

© Коллектив авторов, 2016

УДК 543,061: 543,068.7: 543,068.5: 577.1

Иванов А.В.<sup>1</sup>, Кучукова М.Ю.<sup>2</sup>, Вирюс Э.Д.<sup>1</sup>, Зурина И.М.<sup>1</sup>, Лузянин Б.П.<sup>1</sup>, Кубатиев А.А.<sup>1</sup>

## Исследование гомоцистеинилирования белков плазмы крови методом капиллярного электрофореза

<sup>1</sup> — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва, 125315, ул. Балтийская, 8, тел. 8-499-151-1756, факс 8-495-601-2366

<sup>2</sup> — Государственное бюджетное учреждение здравоохранения г.Москвы «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина» Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, 125284, 2-й Боткинский пр-д, 5, тел. 8-495- 945-0045

**Цель исследования** — апробация и валидация подхода к определению отношения концентраций связанных с белками фракций цистеина и гомоцистеина в плазме крови человека методом капиллярного электрофореза с УФ-детектором. **Методика.** Белки плазмы крови восстанавливали дитиотреитолом и дериватизировали тиокарбонилдиимидазолом, после чего аналиты очищали от белков ультрафильтрацией. Введение аналитов в капилляр осуществляли электрокинетически. Разделение проводили в кварцевом капилляре длиной 48,5 см и внутренним диаметром 50 мкм, используя 0,2 М ацетат аммония с 25 мкМ гексадецилтриметиламмония бромидом. **Результаты.** Предел количественного определения по гомоцистеину составил 0,8 мкМ, воспроизводимость соотношения цистеин/гомоцистеин <5%, время анализа 15 мин. **Заключение.** Показано, что отношение связанных форм цистеина к гомоцистеину характеризуется теми же закономерностями, что и отношение их общего содержания. Оно имеет довольно высокую степень корреляции с уровнем связанного гомоцистеина и характеризуется меньшей вариабельностью, чем уровень общего гомоцистеина, что дает преимущество его использования для оценки риска развития осложнений сердечно-сосудистых заболеваний.

**Ключевые слова:** гомоцистеин, цистеин, капиллярный электрофорез, гомоцистеинилирование белков, тиокарбонилдиимидазол.

**Для корреспонденции:** Иванов Александр Владимирович, канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории Регуляции агрегатного состояния крови ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», e-mail: Ivanov\_av82@mail.ru

**Для цитирования:** Иванов А.В., Кучукова М. Ю., Вирюс Э.Д., Зурина И.М., Лузянин Б.П., Кубатиев А.А. Исследование гомоцистеинилирования белков плазмы крови методом капиллярного электрофореза. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(4): 178—184.

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (грант № 16-15-10340).

**Конфликт интересов:** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 16.09.2016

Ivanov A.V.<sup>1</sup>, Kuchukova M.Yu.<sup>2</sup>, Virus E.D.<sup>1</sup>, Zurina I.M.<sup>1</sup>, Luzyanin B.P.<sup>1</sup>, Kubatiev A.A.<sup>1</sup>

## Application of the capillary electrophoresis method for the study of plasma proteins homocysteinylolation

<sup>1</sup> — Federal State Budget Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology», Russia, Moscow, 125315, Baltiyskaya str., 8, phone +7-499-151-1756, fax +7-495-601-2366

<sup>2</sup> — State Budget Institution of Health in Moscow «Hospital named after S.P. Botkin» Moscow Health Department, Russia, Moscow, 125284, 2nd Botkinskiy Pr., 5, tel. +7-495- 945-0045

**Purpose.** This article describes the use of capillary electrophoresis with UV detection to determine the ratio of protein-bound homocysteine and cysteine concentrations in human plasma. **Methods.** Plasma samples were reduced with dithiothreitol and derivatized by thiocarbonyldiimidazole before being filtered again for purification of proteins. The pre-concentration of analytes was carried out directly in the capillary (48.5 cm in length and an inner diameter of 50 mkm) by NaOH post-injection. The eletrophoretic separation of analytes was carried out using 0.2 M ammonium acetate with 25 mM hexadecyltrimethylammonium bromide. **Results.** Limit of quantitation for homocysteine was 0.8 mkM, reproducible ratio of cysteine/homocysteine <5%, full analysis time 15 min. **Conclusion.** The ratio of bound cysteine to homocysteine is characterized by the same regularity as the ratio of their total content. It has a fairly high degree of correlation with the level of bound homocysteine and it is characterized by less variability than the level of total homocysteine. This has the advantage of use the bound cysteine/homocysteine ratio for assessing the risk of cardiovascular disease complications.

**Keywords:** bound homocysteine, bound cysteine, thiocarbonyldiimidazole, capillary electrophoresis, plasma.

**For citation:** Ivanov A.V., Kuchukova M.Yu., Virus E.D., Zurina I.M., Luzyanin B.P., Kubatiev A.A. Application of the capillary electrophoresis method for the study of plasma proteins homocysteinylation. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (4): 178–184. (in Russ.)

**For correspondence:** Ivanov Alexander, FSBSI «Institute of General Pathology and Pathophysiology», e-mail: Ivanov\_av82@mail.ru

**Conflict of interest.** Authors declare no conflict of interest.

**Funding.** This study was supported by grant from the Russian Science Foundation (project Nu. 16-15-10340).

**Received** 16.09.2016

## Введение

Около половины цистеина (Цис) и большая часть (70—80%) гомоцистеина (Гцис) плазмы крови ковалентно связаны с цистеиновыми остатками белков, и поэтому эта их часть обозначаются как связанная форма (сЦис, сГцис) [1]. Повышенный уровень (>10—15 мкМ) общего содержания Гис (оГцис) плазмы, или гипергомоцистеинемия, является независимым фактором риска развития многих сосудистых заболеваний [2]. Интерес к определению сГцис обусловлен тем, что гомоцистеинилирование белков приводит к их окислительному повреждению и утрате функции [3], а также накоплению Гцис в клетках, которые активно утилизируют белки плазмы [4, 5]. Цис является конечным продуктом метаболизма Гцис по пути транссульфурации и основным конкурентом за сайты связывания с белками. Тесная связь их метаболизма вызывает интерес к использованию соотношения сЦис/сГцис как альтернативу определению оГцис в плазме крови. Было показано, что оно лучше отражает нарушения пути транссульфурации и биодоступность Гцис, а также может учитывать преаналитические ошибки [6]. Также была выявлена положительная связь оГцис и отрицательная связь оЦис с риском развития колоректального рака у женщин в постменопаузе [7].

Распространенным методом для анализа оГцис является ИФА [8], однако он не может использоваться для одновременного определения других тиолов. Было предложено множество аналитических методов с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и капиллярного электрофореза (КЭ) с ультрафиолетовым (УФ) [9—11], флуоресцентным [1, 12, 13], а также электрохимическим [14] детекторами или масс-спектрометрией [15, 16]. Чувствительность большинства из них (<0,1 мкМ) достаточна не только для определения общего содержания, но и свободной или даже восстановленной фракций аминокислот. Несмотря на достоинства КЭ-УФ (доступность, селективность, производительность, экономичность и др.), его использование для такого анализа является нетривиальной задачей. Было предпринято несколько попыток адапти-

ровать КЭ-УФ для анализа общего Гцис, используя дериватизацию распространенными для ВЭЖХ реагентами [17—19], но достигнутая в лучшем случае чувствительность (5 мкМ) не позволит проводить достоверный анализ сГцис, так как его типичное содержание составляет ~5—9 мкМ. Лучшие результаты были показаны в работе [13] где использовали прямой анализ аминокислот в коротковолновой области (190 нм). В этом случае предел количественного определения в модельных растворах составлял 1 мкМ. Однако применение этого подхода к образцам биологических жидкостей связано с серьезными затруднениями из-за присутствия большого количества мешающих компонентов. На сегодняшний день нам известно только два успешных метода анализа плазменных тиолов методом КЭ-УФ. В частности, применяется дериватизация тетрафтороборатом 2-хлор-1-метилхинолина с последующим рН-зависимым концентрированием аналитов [20]. В обоих случаях предел обнаружения составлял 1 мкМ. Существенным ограничением этого подхода является то, что дериватирующий реагент не является стабильным и коммерчески доступным и требует самостоятельного синтеза. Очень высокая чувствительность (0,065—0,01 мкМ) была показана прямым анализом аминокислот с использованием Au-наночастиц, позволяющих их селективно сконцентрировать и очистить [21]. Однако этот подход также связан с необходимостью самостоятельного синтеза наночастиц, а также длительным анализом (около 40 мин). Поэтому имеется потребность в разработке более простых и доступных методов КЭ-УФ.

При выборе подходящего дериватирующего агента для КЭ-УФ мы придерживались следующих требований. Во-первых, он не должен осложнять концентрирование аналитов в капилляре, которое неизбежно ввиду ограниченной загрузки капилляра. Во-вторых, его избыток не должен интерферировать с пиками аналитов. Это означает, что желательно использовать незаряженный реагент, но продукты дериватизации должны нести заряд одного знака, притом в широких диапазонах рН. Широко распространенные соединения для анализа тиолов, такие, как 5,5-дитио-

бис-(2-нитробензойная кислота) (ДТНБ), монобромобиман, 4-аминосульфони́л-7-фтор-2,1,3-бензоксадиазолин или 2,2'-дипиридилдисульфид не удовлетворяют этим условиям. В отличие от вышеперечисленных гомофункциональных агентов, 1,1'-тиокарбонилдимидазол (ТКДИ) связывает  $\text{NH}_2$ - и  $\text{SH}$ -группы анализов, образуя гетероциклические производные с Цис, Гцис и др. аминотиолами [22]. Их кислотный характер дает возможность использовать различные методы КЭ-концентрирования, например, рН-зависимый щелочной стекнинг [23]. При этом сам агент и продукты его гидролиза являются слабыми электролитами, что соответствует вышеупомянутым требованиям. Первоначально ТКДИ использовался для ВЭЖХ-УФ анализа общих аминотиолов плазмы и мочи с использованием ТКДИ и ТФЭ соответствующих производных [22]. Ранее нами была изучена применимость данного реагента к определению связанных аминотиолов [24]. В данной работе мы применили и валидировали этот подход для сравнения уровня связанного Гцис с отношением общего содержания и связанных форм Цис/Гцис в плазме крови с использованием ТКДИ и КЭ-УФ.

### Методика

**Реактивы.** Муравьиная кислота для ВЭЖХ-МС (Fluka, Германия), ТКДИ purum (Sigma-Aldrich, Швейцария), ацетат аммония осч (Реахим, РФ), ацетонитрил для ВЭЖХ (Химмед, РФ), NaCl чда (Fluka, Швейцария), пеницилламин (ПА) (Sigma-Aldrich, Германия), дитиотреитол (ДТТ) >99,5% (Fluka, Германия), Цис 97% (Aldrich, США), цистеинилглицин >85% (Sigma, Германия), Гцис >95% (Sigma, Германия), гексадецилтриметиламмония бромид (СТАВ) (Sigma, Индия), NaOH чда (Диа-М, пр-во Германия), ДТНБ (Sigma-Aldrich, США), этилендиаминотетрауксунная кислота (ЭДТА-Na) дигидрат >99% (AppliChem, Германия). Для получения деионизованной воды использовали установку Millipore Simplicity 185 с картриджом Simpakor 1.

Ультрафильтрацию проводили на фильтрах Amicon Ultra-3K (Millipore, Ирландия) 10—15 мин при 14000g.

Концентрированные растворы анализов (Цис — 100 мМ, Гцис — 50 мМ, ПА — 50 мМ и цистеинилглицин — 25 мМ) были приготовлены путем растворения навески вещества в соответствующем объеме 0,1% (об./об.)  $\text{HCOOH}$  и хранились при 80°C. Для восстановления использовали свежий раствор 0,1 М ДТТ. ТКДИ растворяли в одном объеме ацетонитрила и добавляли 9 объемов воды.

### Оборудование и ПО:

1. Система КЭ Agilent CE 3D system (Германия) с УФ-диодноматричным детектором. Поглощение измеряли при 254 (ширина 20 нм) с частотой 5 Гц. Использовали кварцевый капилляр внутренним диаметром 50 мкм и общей длиной 48,5 см (40 см до детектора).

2. Система ВЭЖХ Waters Acquity UPLC с диодно-матричным детектором PDA  $\lambda$ . Поглощение измеряли при 330 (ширина 5 нм) с частотой 10 Гц. Использовали колонку Agilent Poroshell-120 SB-C18 150x2,1 мм x 2,7 мкм.

Для регистрации сигнала и интегрирования площадей пиков использовали ПО ChemStation 32 (Agilent) и MassLynx 4.1 (Waters), анализ данных в Microsoft Excel 2003.

**Пробоподготовка.** Для исследования использовалась венозная кровь доноров-женщин (N = 19, 35—47 лет, средний возраст 41 год) подписавших информированное согласие. Кровь была собрана в пробирки с цитратом Na (3,8%). Все добровольцы не имели в анамнезе сердечно-сосудистых заболеваний. Образцы крови центрифугировали немедленно после получения при 3000g 3 мин. Плазму отделяли и хранили при 20°C перед дальнейшими манипуляциями.

**Связанные гомоцистеин и цистеин.** К 450 мкл воды добавляли 50 мкл плазмы и фильтровали через Amicon Ultra 3K. Затем оставшийся на фильтре раствор (~100 мкл) смешивали с 400 мкл воды и снова фильтровали. После к остатку добавляли 50 мкл 100 мкМ ПА (внутренний стандарт) содержащий 20 мМ ДТТ и инкубировали 10 мин при 37°C. К раствору добавляли 100 мкл 50 мМ ТКДИ и центрифугировали при 5000g 5 мин. Супернатант фильтровали через Amicon Ultra 3K. Пробы хранили при 4°C до трех дней перед анализом.

**Валидация.** Калибровку анализов проводили в воде и плазме, прошедшей вышеописанную обработку. Для построения градуировочных зависимостей было приготовлено 7 водных растворов с концентрациями Цис — 0; 15,6; 31,3; 62,5; 125; 250 и 500 мкМ, Гцис — 0; 3,1; 6,3; 12,5; 25; 50 и 100 мкМ соответственно. Была также построена градуировочная зависимость с использованием плазмы крови, полученных из смеси восьми образцов от разных доноров, к которой перед восстановлением и дериватизацией были добавлены аналиты до концентраций 0; 62,5; 125; 250 и 500 мкМ Цис и 0; 12,5; 25; 50 и 100 Гцис. После 10 мин инкубации при 25°C пробы были обработаны согласно вышеописанной процедуре. Опреде-

ление предела количественного определения было выполнено с использованием образцов плазмы без восстановления, но с дериватизацией, только для связанного Цис, как наиболее сложного для анализа аналита. Правильность методики определяли путем добавления к образцам плазмы ( $N = 5$ ) после ультрафильтрации добавляли аликвоты (1/5 объема плазмы) растворов аналитов до концентраций Гцис 2,0 и 10 мкМ; Цис 10 и 75 мкМ соответственно (в пересчете на исходный объем плазмы). Для линейного регрессионного анализа использовали отношения площадей пиков аналит/внутренний стандарт (ПА) помноженные на концентрацию стандарта в пересчете на объем плазмы крови.

**КЭ.** Перед анализом капилляр промывали 1 М NaOH, 10 мМ СТАВ, водой и фоновым электролитом (0,2 М ацетат аммония с 25 мкМ СТАВ) по 2 мин. Образец инжестировали при -15 кВ (режим «обращенного поля») 30 с, затем 60 с 0,2 М NaOH при том же напряжении. Разделение проводили при -15 кВ 15 мин. Промывка — 1 мин водой и 2 мин электролитом.

**Общее содержание гомоцистеина и цистеина** определяли путем предколоночной дериватизации тиолов 5,5-дитиобис-2-нитробензойной кислотой и хроматографического разделения соответствующих производных. К 200 мкл плазмы добавляли по 40 мкл 0,25 мМ ПА; 40 мкл 50 мМ ДТТ; 20 мкл воды и 80 мкл 200 мМ Na-фосфатного буфера с 10 мМ ЭДТА-Na, pH 7,4. Смесь инкубировали 10 мин при 37°C. Затем добавляли 400 мкл этанола и 400 мкл 50 мМ ДТНБ в EtOH, инкубировали 10 мин при 24°C, после 30 мин при 4°C и центрифугировали 10 мин. при 15000g. Супернатант (400 мкл) отбирали и упаривали досуха под вакуумом ~3 часа при 60°C. Высушенный образец растворяли в воде (0,5 мл) и центрифугировали 15 с при 10000g для осаждения нерастворимого остатка.

Объем инъекции составлял 2 мкл. Элюцию осуществляли при потоке 0,2 мл/мин градиентом ацетонитрила 2,5—10% за 5 мин, затем 70% 1,5 мин и 2,5% 4 мин. Коэлюент — 0,1 М ацетата аммония с 0,111% (об./об.) муравьиной кислоты.

### Результаты и обсуждение

Так как дериватизация ТКДИ придает рассматриваемым анализам анионный характер, то к ним можно применять методики концентрирования, основанные на электрокинетическом введении (ЭВ) в так называемом «обращенном поле» когда анодом служит выходной конец капилляра. Для того чтобы об-

ратить электроосмотический поток в сторону анода, предотвратив тем самым «утечку» аналитов, применяют динамическое покрытие катионными поверхностно-активными веществами типа СТАВ [22].

ЭВ позволяет существенно увеличить количество вводимых в капилляр аналитов по сравнению с гидродинамическим вводом если ионная сила пробы существенно меньше, чем у раствора, которым заполнен капилляр (электролита). В процессе ЭВ формируется зона, в которой происходит замещение анионов электролита на анионы пробы. Так как при длительной инъекции ширина этой зоны сильно ухудшает разделительную способность, то после пробы проводят ЭВ раствора щелочи, которая формирует градиент pH, что приводит к сужению пиков аналитов. Поэтому такой подход называют pH-зависимым щелочным стекингом [22]. Так как ионная сила плазмы является наиболее важным фактором, ограничивающим эффективность ЭВ, мы применили ультрафильтрацию для того, чтобы отделить большую часть солей от белков плазмы крови. Элетрофореграмма образца человеческой плазмы приведена на рис. 1. Добавка к образцу 1/10 объема 100 мМ NaCl приводила к снижению величины пиков аналитов в 10 раз (дан-

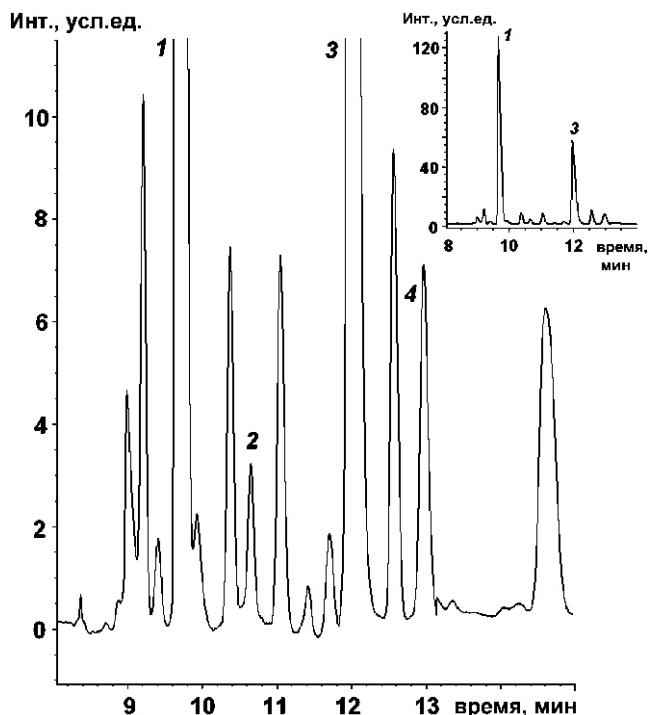


Рис. 1. Электрофореграмма образца плазмы крови (белок-связанные фракции аминотиолов). 1 — Цис, 2 — Гцис, 3 — ПА (внутренний стандарт), 4 — цистеинилглицин. Капилляр 48,5 см, 50 мкм внутр. диам., ЭВ -15 кВ 30 с затем -15 кВ 60 с 0,2 М NaOH, напряжение -15 кВ в 0,2 М ацетате аммония с 25 мкМ СТАВ

ные не приводятся). Как видно из рисунка, условия КЭ также позволяют определять дипептид цистеинилглицин, продукт гидролиза глутатиона. Относительные времена миграции Цис и Гцис составили  $0,8 \pm 0,02$  и  $0,882 \pm 0,014$  соответственно.

Градуировочные зависимости  $s_{\text{Цис}}$  и  $s_{\text{Гцис}}$  в плазме крови демонстрировали линейный характер во всем диапазоне добавленных концентраций и имели вид  $y = 0,0135x + 1,4$ ,  $y = 0,0086x + 0,029$  соответственно. В водном растворе были получены близкие значения  $y = 0,0136x + 0,124$  ( $\text{Цис}$ ) и  $y = 0,0083x + 0,0095$  ( $\text{Гцис}$ ). Во всех случаях коэффициент корреляции составлял  $>0,99$  ( $p < 0,0001$ ), из чего можно сделать вывод о том, что матричный эффект не влияет на определение данным методом. Воспроизводимость инъекции (CV) составляла для соотношений аналит/ПА и  $s_{\text{Цис}}/s_{\text{Гцис}}$  менее 5%, а по площадям пиков  $s_{\text{Цис}}$  и  $s_{\text{Гцис}}$  8 и 12%.

Для определения предела количественного определения  $s_{\text{Гцис}}$  было использовано два образца плазмы. Один образец прошел полную пробоподготовку, вто-

рой был дериватизирован не подвергаясь восстановлению (т.е. содержал следовые количества Гцис). Первый образец был разбавлен вторым в 2, 4 и 8 раз. В последнем случае концентрация  $s_{\text{Гцис}}$  составляла 0,8 мкМ и  $S/N = 7$ . Так как среднее содержание  $s_{\text{Гцис}}$  составляет более 5 мкМ [1, 29, 30], то  $S/N$  для этого уровня составит более 40, что вполне достаточно для его достоверного определения и расчета  $s_{\text{Цис}}/s_{\text{Гцис}}$ .

Правильность для  $s_{\text{Гцис}}$  при его добавлении к фильтрату плазмы на уровне 2,0 и 10 мкМ составляла  $108 \pm 17$  и  $94 \pm 14\%$  соответственно. Для  $s_{\text{Цис}}$  —  $107 \pm 26\%$  при добавке 10 мкМ и  $96 \pm 10\%$  при добавке 75 мкМ соответственно.

Средние концентрации (и размах)  $s_{\text{Цис}}$  и  $s_{\text{Гцис}}$  в 19 образцах плазмы крови составили  $132 \pm 35$  (70—182) и  $5,7 \pm 2,7$  (1,9—13,3) мкМ соответственно. Общее содержание Цис и Гцис составляло  $185 \pm 32$  (130—244) и  $8,8 \pm 2,8$  (5,2—16,2) мкМ соответственно. Эти значения находятся в пределах, опубликованных ранее для здоровых людей [1, 25]. Среднее отношение  $o_{\text{Цис}}/o_{\text{Гцис}}$  и  $s_{\text{Цис}}/s_{\text{Гцис}}$  со-

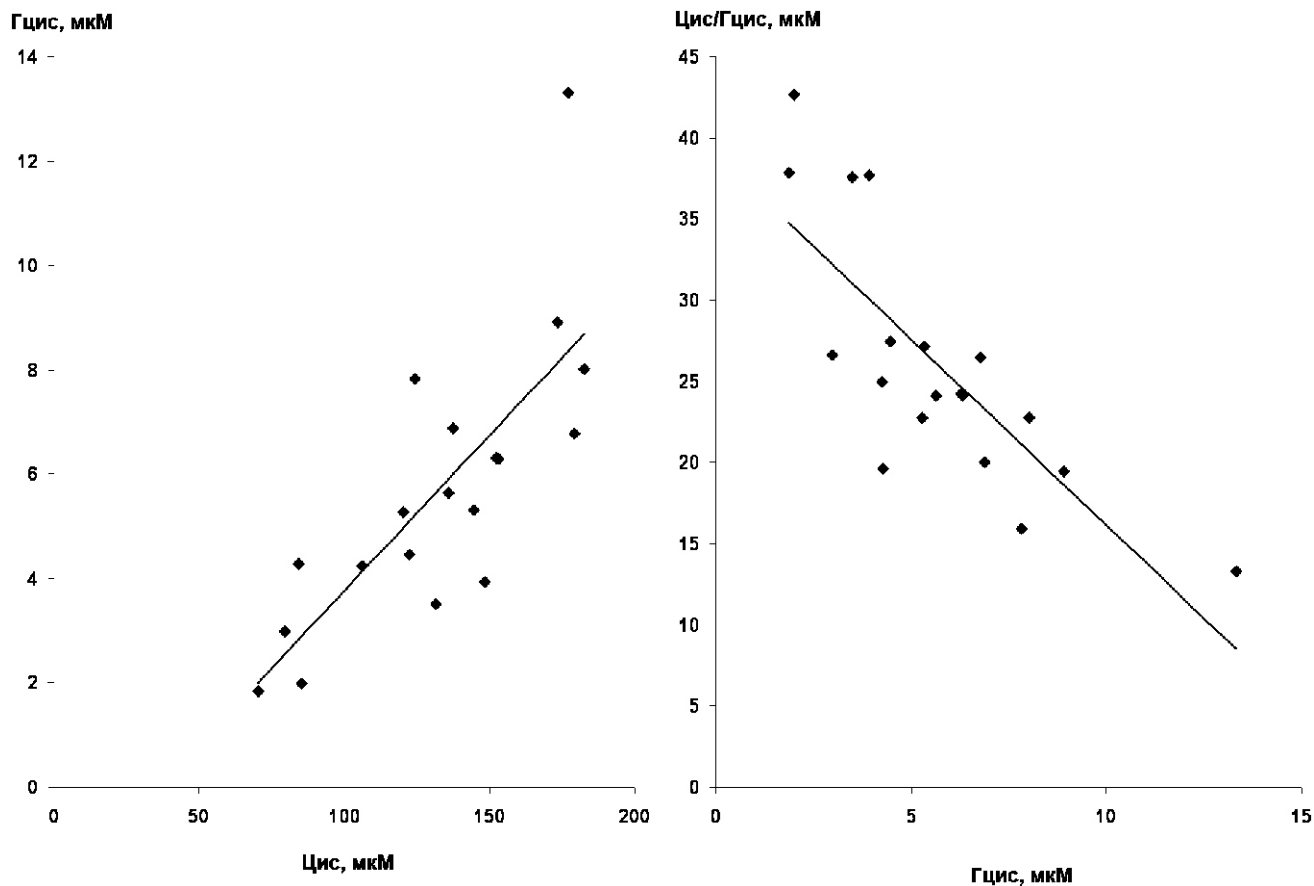


Рис. 2. Концентрационные зависимости белок-связанных аминокислот в образцах плазмы крови (N = 19). А — Цис и Гцис, Б — Гцис и Цис/Гцис.

ставляло  $22,5 \pm 5,3$  (7,6—30,2) и  $26 \pm 8$  (13—43) соответственно, что близко к значениям, ранее полученным для соотношения  $o\text{Цис}/o\text{Гцис}$  [6]. Соотношение  $c\text{Цис}/c\text{Гцис}$  отличается меньшим разбросом ( $CV = 31\%$ ), чем  $c\text{Гцис}$  ( $CV = 47\%$ ), но большим, чем  $o\text{Цис}/o\text{Гцис}$  ( $CV = 24\%$ ). Между  $c\text{Цис}$  и  $c\text{Гцис}$  найдена существенная положительная корреляция (рис. 2А,  $r = 0,77$ ,  $p < 0,001$ ), а между  $c\text{Гцис}$  и  $c\text{Цис}/c\text{Гцис}$  — отрицательная (рис. 2Б,  $r = -0,79$ ,  $p < 0,001$ ). Аналогичные результаты были получены при сравнении  $o\text{Цис}$  с  $o\text{Гцис}$  ( $r = 0,77$ ,  $p < 0,001$ ) и  $o\text{Гцис}$  с  $o\text{Цис}/o\text{Гцис}$  ( $r = -0,819$ ,  $p < 0,001$ ), что согласуется с результатами, полученными ранее на выборке значительно большего объема [6]. Также выявлена ещё более тесная корреляция между  $c\text{Гцис}$  и  $c\text{Гцис}/c\text{Цис}$  ( $r = 0,86$ ,  $p < 0,001$ , данные не приведены), но её не обнаружено между  $c\text{Цис}$  и  $c\text{Цис}/c\text{Гцис}$  ( $r = -0,41$ , данные не приведены). Аналогичные результаты были получены при сравнении общего содержания тиолов ( $o\text{Гцис}$  vs.  $o\text{Цис}/o\text{Гцис}$ :  $r = 0,83$ ,  $p < 0,001$ ;  $o\text{Цис}$  vs.  $o\text{Цис}/o\text{Гцис}$ :  $r = -0,25$ ).

Таким образом, используя представленный подход КЭ-УФ можно проводить определение связанных форм Цис и Гцис. Показано что отношение  $c\text{Цис}/c\text{Гцис}$  характеризуется теми же закономерностями, что и  $o\text{Цис}/o\text{Гцис}$ . Оно имеет довольно высокую степень корреляции с уровнем  $c\text{Гцис}$  и характеризуется меньшей вариабельностью, что дает дополнительные основания использовать его в качестве альтернативы определению  $o\text{Гцис}$  для оценки риска развития осложнений сердечно-сосудистых заболеваний.

Поскольку связанные тиолы находятся в окисленной форме, то необходимо перед дериватизацией использовать восстановитель. В этой роли больше всего подходят реагенты тиольного ряда, так как производные фосфинов или  $\text{NaBH}_4$  сильно снижают эффективность ЭВ. Показано, что закономерности, характерные для их общего содержания также справедливы и для связанных форм этих анализов. Чтобы выделить белки плазмы мы применили ультрафильтрацию, но возможно также использование геле-фильтрации. Благодаря рН-зависимому концентрированию анализов и разделительной способности КЭ число теоретических тарелок при использовании данного подхода составило 65 000. Также следует отметить, что, в отличие от ранее предложенного метода ВЭЖХ-УФ [23], здесь не требуется использовать ТФЭ, так как селективная очистка происходит на этапе ультрафильтрации и ЭИ. При этом чувствительность методов оказалось сопоставимой, что бывает редко при сравнении ВЭЖХ и КЭ.

## References

1. Williams R.H., Maggiore J.A., Reynolds R.D., Helgason C.M. Novel approach for the determination of the redox status of homocysteine and other amino thiols in plasma from healthy subjects and patients with ischemic stroke. *Clin. Chem.* 2001; 47(6): 1031-1039.
2. Newton L.A., Sandhu K., Livingstone C., Leslie R., Davis J. Clinical diagnostics for homocysteine: a rogue amino acid? *Exp. Rev. Mol. Diagn.* 2010; 10(4): 489-500.
3. McCully K.S. Chemical pathology of homocysteine. IV. Excitotoxicity, oxidative stress, endothelial dysfunction, and inflammation. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 2009; 39(3): 219-232.
4. Sengupta S., Wehbe C., Majors A.K., Ketterer M.E., DiBello P.M., Jacobsen D.W. Relative roles of albumin and ceruloplasmin in the formation of homocystine, homocysteine-cysteine-mixed disulfide, and cystine in circulation. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(50): 46896-46904.
5. Zhloba A.A., Subbotina T.F. Homocysteinylation score of high-molecular weight plasma proteins. *Amino Acids.* 2014; 46(4): 893-899.
6. Hortin G.L., Sullivan P., Csako G. Relationships among plasma homocysteine, cysteine, and albumin concentrations: potential utility of assessing the cysteine/homocysteine ratio. *Clin. Chem.* 2001; 47(12): 1121-1124.
7. Miller J.W., Beresford S.A., Neuhaus M.L., Cheng T.Y., Song X., Brown E.C., Zheng Y., Rodriguez B., Green R. and Ulrich C.M. Homocysteine, cysteine, and risk of incident colorectal cancer in the Women's Health Initiative observational cohort. *Am. J. Clin. Nutr.* 2013; 97(4): 827-834.
8. Pernet P., Lasnier E. and Vaubourdolle M. Evaluation of the AxSYM homocysteine assay and comparison with the IMx homocysteine assay. *Clin. Chem.* 2000; 46(9): 1440-1441.
9. Andersson A., Isaksson A., Brattstrom L., Hultberg B. Homocysteine and other thiols determined in plasma by HPLC and thiol-specific postcolumn derivatization. *Clin. Chem.* 1993; 39(8): 1590-1597.
10. Katrusiak A.E., Paterson P.G., Kamencic H., Shoker A., Lyon A.W. Pre-column derivatization high-performance liquid chromatographic method for determination of cysteine, cysteinyl-glycine, homocysteine and glutathione in plasma and cell extracts. *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* 2001; 758(2): 207-212.
11. Kusmierk K. and Bald E. Reversed-phase liquid chromatography method for the determination of total plasma thiols after derivatization with 1-benzyl-2-chloropyridinium bromide. *Biomed. Chromatogr.* 2009; 23(7): 770-775.
12. Wada M., Kuroki M., Minami Y., Ikeda R., Sekitani Y., Takamura N., Kawakami S., Kuroda N. and Nakashima K. Quantitation of sulfur-containing amino acids, homocysteine, methionine and cysteine in dried blood spot from newborn baby by HPLC-fluorescence detection. *Biomed. Chromatogr.* 2014; 28(6): 810-814.
13. Zinellu A., Sotgia S., Scanu B., Pisanu E., Sanna M., Sati S., Deiana L., Sengupta S. and Carru C. Determination of homocysteine thiolactone, reduced homocysteine, homocystine, homocysteine-cysteine mixed disulfide, cysteine and cystine in a reaction mixture by overimposed pressure/voltage capillary electrophoresis. *Talanta.* 2010; 82(4): 1281-1285.
14. Baron M. and Sochor J. Estimation of thiol compounds cysteine and homocysteine in sources of protein by means of electrochemical techniques. *Int. J. Electrochem. Sci.* 2013; 8: 11072-11086.

15. Jiang Z., Liang Q., Luo G., Hu P., Li P., Wang Y. HPLC-electrospray tandem mass spectrometry for simultaneous quantitation of eight plasma amino thiols: application to studies of diabetic nephropathy. *Talanta*. 2009; 77(4): 1279-1284.
16. Ivanov A.V., Luzyanin B.P. and Kubatiev A.A. S-Adenosylhomocysteine Assay in the Urine by Capillary Electrophoresis. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2012; 152(3): 289-292.
17. Russell J. and Rabenstein D.L. Speciation and quantitation of underivatized and Ellman's derivatized biological thiols and disulfides by capillary electrophoresis. *Anal. Biochem.* 1996; 242(1): 136-144.
18. Ivanov A.R., Nazimov I.V. and Baratova L. A. Determination of biologically active low-molecular-mass thiols in human blood. II. High-performance capillary electrophoresis with photometric detection. *J. Chromatogr. A*. 2000; 895(1-2): 167-171.
19. Sevcikova P., Glatz Z. and Tomandl J. Determination of homocysteine in human plasma by micellar electrokinetic chromatography and in-capillary detection reaction with 2,2'-dipyridyl disulfide. *J. Chromatogr. A*. 2003; 990(1-2): 197-204.
20. Kubalczyk P., Bald E., Furmaniak P. and Glowacki R. Simultaneous determination of total homocysteine and cysteine in human plasma by capillary zone electrophoresis with pH-mediated sample stacking. *Anal. Methods*. 2014; 6: 4138-4143.
21. Chang C.W. and Tseng W.L. Gold nanoparticle extraction followed by capillary electrophoresis to determine the total, free, and protein-bound amino thiols in plasma. *Anal. Chem.* 2010; 82(7): 2696-2702.
22. Amarnath K., Amarnath V., Amarnath K., Valentine H.L., Valentine W.M. A specific HPLC-UV method for the determination of cysteine and related amino thiols in biological samples. *Talanta*. 2003; 60(6): 229-238.
23. Hoque M.E., Arnett S.D. and Lunte C.E. On-column preconcentration of glutathione and glutathione disulfide using pH-mediated base stacking for the analysis of microdialysis samples by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2005; 827(1): 51-57.
24. Ivanov A.V., Luzyanin B.P., Virus E.D., Kubatiev A.A. *Pathogenes*. 2013; 11(4): 49-53. (in Russian)
25. Hortin G.L., Seam N., Hoehn G.T. Bound homocysteine, cysteine, and cysteinylglycine distribution between albumin and globulins. *Clin. Chem.* 2006; 52(12): 2258-2264.

#### Сведения об авторах:

Иванов Александр Владимирович, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории Регуляции агрегатного состояния крови ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Кучукова Мадина Юсуповна, кандидат медицинских наук, врач-терапевт отделения акушерства и гинекологии Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Городской клинической больницы им. С.П. Боткина»

Вирюс Эдуард Даниелевич, кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории Функциональной ангиопротеомики и метабомики ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Зурина Ирина Михайловна, научный сотрудник лаборатории Клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Лузянин Борис Петрович, профессор, доктор химических наук, заведующий лабораторией Функциональной ангиопротеомики и метабомики ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Кубатиев Аслан Амирханович, академик, профессор, доктор медицинских наук, научный руководитель ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»