

© Хвойницкая Л.Г., Бухов В.А., 2004  
УДК 616.12-009.72-008.831

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ РИБОЗЫ СЫВОРОТКИ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ПРОГРЕССИРУЮЩЕЙ СТЕНОКАРДИЕЙ МЕТОДОМ ГАЗОЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

*Л.Г. Хвойницкая, В.А. Бухов*

Рязанский государственный медицинский университет  
имени академика И.П. Павлова

**В работе представлены результаты клинических исследований по применению новой методики определения содержания рибозы в сыворотке крови путем получения альдонитрилов моносахаридов, а также динамика содержания рибозы в сыворотке крови у больных прогрессирующей стенокардией.**

Известно, что рибоза играет определенную роль в энергетическом обмене ишемизированного миокарда, а также является субстратом для синтеза рибозо-содержащих соединений. Однако сведения о содержании рибозы в сыворотке крови больных ИБС и у здоровых лиц отсутствуют.

Разработка эффективных методов количественного определения рибозы в сыворотке крови все еще остается одной из актуальных проблем современной биохимии. Известные ранее способы определения моносахаридов – тонкослойная хроматография [1] на слоях кизельгурт – гипс, силикогель – гипс, ядерно-магнитный резонанс, масс-спектрометрия [2], хроматография на бумаге [4] не обладают достаточной специфичностью для близких сахаров. Единственным рутинным методом идентификации и количественного анализа моносахаридов в биологических объектах считается газожидкостная хроматография. Наиболее удобным для этого считается способ приготовления простого триметилсилилового эфира [3]; однако подготовленные таким образом пробы нестабильны, сам способ трудоемок и требует специального дорого-

стоящего оборудования.

Целью настоящей работы была разработка доступной методики определения содержания моносахаридов сыворотки крови и изучение динамики содержания рибозы в сыворотке крови у больных прогрессирующей стенокардией.

### **Материалы и методы**

Предложенный метод проведения газохроматографического анализа предполагает приготовление ацетилованных альдонитрилов моносахаридов. Подготовка пробы проводилась по следующей методике: к 1 мл сыворотки крови добавляется 1 мл раствора ксилозы в дистиллированной воде в концентрации 1 ммоль/л, тщательно перемешивается. Затем полученную смесь центрифугируют, 1 мл полученной сыворотки вносят в центрифужную пробирку; для осаждения сопутствующих компонентов добавляют 2 мл 1,8 % раствора Ва (ОН)<sub>2</sub> и 2 мл ZnSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O, перемешивают стеклянной палочкой в течение 1 минуты, затем отстаивают 10 минут при комнатной температуре. Смесь центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин., 2 мл надосадочной жидкости переносят в чистую сухую пробирку, используемую в дальнейшем как

реакционный сосуд и выпаривают на водяной бане досуха. К полученному сухому остатку добавляют 2 мл пиридина, 100 мг гидроксилamina, запаивают в ампулу и нагревают на водяной бане в течение 1 часа. Ампулу вскрывают, добавляют 2 мл уксусного ангидрида, вновь запаивают и нагревают на водяной бане 1 час, ампулу вновь вскрывают и ее содержимое с помощью разделительной воронки дважды промывают 2 мл хлороформа, экстрагируя этим полученные альдонитрилы. Хлороформы объединяют и выпаривают досуха в сушильном шкафу при температуре 60 градусов Цельсия.

Для газохроматографического анализа полученный после выпаривания хлороформа осадок разводят 20 мкл хлороформа, пробу объемом 0,5-1 микролитр вводят микрошприцем в колонку хроматографа длиной 2 м, сечением 3 мм, заполненную 3% Silicone XE-60 на отмытом кислотой хроматоне (производство Бельгия). Температура колонки составляет 220 градусов Цельсия при изотермическом режиме или программируется от 210 до 245 градусов Цельсия со скоростью 12 градусов Цельсия в минуту.

Работа проводилась на газожидкостном хроматографе «Цвет 101-М» производства СССР. В качестве вещества-свидетеля выступал приготовленный по указанной методике ацетилированный альдонитрил D-рибозы (фирма ICN,

США). Расчет содержания моносахаридов проводился методом вычисления площадей полученных пиков и определением их соотношения к площади пика внесенной в пробу ксилозы в концентрации 0,5 ммоль/л.

Объектом исследования послужила сыворотка крови 40 больных прогрессирующей стенокардией (17 женщин и 23 мужчины, средний возраст  $48,6 \pm 4,2$  лет), а также 31 донора, не страдающих заболеваниями сердечно-сосудистой системы (13 мужчин и 18 женщин, средний возраст  $52,2 \pm 3,5$  года).

### Результаты и их обсуждение

В ходе анализа получены четкие хроматографические пики ксилозы, рибозы, глюкозы и еще двух моносахаридов, идентификация которых не входила в задачи настоящей работы. Подготовленные таким образом пробы стабильны в течение не менее 1 года при хранении в комнатных условиях.

Данные о содержании рибозы в сыворотке крови больных прогрессирующей стенокардией при поступлении и после проведенного лечения приведены в табл. 1.

Установлено, что исходный уровень содержания рибозы в сыворотке крови больных прогрессирующей стенокардией по сравнению с контрольной группой снижен ( $0,47 \pm 0,01$  против  $0,712 \pm 0,042$  ммоль/л;  $p < 0,001$ ).

Таблица 1

Динамика содержания рибозы в сыворотке крови больных прогрессирующей стенокардией ( $M \pm m$ )

Показатели	Прогрессирующая стенокардия n=40		Контрольная группа n=31	P <sub>1-3</sub>	P <sub>2-3</sub>	P <sub>1-2</sub>
	при поступлении	при выписке				
	1	2	3	4	5	6
Рибоза, ммоль/л	$0,47 \pm 0,01$	$0,63 \pm 0,01$	$0,712 \pm 0,042$	<0,001		<0,001

После проведенного лечения содержание рибозы увеличилось по сравнению с исходным ( $0,63 \pm 0,01$  против  $0,47 \pm 0,01$  ммоль/л;  $p < 0,001$ ) и достоверно не отличалось от контрольной группы.

Снижение содержания рибозы в сыворотке крови больных прогрессирующей стенокардией, вероятно связано с повышенной экстракцией ее в зонах гибернирующего миокарда, где данный моносахарид может быть использован для поддержания синтеза адениловых нуклеотидов, ускорения ресинтеза АТФ в кардиомиоцитах.

#### Выводы

1. Метод определения моносахаридов в сыворотке крови путем получения альдононитрилов моносахаридов позволяет увеличить срок стабильности проб до 1 года при хранении в комнатных условиях.

2. Содержание рибозы в сыворотке крови у больных прогрессирующей стенокардией достоверно снижено по сравнению с таковым у здоровых лиц. После проведенного лечения содержание рибозы увеличивается и достоверно не отличается от контрольной группы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ахрем А.А. Тонкослойная хроматография / А.А. Ахрем, А.И. Кузнецова. – М.: Наука, 1964. – 176с.
2. Методы исследования углеводов: Пер. с англ./ Под ред. А.Я. Хормина. – М.: Мир, 1975. – 480с.
3. Митрука Д.М. Применение газовой хроматографии в микробиологии и медицине / Д.М. Митрука. – М.: Медицина, 1982. – 310с.
4. Хроматография на бумаге: Пер. с чеш. Б.М. Вольфсоки / Под ред. И.М. Хайса, К. Мацека. – М.: Изд-во иностранной литературы, 1962. – 851с.

#### DEFINITION OF THE CONTENTS OF A RIBOSE OF SERUM OF A BLOOD FOR AN ILL PROGRESSING STENOCARDIA BY A METHOD OF A GAS-LIQUID CHROMATOGRAPHY

L.G. Hvojnitskaja, V.A. Bukhov

In operation the outcomes clinical research on application of a new technique of determination of the contents of a ribose in Serum of a blood are represented by deriving of aldononitriums of monosaccharides, and also speaker of the contents of a ribose in Serum of a blood for an ill progressing stenocardia.