

МЕТОДИ

УДК 616.438-008.931:577.152.-02:[615.31:547.857.3]-092.9

МЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ ЕНДОГЕННОГО ФОРМАЛЬДЕГІДУ В ОРГАНІЗМІ ТВАРИН

С. Г. ШАНДРЕНКО, М. М. САВЧУК, М. П. ДМИТРЕНКО

Інститут біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: shandrenko@biochem.kiev.ua

Розроблено метод оцінки рівня ендogenous формальдегіду (ФА). Метод базується на введенні тваринам розчину димедону, який в організмі зв'язує вільний ФА у стабільний комплекс – формалдимедон, з подальшим визначенням вмісту цього комплексу у біологічних зразках флуоресцентним методом. Розроблений метод апробовано на моделях модифікованого обміну ФА щурів. Різним групам тварин перорально вводили водні розчини ФА (10 мг/кг); метиламіну – субстрату ФА-генеруючого ензиму семікарбазидчутливої аміноксидази SSAO, (250 мг/кг); семікарбазиду – інгібітора SSAO, (200 мг/кг). Кількість зв'язаного ФА у зразках тканини печінки відповідно до вищенаведених дослідних груп тварин була: $7,5 \pm 1,5$ мкг/кг; $5,4 \pm 0,9$ мкг/кг; $2,4 \pm 0,7$ мкг/кг; для контрольної групи – $4,2 \pm 1,4$ мкг/кг. Одержані результати свідчать, що запропонований метод дозволяє коректно оцінювати кількість ендogenous ФА.

Ключові слова: формальдегід, димедон, формалдимедон, метиламін, семікарбазид.

Як відомо, формальдегід (ФА) має генотоксичні, мутагенні, імуногенні і онкогенні властивості [1]. Зараз активно досліджуються його нейротоксичні властивості [2], підсилюється зацікавленість до можливої ролі ендogenous ФА та семікарбазидчутливої аміноксидази (SSAO) – ензиму, що його генерує, в патогенезі діабету [3], артеріосклерозу [4], серцево-судинних захворювань [5]. Патогенні властивості ФА обумовлені його здатністю легко алкілувати аміногрупи амінокислот і азотистих основ нуклеїнових кислот з утворенням гідроксиметильних аддуктів і метиленових зшивок у макромолекулах та між ними, включаючи ДНК-гістонові зшивки.

Існують різні причини появи вільного ФА в організмі: надходження з оточуючого середовища, біотрансформація ряду ксенобіотиків і фармпрепаратів, катаболізм деяких інтермедіатів і фізіологічно активних сполук, а також як побічний наслідок функціонування в організмі «одновуглецевого циклу» [6].

Серед великої кількості методів визначення концентрації ФА в оточуючому середовищі деякі адаптовані для біологічних зразків. Найпоширенішим є метод, що оснований на реакції ФА та 2,4-динітрофенілгідразину з утворенням гідразону, кількісний аналіз яко-

го проводиться методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) або газовою хроматографією [7, 8]. ФА в лужному середовищі в реакції з реактивом пурпалд (4-аміно-3-гідразин-5-меркапто-1,2,4-триазол) утворює забарвлений продукт фіолетового кольору ($\lambda_{\text{погл.}} = 550$ нм) [9]. У кислому середовищі при підвищеній температурі ФА в реакції із хромотропною кислотою (4,5-дигідроксинафталін-2,7-дисульфокислота) утворює комплекс малинового кольору ($\lambda_{\text{погл.}} = 570$ нм) [10]. Популярним є метод, розроблений дослідником Т. Nash [11], в якому ФА в реакції з ацетил-ацетоном у присутності іонів амонію утворює 3,5-диоктил-1,4-дигідролутидин, кількісний аналіз якого проводиться флуоресцентним ($\lambda_{\text{ex}} = 370$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 470$ нм) або фотометричним ($\lambda_{\text{погл.}} = 412$ нм) методами. У сучасній модифікації цього методу кількість кінцевого продукту реакції визначається у проточній системі із флуоресцентною детекцією [12]. Для визначення концентрації ФА використовують глутатіон- та NAD^+ -залежну формальдегіддегідрогеназу, яка трансформує ФА до S-формілглутатіону [13]. Опубліковано імуноензимний метод визначення антитіл IgE та IgG до ФА, кон'югованого з альбуміном [14]. Одним з перспективних напрямів роз-

робки методів визначення концентрації ФА у біологічних зразках є використання комплексу до альдегідів – 5,5-диметилциклогексан-1,3-діону (димедону). Останній утворює із ФА стабільний комплекс – формалдимедон, концентрацію якого визначають за допомогою ВЕРХ [15] або флуоресцентним методом у проточній системі [16].

Вищенаведеними методами визначають концентрацію ФА у зразках (кров, тканини органів, сеча, слина) в умовах *in vitro*, тобто після забору біологічного матеріалу. ФА є відносно стабільною сполукою, однак, у біологічному середовищі він хімічно активний. З великою швидкістю він реагує з аміногрупами амінокислот з утворенням метильних похідних, азотистими основами нуклеїнових кислот, глутатионом та цистеїном, катаболізується формальдегіддегідрогеназою. Зміни у метаболізмі, що відбуваються під час забою тварин і підготовці біоматеріалу, можуть суттєво впливати на вміст в ньому ФА. Тому визначена в умовах *in vitro* концентрація ФА у біологічних зразках може відрізнятися від його справжнього ендogenous рівня, що призводить до некоректної оцінки стану обміну ФА в організмі. На користь даного припущення свідчать експериментальні роботи [17–19]. Так, при інгаляційній експозиції тварин (щурів, мавп) у збагаченому ФА (14,4 ppm) газовому середовищі протягом 2 год, визначена в умовах *in vitro* концентрація вільного ФА (у зразках крові та тканині органів) не відрізнялася від цього показника у контрольній групі тварин. Аналогічні результати одержані у дослідженнях із добровольцями, які протягом 40 хв вдихали повітря з ФА (1,8 ppm) [18].

Для коректної оцінки обміну ФА в організмі необхідно використовувати методи, що наближені до умов *in vivo*. Прикладом такого підходу є робота [20], в якій для визначення ендogenous рівня ФА тваринам вводили мічений димедон (^{14}C) та у зразках крові радіометричним методом визначали комплекс ФА-димедон.

Метою даної роботи була розробка нового методу визначення інтенсивності утворення ФА в організмі з використанням неміченого димедону.

Матеріали та методи

Дослідження проводили на щурах самця лінії Wistar масою 220–240 г, раціон харчування яких складався із концентрованого гранульованого комбікорму.

Тварини були розподілені на 4 групи по 6 у кожній: № 1 – контрольна; щурам інших груп вводили одноразово перорально наступні сполуки: № 2 – водний розчин ФА в дозі 10 мг/кг за 40 хв до забою; № 3 – водний розчин метиламіну в дозі 250 мг/кг за 2 год до забою; № 4 – водний розчин семікарбазиду в дозі 200 мг/кг за 2 год до забою. За 30 хв до завершення експерименту всім тваринам вводили внутрішньоочеревинно 1% розчин димедону на фізіологічному розчині в дозі 100 мг/кг.

Щурів виводили з експерименту декапітацією під ефірним наркозом. Для проведення аналізу відбирали зразки тканини печінки.

Для солюбілізації формалдимедону тканини печінки гомогенізували в 1% водному розчині аміаку у співвідношенні 1 : 6, протеїни видаляли після денатурації $\text{Ba}(\text{OH})_2/\text{Zn}(\text{SO})_4$ центрифугуванням. До 1 мл супернатанту додавали 0,2 мл 5% оцтової кислоти та 0,5 мл 30% розчину оцтовокислого амонію, доведеного до рН 5,5 оцтовою кислотою. Одержані зразки тримали протягом 20 хв на киплячій водяній бані, після чого їх швидко охолоджували. Інтенсивність флуоресценції визначили на флуориметрі FL800 (Biotek, США) при $\lambda_{\text{ex}} = 360$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 420$ нм. Для калібровки використовували стандартні розчини формалдимедону.

Статистичну обробку проводили у програмі Statistica, достовірність змін оцінювали за *t*-критерієм Стьюдента.

Результати та обговорення

Розробка методу. Загальна хімічна схема методу представлена на рис. 1. Як видно, димедон в умовах *in vivo* зв'язує вільний ФА та, у подальшому, концентрація продукту визначається *in vitro* у біологічних зразках.

Водорозчинний димедон у разі внутрішньоочеревинного введення тваринам швидко розподіляється по тканинам різних органів. У реакції з вільним ФА він утворює формалдимедон (ФД) (рис. 1), що є стабільною за фізіологічних умов сполукою з гідрофобними властивостями, за рахунок чого накопичується у клітинах та тканинах організму, а інтенсивність утворення його характеризує рівень ФА. Враховуючи гідрофобність ФД, його екстракція з біологічних зразків органічними розчинниками здається логічною. З цією метою в роботі [20] використовували толуол, а в роботах [21, 22] – хлороформ. Ми провели модельні

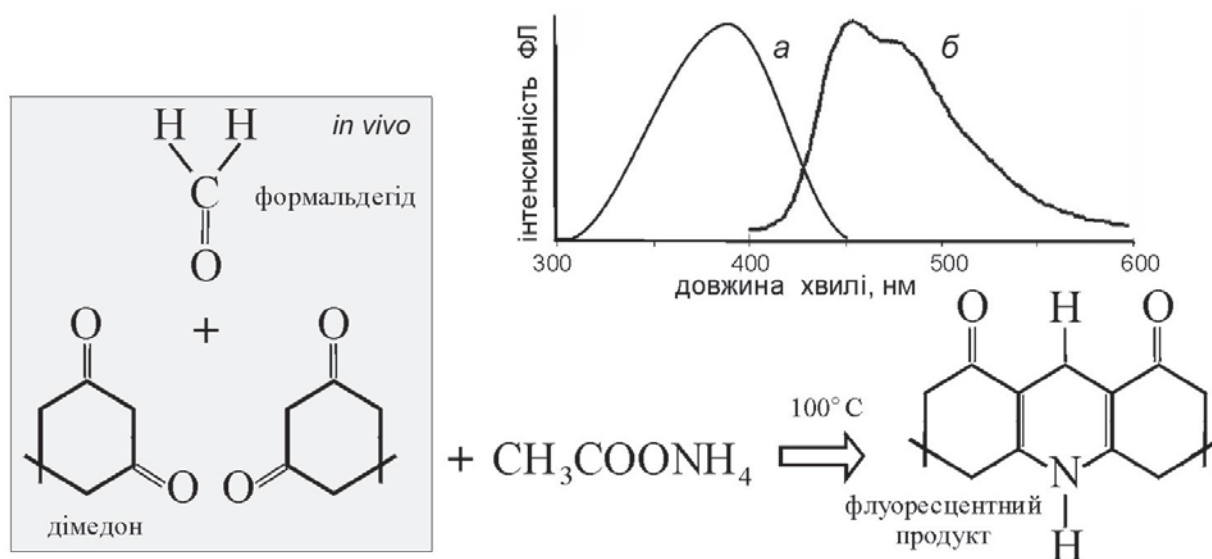


Рис 1. Хімічна схема методу визначення концентрації формальдегіду в організмі тварин та спектр флуоресценції кінцевого продукту: а – спектр збудження при $\lambda_{em} = 460$ нм; б – спектр емісії при $\lambda_{ex} = 380$ нм

дослідження, в яких до розчинів фосфатного буфера (1 мМ, рН 7,4) та зразків гомогенату печінки інтактних щурів на цьому буфері (1 : 6) додавали розчини димедону та ФА до кінцевих концентрацій 2 та 0,2 мМ відповідно; через 30 хв утворений ФД елюювали толуолом або хлороформом (1 : 1); розчинник випарювали під вакуумом; до сухого залишку додавали 1 мл 20% розчину оцтовокислого амонію, доведеного до рН 5,5 оцтовою кислотою; витримували зразки у закритих скляних пробірках на киплячій водяній бані 20 хв та, після їхнього охолодження, визначали кількість утвореного флуоресцентного продукту. Результати показали, що у зразках фосфатного буфера ефективність елюювання ФД, що утворився, склала 90–95% від розрахункової кількості, в той час як у зразках гомогенату печінки вона дорівнювала тільки 21–28%, що свідчить про вкрай низьку ефективність елюювання ФД органічними розчинниками із біологічних зразків.

У лужному середовищі ФД набуває гідрофільних властивостей, що було використано в нашій методиці. У вищенаведеному прикладі до 1 мл модельного зразка гомогенату печінки з димедоном та ФА додавали 0,2 мл 10% аміаку та витримували 10 хв при періодичному перемішуванні. Після центрифугування до 0,5 мл супернатанту додавали 0,5 мл розчину, що містив оцтовокислий амоній/оцтову кислоту та після процедури одержання флуоресцентного продукту, визна-

чали його як описано вище. Ефективність такого підходу була на рівні 90–95%.

ФД за високої температури у присутності джерела азоту утворює комплекс, що має в хімічній структурі піридинове кільце із флуоресцентними властивостями (рис. 1). Ми дослідили оптимальні умови утворення флуоресцентного кінцевого продукту. Результати дослідження, що представлені на рис. 2, показали залежність інтенсивності флуоресценції від рН розчину оцтовокислого амонію, підведеного до необхідного значення рН оцтовою кислотою. Встановлено, що оптимальний діапазон рН знаходиться в інтервалі значень від 5 до 6.

Залежність інтенсивності флуоресценції модельних зразків від часу утримання зразків на киплячій водяній бані наведено на рис. 3. Як видно, оптимальний час дорівнює 20 хв. Внаслідок більш тривалого прогрівання зразків суттєво зменшується приріст інтенсивності флуоресценції ($\Delta I/\Delta t$) та збільшується приріст частки фонові флуоресценції ($\Delta(I_0/I)/\Delta t$).

У роботі [16] для підвищення чутливості визначення концентрації ФД використана спеціально побудована проточна нагрівальна система, що дозволило прогріти зразки до температури 110°C . У власних дослідженнях ми порівняли інтенсивність флуоресценції кінцевого продукту при прогріві модельних зразків на киплячій водяній бані та при температурі 110°C (у закритих скляних пробірках на масляній бані). Більш висока тем-

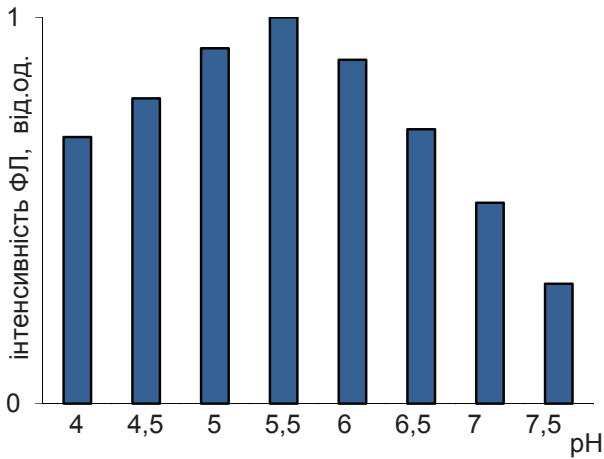


Рис. 2. Залежність інтенсивності флуоресценції кінцевого продукту ФД від рН 1,2 М буфера, що містив оцтовокислий амоній–оцтову кислоту

пература дозволила збільшити інтенсивність флуоресценції на 30%, але, враховуючи певні технічні складності нагрівання зразків до 110 °С та достатню високу для реєстрації концентрацію ендогенного рівня ФА, ми залишили у розробленій методиці прогрівання зразків на киплячій водянній бані.

Відомо, що інші альдегіди, наприклад ацетальдегід, пропаналь, бутаналь, також конденсуються з димедоном, утворюючи за певних умов комплекс з піридиновим кільцем, що має відповідні флуоресцентні властивості. Однак у роботах, наприклад [16], робиться наголос, що саме формальдегід є основним комплексоутворювачем із димедоном. Ми порівняли кількість утвореного флуоресцентного продукту при взаємодії димедону із ФА та ацетальдегідом, що були окремо внесені у рівних концентраціях (50 мкМ) у розчини фосфатного буфера та гомогенату печінки. Після проведення процедури одержання флуоресцентного комплексу димедону з альдегідами, визначена інтенсивність флуоресценції зразків з ацетальдегідом не перевищувала 18% від зразків з ФА. Тому за умов, коли не відбувається гіперпродукція ацетальдегіду в організмі (наприклад, при алкогольній інтоксикації), можна вважати, що основний внесок у параметр, що визначається, робить саме формальдегід.

Димедон, як комплексон ФА, в організмі конкурує з ендогенними акцепторами ФА. Утворений комплекс ФД певний проміжок часу, що визначається терміном від введення димедону до закінчення дослідження, а також швидкістю його розповсюдження, накопичується у тканині органів. Його сумарна концентрація

характеризує кількість вільного ендогенного ФА та швидкість його утворення в організмі.

Чутливість методу визначення концентрації ФА у воді сягає одиниць нМ, але враховуючи інтенсивність «фонові» флуоресценції біологічних зразків реальна чутливість методу зменшується майже на 3 порядки та становить одиниці мкМ. Залежність інтенсивності флуоресценції кінцевого продукту від концентрації ФА має лінійний характер у широкому діапазоні до 500 мкМ.

Опис процедури проведення розробленого методу визначення ендогенної концентрації формальдегіду у дослідних тварин наведено у розділі матеріали та методи.

Використання методу. Ефективність розробленого методу перевірили на декількох моделях модифікації ендогенного рівня ФА у щурів. Результати дослідження наведені в таблиці. Визначена концентрація ФА у тканині печінки інтактних щурів відповідає результатам, що опубліковані іншими дослідниками, наприклад у роботі [17]. При пероральному введенні щурам розчину ФА (10 мг/кг) зареєстровано збільшення на 78% його концентрації у тканині печінки (таблиця). Ми вважаємо, що ці зміни вдалося зафіксувати саме завдяки зв'язуванню ФА у стабільний комплекс в умовах *in vivo*. Використання методів *in vitro* не дозволило визначити приріст вмісту ФА у біологічних зразках на аналогічних дослідних моделях навантаження тварин ФА [17–19].

Одним із джерел вільного ФА в організмі є реакція, що каталізується SSAO, та утворює ФА із метиламіну – інтермедиату катаболізму

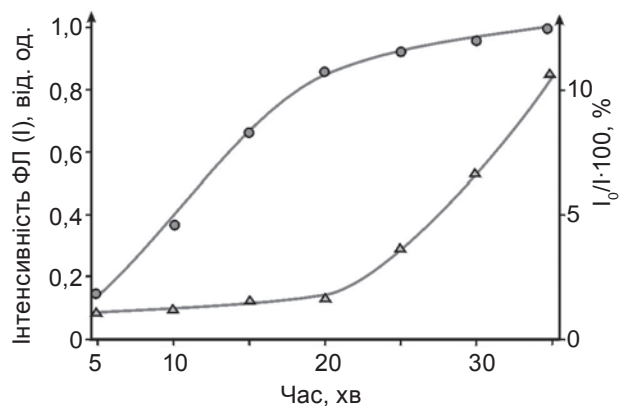


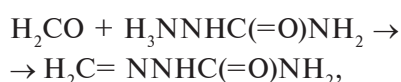
Рис. 3. Залежність інтенсивності флуоресценції кінцевого продукту I (●) та частинки фонові флуоресценції I_0/I (▲) від часу прогрівання на киплячій водянній бані. Концентрації основних компонентів: 2 мМ димедону, 0,2 мМ ФА, рН 5,5

Концентрація формальдегіду, що зв'язаний у комплекс з димедоном, у зразках тканини печінки на моделях модифікації його обміну

Групи тварин	Концентрація ФА, мкг/г	% змін
№1 – контроль	4,2 ± 1,4	0
№2 – формальдегід	7,5 ± 1,5*	+78%
№3 – метиламін	5,4 ± 0,9*	+28%
№4 – семікарбазид	2,4 ± 0,7*	-57%

* Статистично достовірна різниця ($P < 0,05$) в порівнянні з групою №1

креатину, фосфатидилхоліну, адреналіну та деяких ксенобіотиків [6]. Ми використали розроблений метод на моделі модифікації обміну ФА в організмі шляхом введення субстрату або інгібітору SSAO. Так, при разовому пероральному введенні метиламіну рівень вільного ФА у зразках тканини печінки підвищився на 28%, а при разовому пероральному введенні семікарбазиду – інгібітору SSAO, цей параметр зменшився на 57% (таблиця). Таке значне зменшення кількості вільного ФА в організмі може бути обумовлено наявністю двох шляхів впливу семікарбазиду на обмін ФА. Один шлях, як зазначалося вище, здійснюється через інгібування SSAO. Інший шлях реалізується через здатність семікарбазиду зв'язувати ФА у комплекс, утворюючи семікарбазон:



та ефективно зменшувати його рівень в організмі.

Таким чином, розроблено метод визначення інтенсивності утворення ФА, що ґрунтується на фіксації вільного ФА у комплексі з димедоном в умовах *in vivo*, та подальшого визна-

чення цього стабільного комплексу у тканинах печінки в умовах *in vitro*. Запропонований метод дозволяє одержувати результат, що коректно відображає стан обміну ендogenous ФА та є адекватним до модифікації цього обміну.

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭНДОГЕННОГО ФОРМАЛЬДЕГИДА В ОРГАНИЗМЕ ЖИВОТНЫХ

С. Г. Шандренко, М. Н. Савчук,
Н. П. Дмитренко

Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев;
e-mail: shandrenko@biochem.kiev.ua

Разработан метод оценки уровня эндогенного формальдегида (ФА). Метод включает в себя введение животным раствора димедона, который в организме связывает свободный ФА в стабильный комплекс – формалдимедон, с последующим определением содержания этого комплекса в биологических образцах флуоресцентным методом. Разработанный метод апробирован на моделях модифицированного обмена ФА у крыс. Разным группам животных перорально вводили водные растворы ФА (10 мг/кг); метиламина – субстрата ФА-генерирующего энзима SSAO, (250 мг/кг); семікарбазиду – ингибитора SSAO, (200 мг/кг). Количество связанного в комплексе ФА в образцах печени соответственно к вышеуказанным группам было: 7,5 ± 1,5 мкг/кг; 5,4 ± 0,9 мкг/кг; 2,4 ± 0,7 мкг/кг; для контрольной группы – 4,2 ± 1,4 мкг/кг. Полученные результаты доказывают, что предлагаемый метод позволяет корректно оценить количество эндогенного ФА.

Ключевые слова: формальдегид, димедон, формалдимедон, метиламин, семікарбазид.

METHOD FOR ENDOGENOUS FORMALDEHYDE EVALUATION IN ANIMAL ORGANISM

S. G. Shandrenko, M. M. Savchyk,
M. P. Dmytrenko

Palladin Institute of Biochemistry, National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: shandrenko@biochem.kiev.ua

Summary

A method for endogenous formaldehyde (FA) level evaluation has been worked out. The method involves the administration of dimedone, which forms the stable complex with FA, and the determination of formaldimedone concentration in biological samples by the fluorescence approach. The method was tested on rat's models of FA metabolism modulation. Animals received FA (10 mg/kg); or methylamine - substrate of FA-generating enzyme SSAO, (250 mg/kg); or semicarbazide - SSAO inhibitor, (200mg/kg). Concentration of FA bound with dimedone in the liver tissue were, correspondingly: 7.5 ± 1.5 mkg/kg; 5.4 ± 0.9 mkg/kg; 2.4 ± 0.7 mkg/kg; control - 4.2 ± 1.4 mkg/kg. Obtained data indicate, that the elaborated method gives reliable information about FA level.

Key words: formaldehyde, dimedone, formaldimedone, methylamine, semicarbazide.

1. *Formaldehyde/* CICADS. – 2002. – 40.
2. *Songur A., Ozen O.A., Sarsilmaz M.* // *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* – 2010. – **203**. – P. 105–118.
3. *Obata T.* // *Life Sci.* – 2006. – **79**, N 5. – P. 417–422.
4. *Karadi I., Meszaros Z., Csanyi A. et al.* // *Clin. Chim. Acta.* – 2002. – **323**, N 1–2. – P. 139–146.
5. *Marinho C., Arduino D., Falcao L. M., Bicho M.* // *Rev. Port Cardiol.* – 2010. – **29**, N 1. – P. 37–47.
6. *Дмитренко Н. П., Холиан А.* // *Укр. біохім. журн.* – 2005. – **77**, № 1. – С. 22–40.
7. *Lyncha C., Lima C. K., Thomasa M., Peters T. J.* // *Clinica Chimica Acta.* – 1983. – **130**, N 1. – P. 117–122.
8. *Buckley K. E., Fisher L. J., MacKay V. G.* // *J. Agric. Food Chem.* – 1988. – **36**, N 6. – P. 1146–1150.
9. *Quesenberry M. S., Lee Y. C.* // *Analyt. Biochem.* – 1996. – **234**. – P. 50–55.
10. *Pretto, Milani M. R., Cardoso A. A.* // *J. Environ. Monit.* – 2000. – **2**. – P. 566–570.
11. *Nash T.* // *Biochem. J.* – 1953. – **55**. – P. 416–421.
12. *Lia Q., Sritharathikhuma P., Oshimaa M., Motomizu S.* // *Analytica Chimica Acta.* – 2008. – **612**, N 2. – P. 165–172.
13. *Kerr R. G., Kelly K.* // *J. Nat. Prod.* – 1999. – **62**. – P. 201–202.
14. *Thrasher J. D., Broughton A., Gard Z.* // *Am. J. Ind. Med.* – 1989. – **15**. – P.187–195.
15. *Zurek G., Karst U.* // *J. Chromatography A.* – 1999. – **864**, N 2. – P. 191–197.
16. *Sakai T., Tanaka S., Teshima N. et al.* // *Talanta.* – 2002. – **58**. – P. 1271–1278.
17. *Heck H., Casanova M.* // *Regul. Toxicol. Pharmacol.* – 2004. – **40**, N 2. – P. 92–106.
18. *Heck H., Casanova M., Dodd P. et al.* // *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* – 1985. – **46**, N 1. – P. 1–3.
19. *Casanova M., Heck H.D., Everitt J. L. et al.* // *Food Chem. Toxicol.* – 1988. – **26**, N 8. – P. 715–716.
20. *Szarvas T., Szatloczky E., Volford J. et al.* // *J. Radioanal. Nucl. Chem.* – 1986. – **106**. – P. 357–367.
21. *Методические рекомендации об определении свободного формальдегида в биосредах методом тонкослойной хроматографии// МЗ СССР.* – 1976. – № 1514–76.
22. *Husztli Z., Tyihak E.* // *FEBS Lett.* – 1986. – **209**, N 2. – P. 362–366.

Отримано 06.09.2011