

А.Я. Яшин, Я.И. Яшин, В.Н. Титов, Т.А. Михайлова

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ КОМПЛЕКС ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОМАРКЕРОВ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА

Аннотация

Показаны возможности хроматографического комплекса с амперометрическим детектором в определении маркеров заболеваний (гомоцистеина, катехоламинов, их предшественников и метаболитов, измененных нуклеозидов) в биологических жидкостях (сыворотка крови, моча).

Большинство заболеваний, в том числе опасных для жизни, можно вылечить в случае их ранней диагностики. В связи с этим интенсивно развивается ранняя диагностика заболеваний, которая предусматривает определение в биологических жидкостях диагностически важных маркеров [1] – низкомолекулярных соединений: катехоламинов, углеводов, индолов, органических кислот, витаминов, нуклеозидов. Маркерами в диагностике могут быть и большие молекулы: пептиды, порфирины, белки. В последнее время развивается новое направление – метаболомика, т. е. определение отклонения от физиологического уровня одновременно многих метаболитов. При заболеваниях и нарушениях физиологических процессов метаболизма в биологических средах и появляются соединения – маркеры, которые сигнализируют о начале заболевания.

Хроматографические методы в анализе маркеров имеют преимущества перед другими аналитическими способами: а) большая информативность (определение не одного маркера, а часто всего профиля маркеров); б) низкие пределы обнаружения, автоматизации всего анализа с выдачей полного протокола; в) сохранение данных анализа в архиве ПЭВМ; г) универсальность (один и тот же хроматограф можно применять для решения разных задач); д) использование в основном биологических проб, получаемых посредством неинвазивных процедур (моча, слюна, выдыхаемый воздух, конденсат выдыхаемого воздуха, пот, волосы).

Современные хроматографические приборы позволяют определять многие биохимические маркеры в биологических жидкостях человека на уровне 10^{-15} ... 10^{-9} г в зависимости от применяемых детекторов и методов концентрирования [2].

Экспериментальная часть

Определение биомаркеров проводилось на хроматографическом комплексе на основе жидкостного хроматографа «ЦветЯуза» с амперометрическим детектором (рис. 1). В комплексе использованы как изократический, так и градиентный насосы, кран-дозатор фирмы «Rheodyne», обращено-фазовые колонки C18 фирм «Феноменекс», «Кромасил» и др.



Рис. 1. Жидкостный хроматограф «ЦветЯуза» с амперометрическим детектором

Определение гомоцистеина в плазме для диагностики сердечно-сосудистых заболеваний

В настоящее время гомоцистеин признают независимым фактором риска тромбоза и сердечно-сосудистых заболеваний; установлена прямая зависимость между повышенным содержанием гомоцистеина в плазме крови, формированием коронарной болезни сердца и инфаркта миокарда [3]-[8]. Выказано предположение, что при повышенном содержании гомоцистеина *in vivo* формируются условия и для развития онкологических заболеваний [9]. Содержание гомоцистеина в плазме крови здоровых добровольцев составляет около 9,6 мкмоль/л, с возрастом содержание его возрастает. При повышении содержания гомоцистеина до 15 мкмоль/л опасность развития острого коронарного синдрома является прогностически более реальной, чем при повышении содержания в плазме крови холестерина. При содержании холестерина более 50 мкмоль/л в большом проценте случаев развивается инфаркт миокарда. В связи с этим возникает необходимость в достоверном, быстро выполняемом и сравнительно недорогом методе определения концентрации гомоцистеина. Чаще всего для этого применяют высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ); имеется множество публикаций по применению данного метода.

Для этих целей наиболее интересен амперометрический детектор (АД), который при высокой чувствительности и селективности позволяет анализировать гомоцистеин напрямую, без дериватизации, в отличие от УФ-детектора [3]. Большая часть гомоцистеина в крови находится в связанном с белками состоянии. Для выделения связанного гомоцистеина используют восстановители – реагенты.

Нами разработана методика определения гомоцистеина в плазме методом ВЭЖХ с АД, апробированная на большом клиническом материале (более 100 случаев). Для приготовления калибровочных растворов использовался чистый гомоцистеин фирмы «Сигма». Для оценки правильности определений гомоцистеина в плазме крови были использованы контрольные лиофилизированные сыворотки крови и «Ликвичек гомоцистеин» фирмы «Bio-Rad» со следующими уровнями концентраций гомоцистеина: низкий уровень – 10 мкмоль/л (7,5...12,5 мкмоль/л) и высокий уровень – 45 мкмоль/л (36...54 мкмоль/л). На *рис. 2* приведена типичная хроматограмма определения гомоцистеина в плазме крови.

Определение измененных нуклеозидов в моче как маркеров онкологических заболеваний

Повышенное выделение измененных нуклеозидов с мочой является неспецифичным тестом онкологических заболеваний [10]. В моче человека мо-

жет быть около 20 нуклеозидов из разных типов tРНК, около 10 из них присутствуют в определяемых количествах. Прежде всего это псевдоуридин (Pseu), дигидроуридин (Dhu), 1-метилюридин (m1U), N2 – метилгуанозин (m2G) и 1-метилгуанозин (m1G). Повышенные в несколько раз концентрации этих и других нуклеозидов служат маркерами онкологической патологии. Для определения концентрации измененных нуклеозидов в моче наиболее часто используется метод ВЭЖХ, который позволяет разделять и определять до 16 измененных индивидуальных нуклеозидов [11].

Работы по определению нуклеозидов в биологических жидкостях проводились и проводятся практически во всех высокоразвитых странах. Наиболее часто уровень измененных нуклеозидов определяли у больных раком молочной железы [12]. У женщин, больных раком молочной железы, наблюдается статистически значимое повышение концентрации измененных нуклеозидов. Более того, при продолжительных исследованиях уровень измененных нуклеозидов отражает течение заболевания и эффективность применяемой терапии. Для обработки хроматографических данных измененных нуклеозидов применяют разные хемометрические методы: метод искусственных нейронных сетей, метод главного компонента, факторный анализ и др. Чувствительность метода ВЭЖХ с разными способами обработки проб и данных колеблется в пределах 58,8...70,6 %, а специфичность метода со-

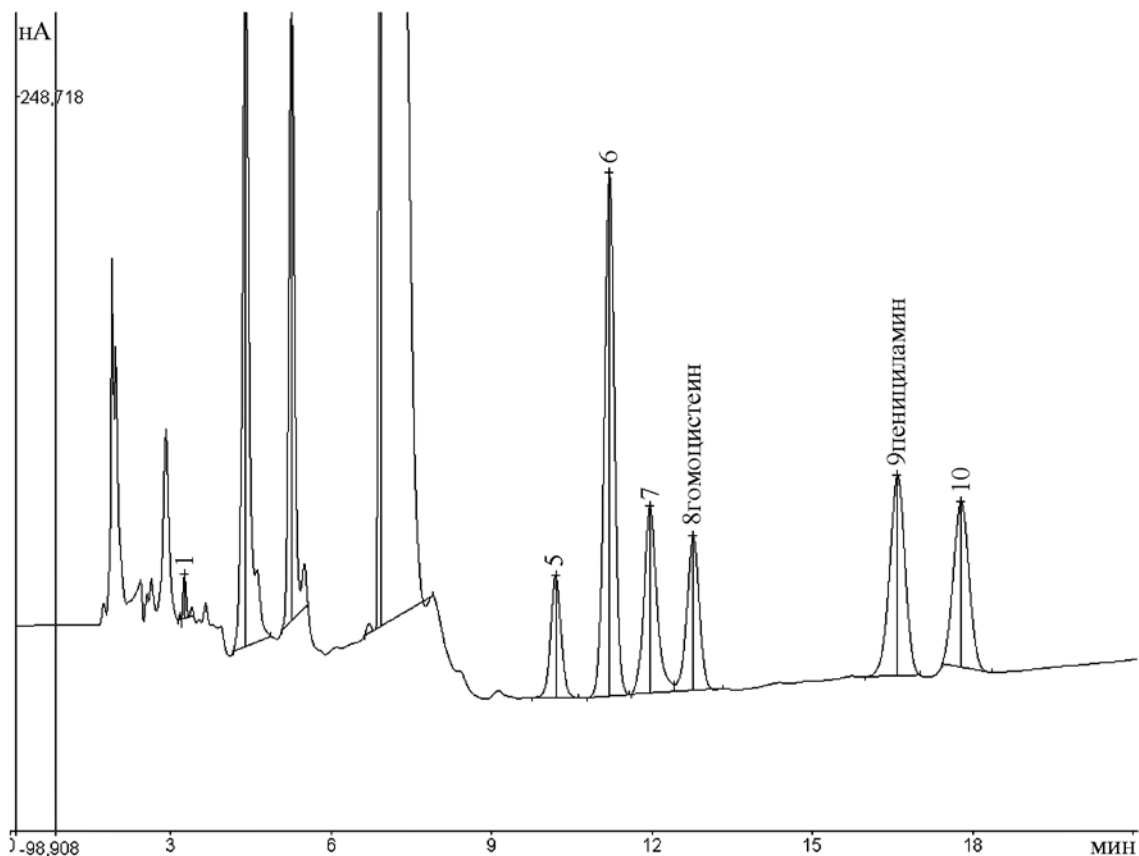


Рис. 2. Типичная хроматограмма определения гомоцистеина в плазме крови

ставляет 88,4...94,2 %. Эти чувствительность и специфичность значительно выше, чем при использовании иммуно-ферментативного анализа. На *рис. 3* приведена хроматограмма измененных нуклеозидов у больных раком молочной железы на 3-й стадии заболевания. Для более достоверного определения заболевания лучше использовать комбинацию УФ- и амперометрического детекторов.

Определение катехоламинов в биологических жидкостях человека для диагностики заболеваний

Амперометрическое детектирование считают оптимальным для определения катехоламинов в биологических жидкостях [13], благодаря его высокой чувствительности и селективности. Катехоламины (адреналин, норадреналин, дофамин) являются гормонами, которые реализуют биологическую функцию адаптации, краткосрочной адаптации и регулируют многие процессы метаболизма, включая биологическую реакцию гидродинамического артериального давления, а также передачу нервного сигнала в синапсах симпатической нервной системы. В первом случае катехоламины могут рассматриваться как гормоны, во втором случае – как нейромедиаторы. Клинический интерес к уровню катехоламинов в биологических жидкостях связан с проблемой физиологии адаптивных сигналов стресса (точность оценки заболевания и прогноз).

Типичная реакция на стресс – активация синтеза катехоламинов. Под влиянием стресса катехоламины выделяются в кровь; их роль заключается в мобилизации организма на осуществление активной реакции адаптации. Степень мобилизации организма обусловлена не только внешней, но и внутренней угрозой организму, связанной с различными болезнями. Определение катехоламинов является тестом дифференциальной диагностики симптоматических форм артериальной гипертонии, особенно при наличии феохромоцитомы или нейробластомы. Важную роль катехоламины играют в поддержании биологической функции гомеостаза (постоянства состава внутренней среды и устойчивости основных физиологических параметров и функций). На *рис. 4* приведены хроматограммы стандартов, а на *рис. 5* – хроматограммы мочи пациентов. На жидкостном хроматографе с амперометрическим детектором (предшественник «Цвет Яузы-01») в Нижегородском диагностическом центре Т.А. Басалгиной выполнено более 10000 анализов катехоламинов для диагностики феохромоцитомы. Кроме того, комплекс позволяет определять ДОРА для диагностики болезней Паркинсона, гомованилиновую и ванилилминдальную кислоту для диагностики нейробластомы у детей, серотонин у пациентов с онкологической патологией, индольные соединения для диагностики меланомы, иодид, эстрадиол, мочевую кислоту, маркеры окислительного

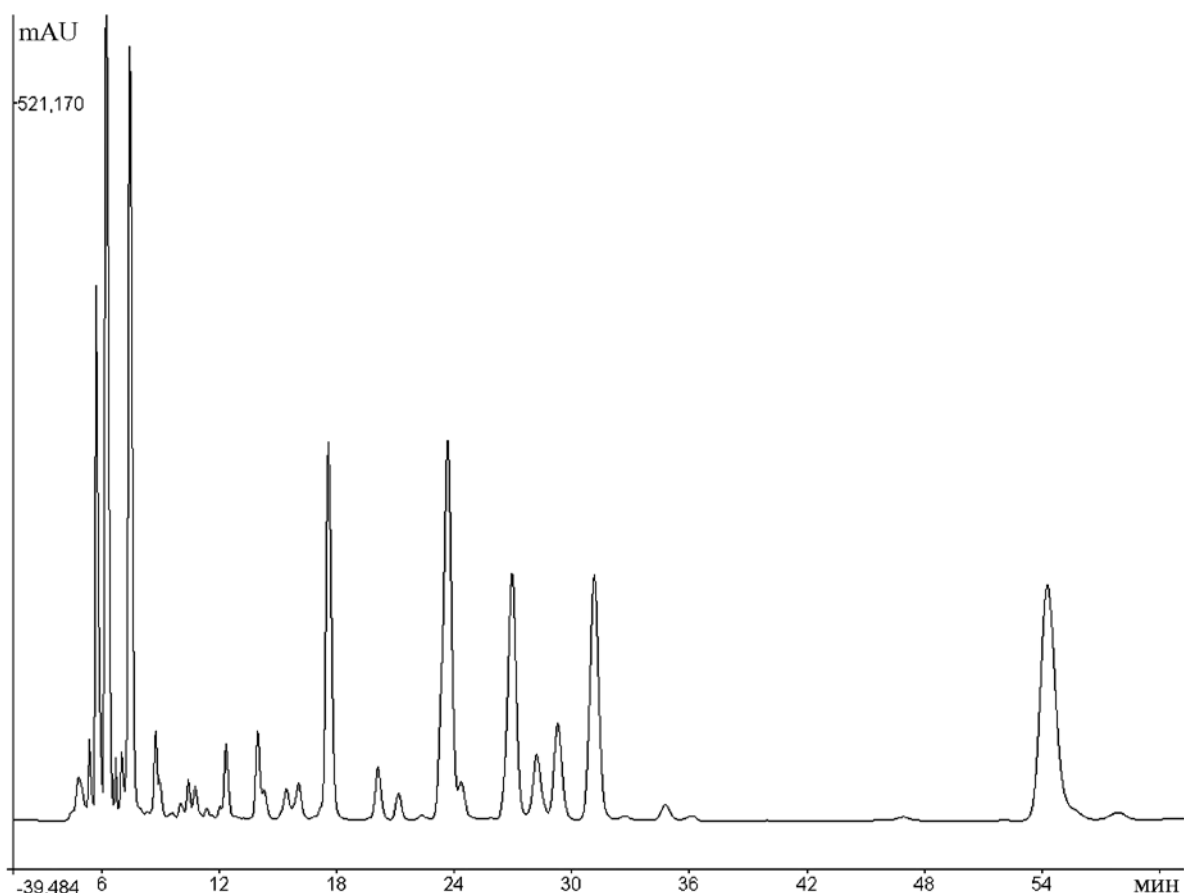


Рис. 3. Хроматограмма мочи больной раком молочной железы 3-й стадии

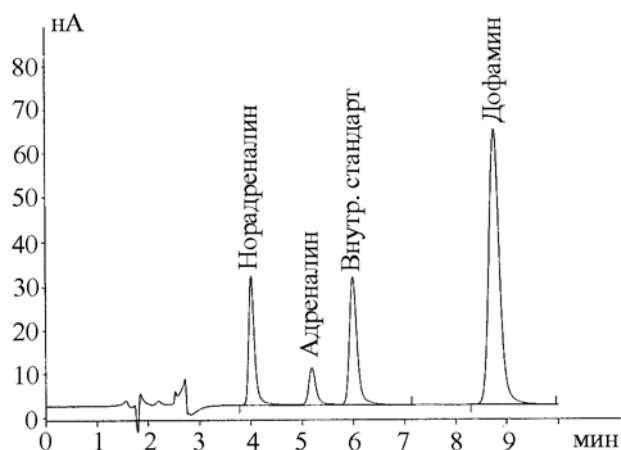


Рис. 4. Хроматограмма стандартной смеси катехоламинов

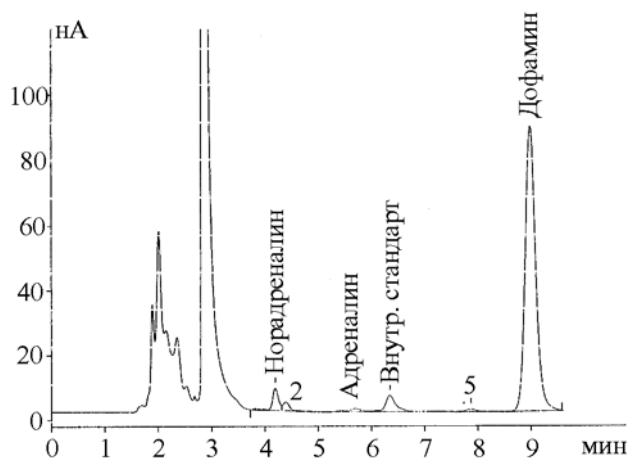


Рис. 5. Хроматограмма катехоламинов мочи больного

стресса и многие другие биологически активные соединения.

Заключение

Хроматографический комплекс с амперометрическим детектором с успехом используют для диагностики широко распространенных социально значимых заболеваний (сердечно-сосудистых и онкологических).

Список литературы:

1. Naylor S. Biomarkers: Current perspectives and future prospects // *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 2003. Vol. 3. PP. 525-529.
2. Яшин Я.И., Яшин А.Я. Определение маркеров в биологических жидкостях и выдыхаемом воздухе человека хроматографическими методами для ранней диагностики заболеваний. В книге: *Химический анализ в медицинской диагностике / Под ред. Г.К. Будникова. Серия «Проблемы аналитической химии».* Т. 11. – М.: Наука, 2010. С. 369-403.
3. Малинка М.К., Полуэктова М.В., Яшин А.Я. Определение гомоцистеина в плазме методом ВЭЖХ с амперометрическим детектором // *Сорбционные и хроматографические процессы.* 2007. Т. 7. Вып. 1. С. 60-65.
4. Vizzardi E. et al. Homocysteine and heart failure: An overview // *Recent Pat. Cardiovasc. Drug Discov.* 2009. Vol. 4. PP. 15-21.
5. Shai M., Stampfer J., Ma J.E. et al. Homocysteine as a risk factor for coronary heart diseases and its association with inflammatory biomarkers, lipids and dietary factors // *Atherosclerosis.* 2004. Vol. 177. PP. 375-381.
6. Mainow M.R. Plasma concentration of total homocysteine predict mortality risk // *An. J. Clin. Nutr.* 2001. Vol. 74. P. 3.
7. Moat S.J. Plasma total homocysteine: Instigator or indicator of cardiovascular disease? // *Ann. Clin. Biochem.* 2008. Vol. 45. PP. 345-348.
8. Potter K. Homocysteine and cardiovascular disease: Should we treat? // *Clin. Biochem. Rev.* 2008. Vol. 29. PP. 27-30.
9. Мирошниченко И.И., Птицына С.Н., Кузнецова Н.Н., Калмыков Ю.М. Гомоцистеин – предиктор патологических изменений в организме человека // *Русский медицинский журнал.* 2009. Т. 19. № 4. С. 224-227.
10. Xu G., DiStefano C., Liebich H.M., Zhang Y., Lu P. RP HPLC investigation of urinary normal and modified nucleosides of cancer patients // *J. Chromat. B.* 1999. Vol. 732. PP. 307-313.
11. Xu G., Liebich H.M. Normal and modified nucleosides in urine as potential tumor markers determined by MeKC and HPLC // *Clin. Lab.* 2001. № 3. PP. 22-32.
12. Sasco A.J., Rey F., Reynaud C. et al. Breast cancer prognostic significance of some modified urinary nucleosides // *Cancer Lett.* 1996. № 2. Vol. 108. PP. 157-162.
13. Głód B.K., Stańczak K.I., Woźniak A., Pakszys W. Determination of a catecholamines and the total antioxidant potential of blood plasma by use of an improved RPHPLC-ED assay // *Acta Chromatographica.* 2004. Vol. 14. PP. 142-148.

Александр Яковлевич Яшин,
канд. хим. наук,

начальник отдела жидкостной хроматографии,

Яков Иванович Яшин,

д-р хим. наук, профессор, директор,

научно-технический центр «Хроматография»,

НПО «Химавтоматика»,

Владимир Николаевич Титов,

д-р мед. наук, профессор,

руководитель лаборатории клинической биохимии,

ФГБУ «Российский кардиологический

научно-производственный комплекс»,

Татьяна Алексеевна Михайлова,

ст. научный сотрудник,

ГБОУ ВПО РНИМУ Минздравсоцразвития

России «НКЦ геронтологии»,

г. Москва,

e-mail: yashinchrom@mail.ru