерійна похибка має прийнятну величину.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Використання нової процедури депротейнізації біологічної рідини дало можливість застосовувати для кількісного визначення гомоцистеїну оптично активний модифікатор п-ХМБ, що дозволяє значно зменшити собівартість визначення гомоцистеїну методом ВЕРХ.

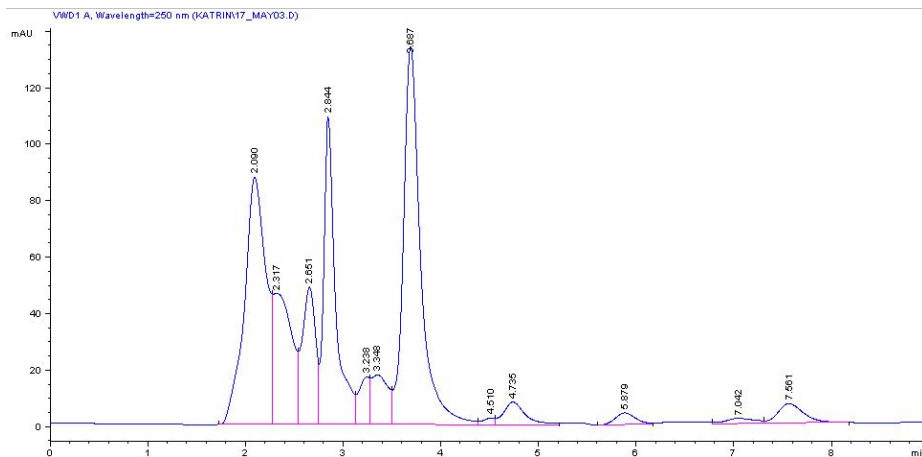


Рис. 1. Хроматограма гомоцистеїну в плазмі крові на колонці 2, 1x15 cm Zorbax Eclipse XDB C8. Елюент: 0,05 М ацетатний буфер (рН 4,6) - ацетонітрил (95:5). Час виходу сполуки гомоцистеїну з п-ХМБ 4,735 хв. Пік з часом виходу 3,687 хв відповідає цистеїну.

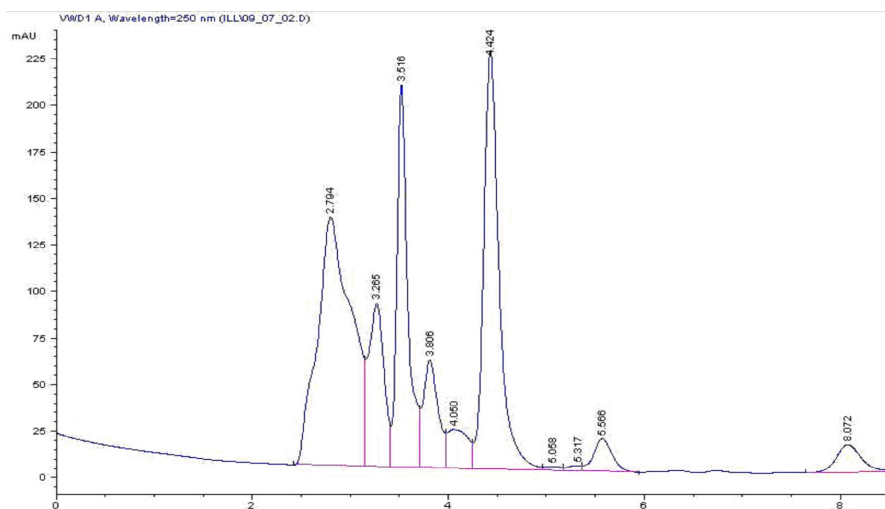


Рис. 2. Хроматограма гомоцистеїну в плазмі крові на колонці 2, 1x15 cm Zorbax Eclipse XDB C8. Елюент: 0,04 М ацетатний буфер (рН 4,6) - ацетонітрил (95:4,5). Час виходу сполуки гомоцистеїну з п-ХМБ 5,566 хв. Пік з часом виходу 4,424 хв відповідає цистеїну.

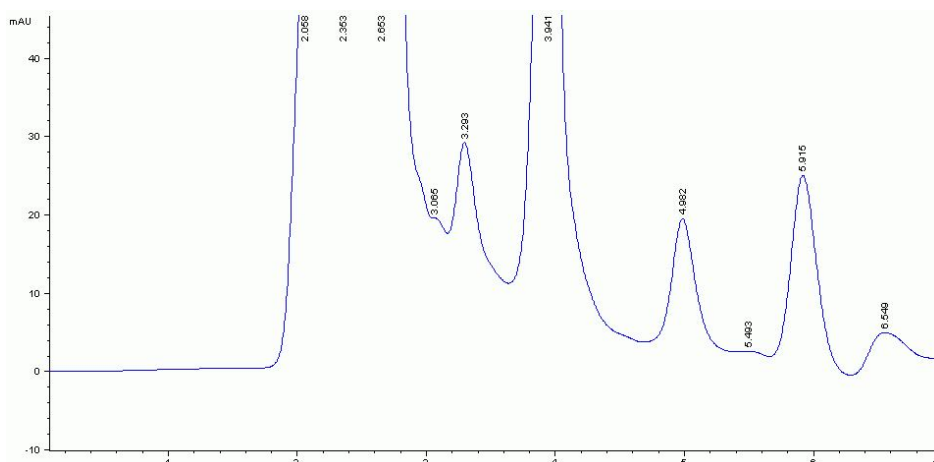


Рис. 3. Хроматограма гомоцистеїну в гомогенаті печінки щура. Колонка 2, 1x15 cm Zorbax Eclipse XDB C8. Елюент: 0,04 М ацетатний буфер (рН 4,4) - ацетонітрил (95:4). Час виходу сполуки гомоцистеїну з п-ХМБ 4,982 хв. Пік з часом виходу 3,941 хв відповідає цистеїну.

Можливості розробленого методу також не обмежуються вимогами до лабораторного обладнання: достатньо мати найпростіший хроматограф з ізократичним режимом елювання та спектрофотометричним детек-

тором. Це робить запропонований спосіб визначення гомоцистеїну доступним для переважної більшості аналітичних лабораторій та привабливим для скрінінгових досліджень.

Список літератури

- Визначення концентрації гомоцистеїну в біологічних рідинах методом високо-ефективної рідинної хроматографії / [Пентюк О.О., Ільченко О.В., Шевчук С.В. та ін.] // Мед. хімія. - 2001. - Т. 3, № 3. - С. 61-68.
- Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. - 2-е изд., М.: Высш. школа, 1980. - 272 с.
- Спосіб депротейнізації розчинів / [Ільченко О.В., Гунько І.П., Заїчко Н.В. та ін.]. - Патент України № 41118А, МКВ7 G01N1/38. - Бюлетень. - 2001. - № 9.
- Comparing different methods for homocysteine determination / Jayatilleke E. A high-performance liquid chromatographic assay for reduced and oxidized glutathione in biological samples / E. Jayatilleke, S. Shaw // Anal.Biochem. - 1993. - Vol. 214, № 2. - P.452-457.
- [Zappacosta B., Persichilli S., Scribano D. et al.] // Clin. Chem. Lab. Med. - 2002. - Vol. 40, № 11. - P. 1139-42.
- Comparison of three methods for total homocysteine plasma determination / [Brunelli T., Pepe G., Marcucci R. et al.] // Clin Lab. - 2001. - Vol. 47, № 7-8. - P. 393-7
- Gautier F.C. Determination of homocysteine in plasma by liquid chromatography with fluorescence detection / Gautier F.C., Berneron C., Douce P.J. // Biomed.Chromatogr. - 1999. - Vol. 13, № 3. - P. 239-243.
- Kleinman W.A. Status of glutathione and other thiols and disulfides in human plasma / W.A. Kleinman, J.P.J. Richie // Biochem. Pharmacol. - 2000. - Vol. 60, № 1. - P. 19-29.
- New enzymatic colorimetric assay for total homocysteine / [Matsuyama N., Yamaguchi M., Toyosato M. et al.] // Clin. Chem. - 2001. - Vol. 47(12): P. 2155-7.

Ильченко А.В., Михайлова И.В., Сулим О.Г.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ГОМОЦИСТЕИНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ НА ОСНОВЕ *p*-ХЛОРМЕРКУРИБЕНЗОАТ НАТРИЯ

Резюме. Разработан способ количественного определения гомоцистеина в плазме крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Обоснован новый подход к процедуре депротейнизации исследуемого раствора путем осаждения белков ацетонитрилом с последующим выделением его экстракцией в хлороформе. Для хроматографического исследования полученного таким образом водного раствора гомоцистеина было предложено использовать оптически активный модификатор *p*-хлормеркурибензоат натрия (*p*-ХМБ), взаимодействие которого с цистеином и гомоцистеином является количественным и характеризуется достаточной устойчивостью образующихся конъюгатов. Вместе с существенным уменьшением себестоимости исследований это делает предложенный метод доступным для клинического использования.

Ключевые слова: гомоцистеин, *p*-хлормеркурибензоат натрия, высокоэффективная жидкостная хроматография.

Ilichenko A. V., Mykhaylova I. V., Sulim O. G.

DETERMINATION OF HOMOCYSTEINE IN BLOOD PLASMA BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD USING SODIUM *p*-CHLOROMERCURIBENZOATE

Summary. A quantitative method has been developed for determination of homocysteine in blood plasma by high-performance liquid chromatography (HPLC). A new approach has been developed for the deproteinization of solutions by means of protein precipitation using acetonitrile with its subsequent extraction in chloroform. It has been proposed to use an optically active modifier, sodium *p*-chloromercuribenzoate (*p*-CMB), for chromatographic study of the obtained water solution of homocysteine, the interaction of *p*-CMB with cysteine and homocysteine being quantitative and resulting in sufficiently stable conjugates formation. Together with the substantial reduction in the cost of the corresponding analysis, it makes the proposed method well suited for clinical applications.

Key words: homocysteine, sodium *p*-chloromercuribenzoate, high-performance liquid chromatography.

Стаття надійшла до редакції 11.03.2013 р.

Ильченко Александр Володимирович - к.х.н., доцент кафедри біологічної та загальної хімії Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова; (0432) 570271;

Михайлова Інна Василівна - к.х.н., доцент кафедри фармацевтичної хімії Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова; (0432) 358259;

Сулім Ольга Григорівна - к.б.н., старший викладач кафедри біологічної та загальної хімії Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова; (0432) 570271.

© Ковальчук В.В.

УДК: 616.12-073.7:612.13-053.7(488.44)

Ковальчук В.В.

Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова (вул. Пирогова 56, м. Вінниця, Україна, 21018)

ПОКАЗНИКИ КАРДІОІНТЕРВАЛОГРАФІЇ В ЗДОРОВИХ ЮНАКІВ ПОДІЛЛЯ З ГІПО- ТА ЕУКІНЕТИЧНИМ ТИПАМИ ГЕМОДИНАМІКИ

Резюме. У 126 практично здорових юнаків (64 особи з еукінетичним типом гемодинаміки та 62 особи - з гіпокінетичним типом), мських мешканців Поділля, визначені кардіоінтервалографічні показники та їх процентильний розмах. Встановлені