

ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ МАРКЕРОВ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

А.Яшин, Я.Яшин yashinchrom@mail.ru
НПО "Химавтоматика", НТЦ "Хроматография"

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС – предшественник многих опасных заболеваний. Его ранняя диагностика – основа новой профилактической медицины. Предлагаем краткий обзор методов диагностики окислительного стресса. В их основе – определение маркеров методами высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Использование в них амперометрических детекторов высокой чувствительности и селективности помогает определять многие маркеры в сложных матрицах без концентрирования и дериватизации.

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС

В современном научном обществе вопросам диагностики окислительного стресса уделяют пристальное внимание. В биологических жидкостях человека действие неблагоприятных факторов – облучение, плохая экологическая обстановка, стрессы – вызывает рост концентрации высокореакционных кислородных и азотных соединений, в том числе свободных радикалов (супероксидный радикал кислорода, гидроксид-радикал, пероксинитрит и прочие).

Организм человека имеет трехуровневую естественную антиоксидантную систему защиты от свободных радикалов. В определенных количествах свободные радикалы необходимы организму: для участия в различных биохимических процессах, поддержания иммунного статуса человека. Однако избыточное содержание свободных радикалов неизбежно приводит к патологическим изменениям в человеческом организме. Такое состояние называется окислительным стрессом.

Подавляющее большинство известных теорий старения основано на теории развития окислительного стресса. Многочисленные научные публикации подтверждают, что окислительный стресс ведет к развитию таких самых опасных и социально

значимых заболеваний, как сердечно-сосудистые, онкологические, сахарный диабет, нарушения мозгового кровообращения, воспалительные, ревматоидные, нейродегенеративные (болезни Паркинсона, Альцгеймера) и некоторых других [1-6].

Поэтому чрезвычайно важно диагностировать начало развития окислительного стресса, когда он не привел к серьезным изменениям в организме. Существуют экспресс-методы, в частности, амперометрический метод [7], которые диагностируют присутствие окислительного стресса. В их основе лежит определение антиоксидантного статуса, т.е. измерение суммарного содержания антиоксидантов в организме человека.

Существуют более достоверные методы диагностирования окислительного стресса. Некоторые из них основаны на обнаружении на уровне 10⁻¹²-10⁻⁹ г/см³ специальных маркеров, появление которых в биологических жидкостях свидетельствует об идущем в организме окислительном процессе. Другие – на поиске эндогенных антиоксидантов. К их числу относятся глутатион (GSH), цистеин, мочевиная кислота и убихинол – молекулы, соединения которых могут существовать в восстановленной форме (в этом случае они являются антиоксидантами) или в окисленной форме.

МАРКЕРЫ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

Когда содержание реакционных кислородных соединений и свободных радикалов в биологических жидкостях и клетках избыточно, антиоксидантная система человека не может их нейтрализовать. И тогда они начинают процесс окисления жизненно важных молекул ДНК, белков, липидов и углеводов. В результате окисления этих молекул появляются соединения – маркеры этого окисления.

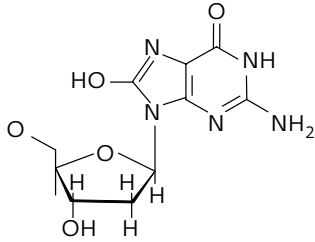
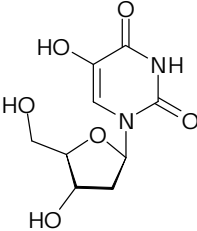
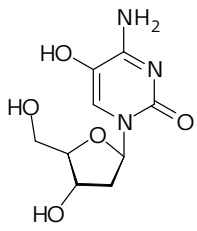
В настоящее время для определения маркеров окислительного стресса используют преимущественно хроматографические методы. Иногда для определения некоторых маркеров применяют иммуноферментативный способ (система ELISA). Такой анализ часто оказывается дороже хроматографических анализов. Обычно в системе ELISA один тестируемый образец биологической жидкости предназначен для определения только одного определенного маркера. На хроматографических приборах при одном взятии тестируемого образца можно определить несколько маркеров, в частности, все маркеры производных тирозинов, весь профиль измененных нуклеозидов. Одновременно с ними можно определять все эндогенные антиоксиданты: цистеин, глутатион (GSH), убихинол, мочевую кислоту и др.

МАРКЕРЫ ОКИСЛЕНИЯ ДНК И РНК. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Многие изменения молекул ДНК и РНК, индуцированные окислительным стрессом, ведут к повреждениям, иногда мутагенного характера. Это приводит к онкологическим заболеваниям и преждевременному старению. В настоящее время организован Европейский комитет, в рамках которого ведутся работы по стандартизации нарушений ДНК, в частности, уровень 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина в клеточных ДНК нормируется на уровне 0,5-5 повреждений на 106 гуанозино-вых оснований [8].

Измененные нуклеозиды определяют несколькими методами: методом газовой хроматографии-масс-спектрометрией (ГХ-МС), методом ВЭЖХ-МС-МС, методом ВЭЖХ с амперометрическим детектором, а также иммунным методом и электрофорезом [9]. Нуклеозид – это соединение одного из оснований нуклеиновой кислоты с пентозой. В зависимости от типа сахара эти соединения называют либо рибонуклеозидами, либо дезоксирибонуклеозидами. Наиболее важные нуклеозиды образуются на основе аденозина, гуанозина, цитидина и урицила. Нормальные нуклеозиды реутилизируются в организме, однако измененные нуклеозиды не могут встраиваться при новом синтезе РНК и ДНК. Они переходят в мочу вместе с небольшим количеством нормальных нуклеозидов. Поэтому количество измененных нуклеозидов в моче служит критерием изменений молекул ДНК и РНК. При воздействии свободных радикалов на эти молекулы в случае окислительного стресса в моче появляются окисленные формы нуклеозидов и их предшественников. В табл.1 приведены наиболее информативные измененные нуклео-

Таблица 1. Маркеры окисления молекул ДНК

Маркер	Структурные формулы	Метод определения
8-гидрокси-2'-дезоксигуанозин		ВЭЖХ с АД
5-гидрокси-2'-деоксицитидин		ВЭЖХ с АД и УФ
5-гидрокси-2'-деоксиуридин		ВЭЖХ с АД и УФ

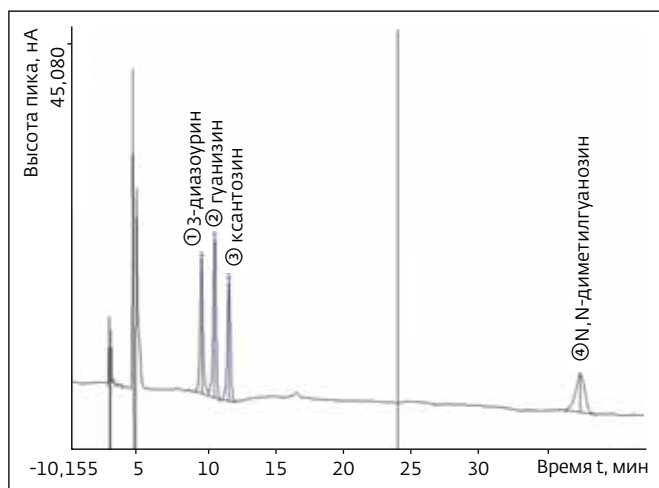


Рис.1. Хроматограмма измененных нуклеозидов, полученная на жидкостном хроматографе "ЦветЯуза" с амперометрическим детектором на колонке C_{18} 150×4,6 мм. Здесь и далее в цифры в кружках – номера пиков.

зиды, самый важный из которых – 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозин.

Окисление молекул ДНК и РНК чаще всего приводит к онкологическим болезням и преждевременному старению. В настоящее время опубликовано много работ, посвященных определению 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина в моче и сыворотке как больных, так и здоровых людей [10-14]. Измененные нуклеозиды выделяют из мочи на специальные картриджи или определяют непосредственно в моче с помощью соответствующей подготовки и центрифугирования. На картридже Affi-Cel можно выделить измененные нуклеозиды

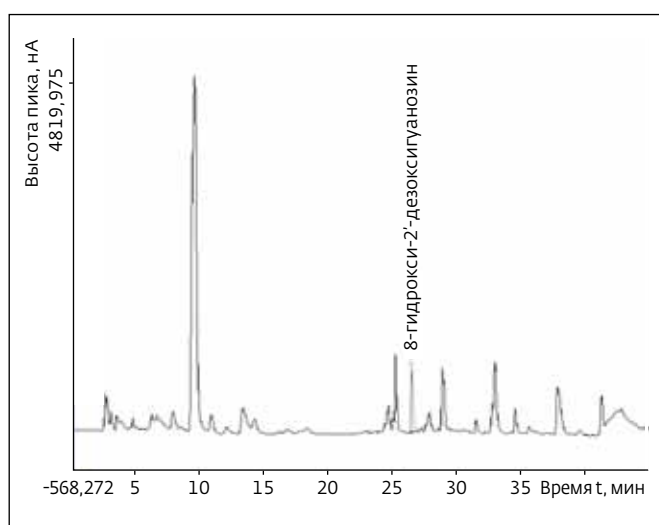


Рис.2. Хроматограмма мочи больного атеросклерозом: появление пика 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозин, $t=27$ мин (колонка Zorbax SB- C_{18} 4,6×250 мм, градиентный режим элюирования)

из мочи. Эти измененные нуклеозиды определяют с помощью УФ-детектора. Окисленные формы определяют амперометрическим детектором (рис.1).

В последние годы удалось обнаружить измененные нуклеозиды, в том числе 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозин, без выделения на картридже с Affi-Cel. Для этого мочу больного центрифугируют и пробу вводят в хроматограф. На рис.2. приведены хроматограммы мочи больного атеросклерозом. На хроматограмме присутствуют более 60 пиков. Пик, появившийся на 27-й минуте, соответствует нуклеозиду 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозину.

МАРКЕРЫ ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ

В большей степени воздействию свободных радикалов подвержены ненасыщенные связи жирных кислот в мембранах. Маркеры окисления липидов – альдегиды, диальдегиды, метилглиоксаль, производные гексенала, ноненала и изопростана. В табл.2 перечислены маркеры окисления липидов.

Наиболее часто используют маркер малоновый диальдегид (МДА), который наиболее информативный. МДА образуется при перекисном окислении липидов свободными радикалами при разрыве молекул полиненасыщенных жирных кислот. Повышенная концентрация МДА в сыворотке крови служит маркером степени эндогенной интоксикации и окислительного стресса [15-19]. МДА образует шиффовы основания с аминокгруппами белка, в результате чего возникают нерастворимые липид-белковые комплексы (пигменты изнашивания).

Таблица 2. Основные маркеры окисления липидов

Маркер	Методы определения
Малоновый диальдегид	ВЭЖХ с СПФ, дериватизация
Акролеин	ВЭЖХ с СПФ, дериватизация
4-гидрокси-2-ноненаль (4-HNE)	ВЭЖХ с СПФ, дериватизация
4-гидрокси-2-гексеналь	ВЭЖХ с СПФ, дериватизация
Метилглиоксаль	ВЭЖХ с СПФ, дериватизация
7-кетохолестерол	ВЭЖХ с УФ
Кротоновый альдегид	ВЭЖХ с УФ
Изопростаны	ВЭЖХ-МС ГХ-МС

МДА определяют в образцах многих биологических жидкостей: сыворотке, плазме, моче, конденсате выдыхаемого воздуха. Чаще всего для обнаружения МДА используют образцы сыворотки, такое определение

самое надежное, а пробоподготовка проще и дешевле. Концентрация МДА в сыворотке крови у здоровых людей (в норме) меньше 1 мкмоль/л [20].

Метод ВЭЖХ с фотометрическим детектором в видимой области (длина волны $\lambda=532$ нм) [15–19] дает наиболее достоверные результаты. Для определения МДА используют реакцию с тиобарбитуровой кислотой. При реакции МДА с тиобарбитуровой кислотой образуется окрашенное соединение – триметиновый комплекс (поглощение при 532–535 нм) (рис.3). Производные после этой реакции можно обнаружить и флуориметрическим детектором, в работе [20] сравниваются результаты определения МДА, полученные разными методами. В работе [4] приведены результаты обследования более 200 здоровых людей (107 мужчин и 106 женщин), у которых МДА определяли методом ВЭЖХ с фотометрическим детектором на длине волны 532 нм. Во взятых пробах наблюдали колебание значения концентрации МДА в пределах 0,36–1,24 мкмоль/л. Анализ показал, что значение концентрации МДА практически не зависит от пола и возраста обследуемых. Повышение концентрации МДА в плазме наблюдается у курильщиков, а также у людей, потребляющих спиртные напитки.

Определение тирозина и его производных

Тирозин – α -амино- β -(*p*-оксифенил)пропиловая кислота – заменимая аминокислота с ароматическим кольцом и гидроксильной группой в ней в пара-положении, поэтому тирозин является антиоксидантом. В организме человека присутствует только L-тирозин, который входит в состав белков и ферментов. Тирозин – важная аминокислота, являющаяся предшественником биологически активных соединений: адреналина, норадреналина, дофамина и др. При воздействии свободных радикалов на свободный тирозин или тирозин, содержащийся в составе белков, происходит его окисление. В результате появляются производные – маркеры процесса окисления белков (3-хлортирозин, 3-нитротирозин, 3,5-дихлортирозин, дитирозин и некоторые другие). Появление этих маркеров в биологических жидкостях возни-

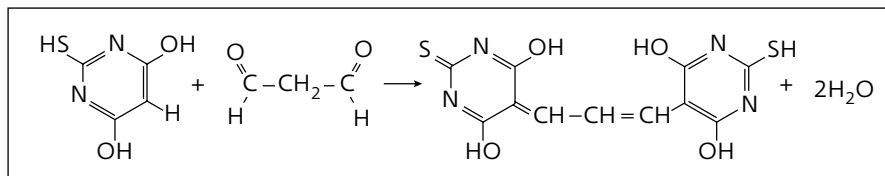


Рис.3. Реакция взаимодействия МДА с тиобарбитуровой кислотой

кает при атеросклерозе, болезнях Паркинсона и Альцгеймера и других заболеваниях. Дитирозин является специфическим маркером окислительного стресса головного мозга. Окисленные формы тирозина легко определить с помощью амперометрического детектора [21].

Для разделения смеси мы выбрали обращенно-фазовый режим высокоэффективной жидкостной хроматографии. В качестве разделительной колонки использовали колонку Zorbax SB-C₁₈ 4,6×250 мм. Эта колонка заполнена зернами сорбента – силикагеля с привитыми к его поверхности цепями C₁₈, размер зерен – 5 мкм. Далее, после выбора оптимальных рабочих условий разделения, в качестве элюента (подвижной фазы) в изократическом режиме использовали ацетонитрил (4%), подкисленный ортофосфорной кислотой. Скорость подачи (прокачки) элюента 1 мл/мин обеспечила за 15 мин полное разделение смеси: 3,4-DOPA, тирозина, м-тирозина, о-тирозина, 3-хлортирозина и 3-нитротирозина. Конечно, если увеличить скорость элюента или поднять температуру колонки, можно значительно сократить время разделения смеси. На рис.4 приве-

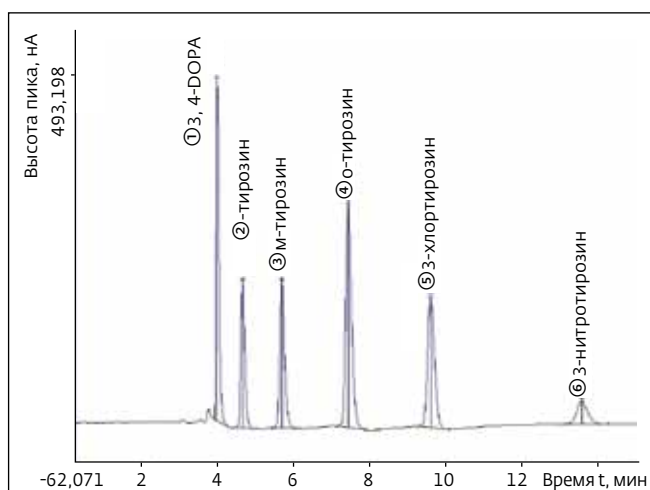


Рис.4. Хроматограмма разделения стандартной смеси производных тирозина (3,4-DOPA 10 мг/дм³, тирозин 4,64 мг/дм³, мета-тирозин 5 мг/дм³, орто-тирозин 10 мг/дм³, хлортирозин 10 мг/дм³, 3-нитротирозин 10 мг/дм³) в изократическом режиме (колонка Zorbax SB-C₁₈ 4,6×250 мм)

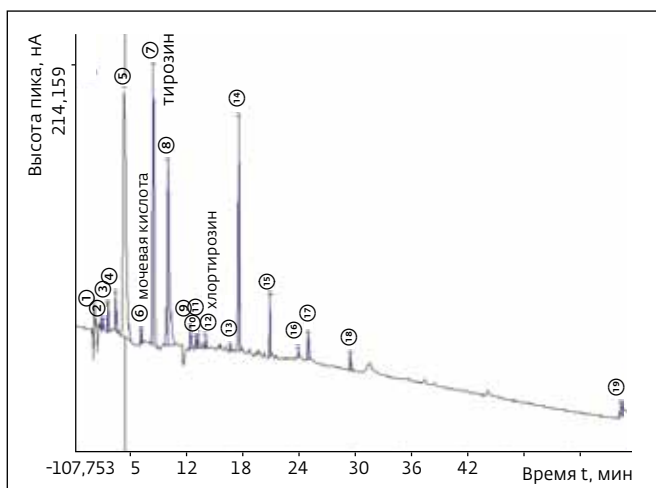


Рис.5. Хроматограмма определения производных тирозина в слюне больной, обнаружены: мочевая кислота, тирозин, хлортирозин, 3-нитротирозин (колонка Zorbax SB-C₁₈ 4,6×250 мм, градиентный режим элюирования)

дена хроматограмма разделения стандартных соединений в изократическом режиме, а на рис.5 – хроматограмма определения производных тирозина в слюне, в ней заметны пики, соответствующие мочевой кислоте, тирозину, хлортироzinу и 3-нитротирозину.

В тех случаях, когда в биологических жидкостях присутствуют более высокомолекулярные соединения, желательно использовать режим градиентного элюирования. При работе в таком режиме элюирующая способность подвижной фазы (элюента) возрастает за счет роста концентрации ацетонитрила в общей смеси элюента. Мы определили пределы амперометрического детектирования, используя стандартные образцы производных тирозина (табл.3).

ОЦЕНКА ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ЭНДОГЕННЫХ АНТИОКСИДАНТОВ

В биологических жидкостях человека постоянно присутствуют эндогенные антиоксиданты: глутатион (GSH), цистеин, мочевая кислота и убихинол. Молекулы этих соединений существуют в восстановленной форме (антиоксиданты) или окисленной. При встрече со свободными радикалами или активной формой кислорода или азота эти эндогенные антиоксиданты окисляются, но через определенное время восстанавливаются специальными ферментами. За счет этого механизма в биологических жидкостях здорового человека устанавливается опреде-

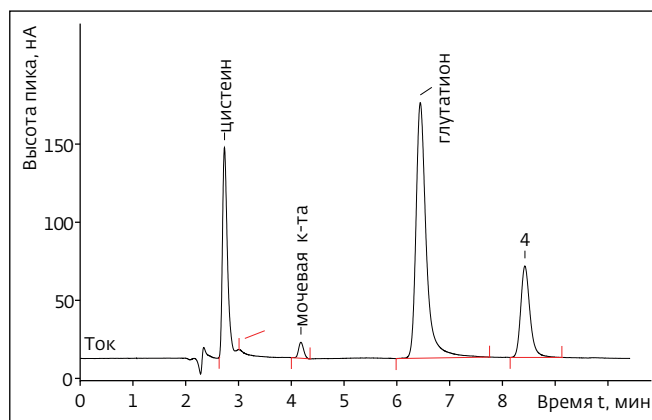


Рис.6. Хроматограмма разделения стандартной смеси цистеина, мочево́й кислоты и глутатиона восстановленного (GSH) в изократическом режиме (колонка Zorbax SB-C₁₈ 4,6×250 мм)

ленный баланс между оксидантами и антиоксидантами.

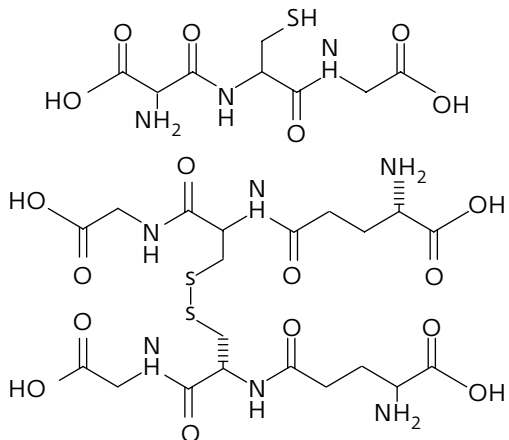
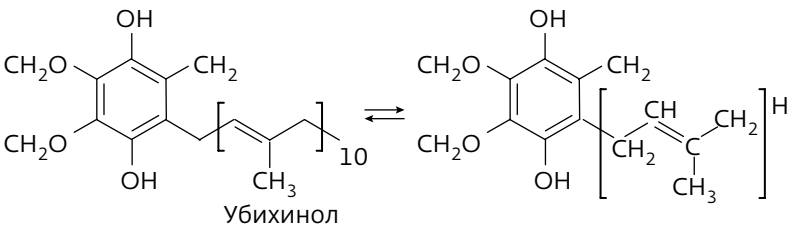
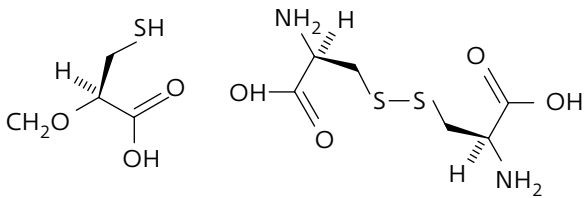
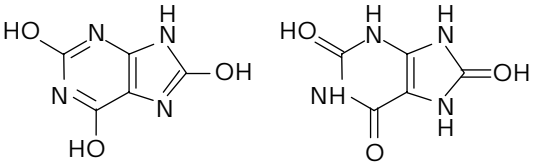
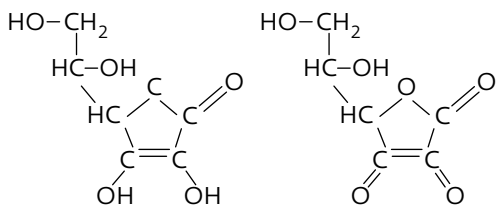
Хроматографический метод помогает определить отношение восстановленных и окисленных форм: глутатиона, мочево́й кислоты, цистеина к цистину, убихинола к убихинону [22–29]. Экзогенный антиоксидант – аскорбиновая кислота – также существует в двух формах (табл.4). Отношение нитрита к нитрату в слюне также связано с окислительно-восстановительным равновесием. Эти эндогенные антиоксиданты определяли хроматографическими методами [22–29]. На рис.6 приведена хроматограмма эндогенных антиоксидантов. По результатам исследований определены пределы амперометрического детектирования: цистеина – $4 \cdot 10^{-10}$ г/см³, мочево́й кислоты – 10^{-10} г/см³.

Найденные значения пределов детектирования соединений позволят в дальнейшем нахо-

Таблица 3. Пределы амперометрического детектирования тирозина и его производных

Соединения	Предел детектирования, г/см ³
3,4-DOPA	$1,1 \cdot 10^{-9}$
Тирозин	$4,9 \cdot 10^{-10}$
м-тирозин	$6,1 \cdot 10^{-10}$
о-тирозин	$1,1 \cdot 10^{-9}$
3-хлортирозин	$1,9 \cdot 10^{-9}$
3-нитротирозин	$9,3 \cdot 10^{-9}$

Таблица 4. Перечень восстановленных и окисленных форм маркеров для оценки окислительного стресса

Отношения восстановленных форм к окисленным	Структурные формулы	Метод определения
Глутатион: восстановленный глутатион к окисленному (GSH/GSSH)		ВЭЖХ с АД и УФ
Убихинол/убихинон		ВЭЖХ с АД и УФ
Цистеин/цистин		ВЭЖХ с АД, УФ и ФЛУ
Мочевая кислота: восстановленная форма к окисленной		ВЭЖХ с АД и УФ
Аскорбиновая кислота/деоксиаскорбиновая кислота		ВЭЖХ с АД и УФ

дить их в биологических жидкостях и определять их соотношения. Далее, по величине отношения глутатиона восстановленного к окисленному, убихинола восстановленного к окисленному убихинону, цистеина – к цистину, нитрита – к нитрату, можно будет оценить уровень окислительного стресса. А значит, это позволит оценить общее состояние здоровья человека.

Внедрение метода ВЭЖХ для определения маркеров окислительного стресса в стандартные биохимические лаборатории больниц и диагностических центров позволит диагностировать окислительный стресс в самом начале его наступления. Вовремя назначенная антиоксидантная терапия предупредит развитие болезни. Такой профилактический скрининг значительно сократит затраты на медицину.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Dalle-Donne I., Rossi R., Colombo R.** et al. Biomarkers of oxidative damage in human disease. – *Clin Chem.*, 2006, v. 32, p. 601–623.
2. **Papaharalambus C.A., Griending K.K.** Basic mechanisms of oxidative stress and reactive oxygen species in cardiovascular injury. – *Trends Cardiovasc. Med.*, 2007, v.17, p.48–54.
3. **Ogino K., Wang D.-H.** Biomarkers of oxidative / Nitrosative stress: an approach to disease prevention. Review. – *Acta Med. Okayama*, 2007, v.61, p.181–189.
4. **Roberts R.A., Laskin D.L.** et al. Nitrate and oxidative stress in toxicology and disease. – *Toxicological sciences*, 2009, v.112 (1), p.4–16.
5. **Piazza J.R.** et al. Frontiers in the use of biomarkers of health in Research on stress and Aging. – *J. Gerontology: Psychological Sciences*, 2010, v.65 B, p.513–525.
6. **Hawkey L.C.** et al. Stress and the aging immune system Brain. – *Behavior and Immunity*, 2004, v.18, p.114–119.
7. **Яшин Я.И., Рыжнев В.Ю., Яшин А.Я., Черноусова Н.И.** Природные антиоксиданты. Содержание в пищевых продуктах и их влияние на здоровье и старение человека. – М.: Транслит., 2009.
8. European Standards Committee on Oxidative DNA Damage (ESCODD). Measurement of DNA oxidation in human cells by chromatographic and enzymic methods. – *Free Radical Biol. Med.* 2003, v.34, p.1089–1099.
9. **Wood S.G., Gedik C.M., Vaughan N.J., Collins A.R.** Measurement of 8-oxo- deoxyguanosine in lymphocytes, cultured cells and tissue samples by HPLC with electrochemical detection. In Barnett Y.A. and Barnett C.R. (eds). *Aging Methods and Protocols*. – NJ.: Humana Press Inc. Totowa, 2000, p.171–178.
10. **Valavanidis A., Vlachogianni T. and Fiotakis C.** 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A Critical Biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. – *Journal of Environmental Science and Health Part*, 2009, v.27, p.120–139.
11. **Bartsch H., Nair J.** New DNA – based biomarkers for oxidative stress and cancer chemoprevention studies. *Eur. J. Cancer* 2000, v.36, p.1229–1234.
12. **Wood S.G., Gedik C.M., Vaughan N.J., Collins A.R.** Measurement of 8-oxo- deoxyguanosine in lymphocytes, cultured cells and tissue samples by HPLC with electrochemical detection. In Barnett Y.A. and Barnett C.R. (eds). *Aging Methods and Protocols*. Humana Press Inc. Totowa 2000, NJ, p. 171–178.
13. **Helbock H.J., Beckman K.B., Shigenaga M.K.** et al. DNA oxidation matters: the HPLC electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanosine. – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, v.95, p.288–293.
14. **Matayatsuk C., Wilairat P.** Quantitative determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biomarker of oxidative stress in thalassemic patients using HPLC with an electrochemical detector. – *J. Anal. Chem.*, 2008, v.63, p.52–56.
15. **Carbonneau M.A., Peuchaut E., Sess D.** et al. Free and bound malondialdehyde measured as thiobarbituric acid adduct by HPLC in serum and plasma. – *Clin. Chem.*, 1991, v.37, p.1422–1429.
16. **Nielsen F., Mikkelsen B.B., Nielsen J.B.** et al. Plasma malondialdehyde as biomarker of oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. – *Clinical Chemistry*, 1997, v.43(7), p.1209–1214.
17. **Young I.S., Trimble E.R.** Measurement of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection. – *Ann. Clin. Biochem.*, 1991, v.28, p.504–508.
18. **Richard M.J., Guiraud P., Meo J., Favier A.** HPLC separation of malondialdehyde – thiobarbituric acid adduct in biological materials (plasma and human cells) using a commercially available reagent. – *J. Chromatogr.*, 1992, v.577, p.9–18.
19. **Gerritsen W.B., van Boven W.-J.P., Boss D.S.** et al. Malondialdehyde in plasma, a biomarker of global oxidative stress during mini-CABG compared to on- end off-pump CABG surgery: a pilot study. – *Interactive Cardio Vascular and Thoracic Surgery*, 2006, v.5, p.27–31.

20. **Bird R.P., Draper H.H.** Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. - *Methods Enzymol.*, 1984, v.105, p.299-305.
21. **Hensley K., Williamson K.S., Maitt M.L.** et al. Determination of Biological oxidative stress using HPLC with electrochemical detection. - *J. High Resol. Chromatogr.*, 1999, v.22, p.429-437.
22. **Afzal M., Afzal A., Jones A., Armstrong D.** A Rapid Method for the Quantification of GSH and GSSG in Biological Samples. In: "Oxidative stress. Biomarkers and antioxidant protocols". - N.J. : Humana Press, Totowa, 2002, p.117-122.
23. **Yamamoto Y., Yamashita S.** Ubiquinol/Ubiquinone Ratio as marker of oxidative stress. In: "Oxidative stress. Biomarkers and antioxidant protocols". - N.J.: Humana Press, Totowa, 2002, p. 241-246.
24. **Forman H.J., Zhang H., Rinna A.** Glutathione: overview of its protective roles, measurement and biosynthesis. - *Mol. Aspects Med.* 2009, v.30, p.1-12.
25. **Johnson J.M., Strobel F.H., Reed M.** et al. A rapid LC-FTMS method for analysis of cysteine, cystine and cysteine/cystine steady-steady-stated redox potential in human plasma. - *Clin. Chim. Acta*, 2007, v.366, p.43-48.
26. **Jones D.P., Carlson J.L., Samiec P.S.** et al. Glutathione measurement in human plasma. Evaluation of sample collection, storage and derivatization conditions for analysis of dansyl derivatives by HPLC. - *Clinica Chimica Acta*, 1998, v.275, p.175-184.
27. **Ashfaq S., Abramson J.L., Jones D.P.** et al. The Relationship between plasma levels of oxidized and reduced thiols and early atherosclerosis in healthy adults. - *J. Amer. College Cardiol.*, 2006, v.47, p.1005-1011.
28. **Iyer S.S., Jones D.P., Brigham K.L., Rojas M.** Oxidation of plasma cysteine/cystine redox state in Endotoxin-Induced lung injury. - *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2009, v.40, p.90-98.
29. **Miller L.T., Watson W.H., Kirilin W.G.** et al. Oxidation of the glutathione/glutathione disulfide redox state is induced by cysteine deficiency in human colon carcinoma HT29 cells. - *J. Nutr.*, 2002, v.132, p.2303-2306.