



УДК 517.121/7.:615.9

© 2007

Н. П. Дмитренко, С. Г. Шандренко, Т. О. Кишко

Изучение возможности эндогенного синтеза формальдегида из креатина у людей в зависимости от их инфицированности Хеликобактером пилори

(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины Н. М. Гулой)

We have performed the clinical research involving the analysis of mouth cavity air probes for the content of ammonium and formaldehyde after oral consumption of carbamide and creatine, accordingly. It has been found that 25 percents of volunteers with positive urease test, that indicates the Helicobacter pylori infection, had increased level of formaldehyde in air probes. Analysis of the reciprocal relations of ammonium and formaldehyde generation rates shows the possibility to form hexamethylenetetramine (urotropine) in human stomach with the Helicobacter pylori infection.

Креатин является субстратом креатинкиназной системы, которая осуществляет в клетке депонирование и транспорт энергии в виде креатинфосфата (КрФ) от источников ее образования к местам использования. Креатинкиназная система особенно выражена в мышечных волокнах и нервных клетках и исключительно важна для их функции. Поэтому креатин в качестве эргогенной диетической добавки приобрел большую популярность среди спортсменов для стимуляции нервной деятельности и наращивания объема и силы мышц, особенно в трех видах спорта, которые требуют быстрого высвобождения больших количеств энергии (легкая и тяжелая атлетика, борьба, боевые искусства, плавание, игры и др). Используемые дневные дозы креатина зачастую достигают 15–20 г — количество, содержащееся примерно в 3–4 кг сырого мяса [1]. Длительное применение таких высоких доз креатина приводит к подавлению его биосинтеза, на который обычно в организме расходуется больше метильных групп s-аденозилметионина, чем на все другие процессы метилирования [2, 3]. Поэтому последние в условиях потребления креатина должны активизироваться, и это может вызвать нежелательные побочные эффекты. В частности, накопление полиаминов в цитотоксических количествах, связанное с индукцией s-аденозилметионин декарбоксилазной активности [4], и усиление метилирования аргининовых остатков в гистонах, что приводит к накоплению в клетках в результате протеолиза свободных N-метиларгининов.

Эти соединения, являясь сильными ингибиторами NO-синтазы, могут привести к патологическим состояниям, которые обуславливают снижение синтеза NO [5], а также подвергаются ферментативному расщеплению с образованием метиламина и диметиламина, служащих эндогенными источниками формальдегида [6]. Активация реакций метилирования также должна увеличить сопряженное с ними образование свободного формальдегида [7]. Гиперпродукция формальдегида представляет опасность в силу его способности образовывать поперечные сшивки с белками и ДНК, а также осуществлять генотоксическое, мутагенное и цитотоксическое действия [8]. Потребление креатиновой добавки вызывает значительное увеличение экскретируемого с мочой метиламина и формальдегида [9]. Это подтверждает гипотезу [10] о возможности катаболизма креатина в организме путем образования метиламина и его расщепления при участии семикарбазид чувствительной аминоксидазы на пероксид водорода, аммиак и формальдегид. Такой путь катаболизма вряд ли возможен в клетках и тканях млекопитающих из-за отсутствия некоторых ферментов, в частности креатина амидиногидролазы, катализирующей его начальный этап, но весь необходимый спектр этих ферментов имеется у микроорганизмов [3, 11]. Известно, что свыше 50% населения земного шара инфицированы бактериями *Helicobacter pylori* (НР), которые локализуются в слизистом слое желудка и рассматриваются как одна из основных причин развития гастрита, язвенной болезни и рака желудка [12, 13]. Возможно, что патогенность бактерий НР тесно связана с их способностью в процессе жизнедеятельности вырабатывать формальдегид из определенных соединений, которые поступают в желудок. Креатин в этом отношении представляется особенно опасным потому, что используется в высоких дозах и плохо всасывается.

Целью настоящей работы было выяснение возможности образования формальдегида из креатина в желудке людей в зависимости от их инфицированности геликобактером пилори.

Материалы и методы. В исследовании принимали участие 95 добровольцев (мужчин и женщин) в возрасте от 25 до 50 лет, которые были разделены на две группы. Все исследования проводились утром натощак.

Испытуемые первой группы (84 человека) принимали 30 мл раствора, содержащего 1 г карбамида (мочевины) и 0,3 г креатина моногидрата (фирма “Perfect”, Бельгия) и ополаскивали ротовую полость, выпивая 20 мл воды. После приема препарата у испытуемого с помощью воздушного компрессора (производительностью 0,7 л/мин) отбирали воздух из ротовой полости и пропускали через водный раствор поглотителя (2 мл 0,1Н H₂SO₄), помещенный в пробирку. Каждый отбор воздуха проводили по 2 мин в отдельную пробирку с перерывами в 1 мин в течение 18 мин. В полученных таким образом шести образцах раствора поглотителя определяли концентрацию ионов аммония и формальдегида.

Испытуемые второй группы (11 человек) в первый день исследований принимали карбамид (1 г в 30 мл воды), а через 2–4 дня — креатин моногидрат (0,3 г в 30 мл воды) с последующим после приема препарата определением в образцах концентрации ионов аммония и формальдегида соответственно. Определяемые в поглощающих растворах концентрации аммония и формальдегида пересчитывали на объем воздуха, пропущенного через поглотитель за 2 мин и выражали как их концентрацию в образцах воздуха из ротовой полости ($\Delta\text{NH}_3/\text{м}^3$ или $\Delta\text{H}_2\text{CO}/\text{м}^3$).

Для определения концентрации ионов аммония к 1 мл исследуемого раствора добавляли 50 мкл 20% NaOH, и, после перемешивания, 50 мкл реактива Нестлера. Оптическую плотность определяли на спектрофотометре “Specord M40” при длине волны 490 нм. Для калибровки использовали растворы сернокислого аммония.

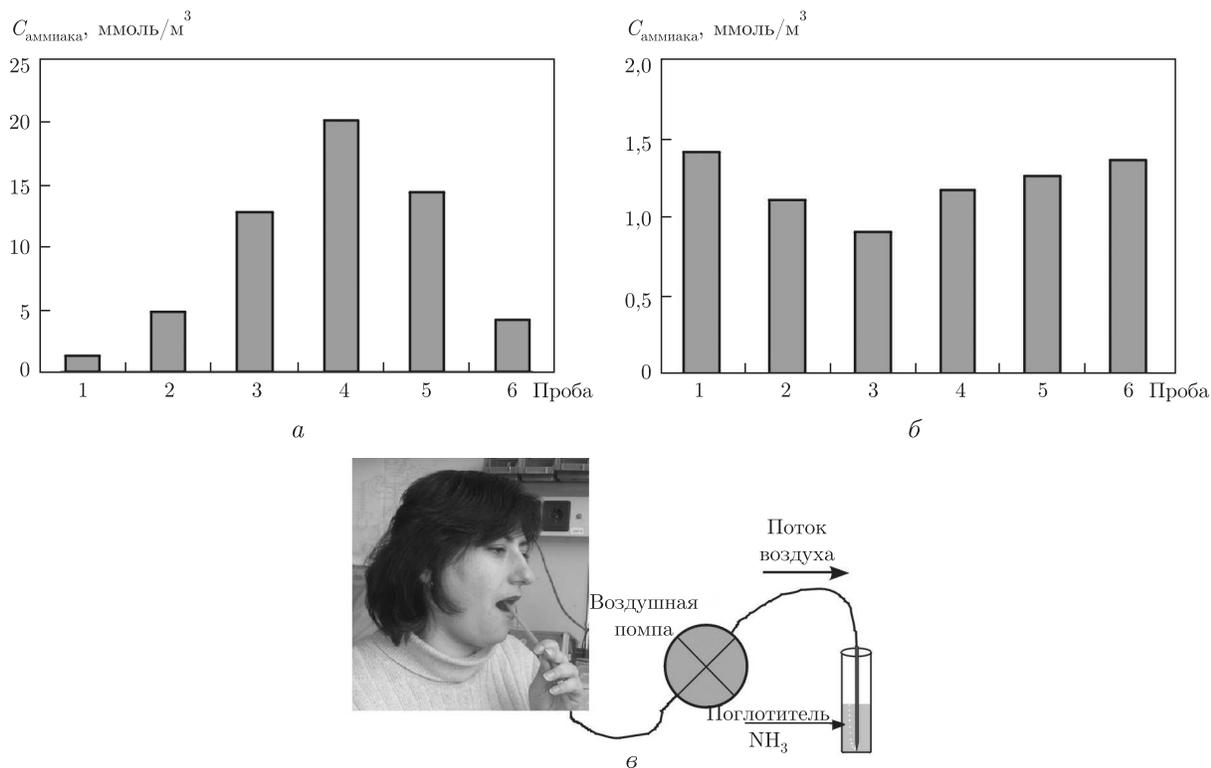


Рис. 1. Динамика изменений концентрации аммиака в пробах воздуха из ротовой полости после приема карбамида: *a* — положительный прирост концентрации (положительный результат теста); *б* — отсутствие прироста (отрицательный результат теста); *в* — схема эксперимента

Концентрацию формальдегида в растворе поглотителя определяли пурпальным методом [4] в нашей модификации: к 1 мл исследуемого образца добавляли 0,5 мл реактива 0,1% пурпальда в 2н NaOH. Через 15 мин добавляли 0,5 мл 0,07% NaIO₄ (периодата натрия). Для определения низких концентраций формальдегида оптическая плотность раствора измерялась на трех длинах волн: 490 нм (А), 550 нм (В), 650 нм (С). Методом векторной геометрии рассчитывали параметр — площадь треугольника ABC, который пропорциональный площади под кривой оптического поглощения формальдегида и не зависит от фонового поглощения раствора. Для калибровки использовали растворы формалина.

Результаты и их обсуждение. Динамика изменения концентрации аммония в воздухе из ротовой полости после приема пациентом карбамида отражает степень его инфицированности бактериями НР, так как известно, что их отличительной особенностью является высокая уреазная активность, позволяющая этому микроорганизму существовать в кислой среде желудка.

При наличии в желудке НР наблюдается прирост концентрации аммония в образцах воздуха относительно первого забора (рис. 1, *a*), величина которого, максимальная в промежутке от третьего до пятого забора воздуха, и отражает степень инфицированности пациента этим микроорганизмом. При его отсутствии или малом количестве концентрация аммония достоверно не изменяется (рис. 1, *б*). Аналогичные динамики регистрировали и для содержания формальдегида в исследуемых образцах воздуха. Положительный результат оценивался по максимальному приросту концентрации формальдегида.

Согласно данным, представленным в табл. 1, из 84-х испытуемых первой группы после приема карбамида вместе с креатином моногидратом отрицательный тест на наличие НР имели 20 человек (24%) а положительный — 64 человека (76%). Среди последних у 16 человек (25%) было обнаружено увеличение уровня формальдегида в образцах воздуха из ротовой полости, что доказывает возможность эндогенного образования формальдегида из креатина. Оно чаще всего (в 8-ми случаях, 50%) и с наибольшей активностью (5 человек с высокой и средней и только 3 человека — с низкой скоростью образования формальдегида) определялось у испытуемых с низким уреазным тестом. У лиц со средневыраженным уреазным тестом отмечено 6 случаев (38%) со средним и низким приростом формальдегида. При высокой уреазной активности образование формальдегида в ответ на прием креатина ни у кого из испытуемых не было выявлено. Из 20-ти испытуемых с отрицательным уреазным тестом, только у двоих отмечалось увеличение (но низкое) уровня формальдегида. Формальный анализ полученных данных указывает на то, что индуцированное приемом креатина образование формальдегида в желудке не связано с присутствием в нем бактерий НР. Но и образование формальдегида из креатина в клетках теплокровных, как указывалось ранее, также представляется маловероятным. Неразрешимость возникшей ситуации можно преодолеть, если учесть следующие два обстоятельства: в данной постановке исследования креатин поступал в желудок вместе с мочевиной; и исследуемые пациенты отличались не только степенью инфицированности, но и по видовому составу НР. В этом случае можно предположить, что у лиц, инфицированных бактериями НР, в результате их жизнедеятельности на локальных участках слизистого слоя желудка из мочевины и креатина одновременно образуются соответственно аммиак и формальдегид. Они реагируют между собой с образованием нелетучего соединения гексаметилентетрамина, известного как уротропин: $6\text{CH}_2\text{O} + 4\text{NH}_3 \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_4 + 6\text{H}_2\text{O}$ (реакция Манниха). У пациентов с высокой уреазной активностью количество образующегося аммиака, очевидно, достаточно, чтобы полностью связать формальдегид, создав в желудке необходимую для образования уротропина щелочную среду. В результате формальдегид не высвобождается в ротовую полость. У пациентов с низкой уреазной активностью, количества образующегося аммиака не хватает, чтобы обеспечить должное рН среды и синтез уротропина в реакции с формальдегидом, который высвобождается бактериями НР в процессе катаболизма креатина. При этом в ротовой полости испытуемых отмечается существенный прирост концентрации формальдегида. Случаи образования формальдегида при отрицательном уреазном тесте, вероятно, объясняются его недостаточной чувствительностью, не позволяющей выявить наличие бак-

Таблица 1. Распределение испытуемых по результатам уреазного и формальдегидного тестов в первой группе

Уреазный тест ($\Delta\text{NH}_3/\text{м}^3$ в ротовой полости)	Количество человек	Креатиновый тест ($\Delta\text{H}_2\text{CO}/\text{м}^3$ в ротовой полости), определяемый у добровольцев		
		высокий от 50 мкмоль/ м^3	средний (5–50) мкмоль/ м^3	низкий до 5 мкмоль/ м^3
Высокий от 10 ммоль/ м^3	12 (14%)	Не опр.	Не опр.	Не опр.
Средний (1–10) ммоль/ м^3	29 (36%)	Не опр.	3	3
Низкий до 1 ммоль/ м^3	23 (27%)	3	2	3
Отрицательный результат	20 (23%)	Не опр.	Не опр.	2
Всего	84 (100%)	3 (19%)	5 (30%)	8 (50%)
		16 (100%)		

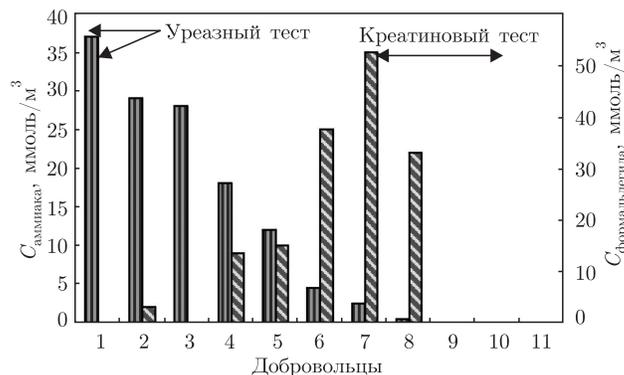


Рис. 2. Сравнение интенсивностей образования аммиака и формальдегида, выявленных в результате соответствующего тестирования у добровольцев 2-й группы

терий НР ниже определенных количеств, которых тем не менее достаточно, чтобы в ответ на введение креатина высвободить ощутимые количества формальдегида.

Гипотеза, постулирующая образование уротропина, находит также подтверждение в тех экспериментах, где испытуемые (вторая группа) принимали карбамид и креатин моногидрат в разные дни (рис. 2). Из представленного рисунка видно, что у исследуемых добровольцев наблюдается четкая зависимость между образованием формальдегида и аммиака. Скорость образования последнего прямо отражает степень инфицированности бактериями НР, так как концентрация мочевины, образуемая локально в желудке этими бактериями и клетками макроорганизма, близка к насыщаемой для уреазы. Отсюда следует, что синтез формальдегида из креатина осуществляется бактериями НР и в их отсутствии не происходит (см. рис. 2). Обратный характер зависимости между образованием формальдегида и аммиака подтверждает предыдущие данные в пользу высказанного нами предположения об образовании в желудке из этих газообразных соединений уротропина.

Таким образом, полученные результаты доказывают возможность эндогенного образования формальдегида и уротропина в желудке людей, инфицированных бактериями НР, из креатина моногидрата, что следует учитывать при его использовании в качестве диетической добавки.

1. *Creatine Supplements* // <http://www.leehayward.com/creatine.htm>.
2. *Stead L. M., Au K. P., Jacobs R. L. et al.* Methylation demand and homocysteine metabolism: effects of dietary provision of creatine and guanidinoacetate // *Amer. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2001. – **281**, No 5. – P. E1095-E1100.
3. *Persky A. M., Brazeau G. A.* Clinical Pharmacology of the Dietary Supplement Creatine Monohydrate // *Pharm. Rev.* – 2001. – **53**, No 2. – P. 161–176.
4. *Silber M.* Creatines: creatine and phosphocreatine as pharmacosanation aids // *Sportsci.; Encyclop. Sports Med. and Sci.*; available on-line < <http://www.sportsci.org/encyc/drafts/Creatine.doc> >, 1998.
5. *Masuda H, Azuma H.* Biological and pathophysiological roles of endogenous methylarginines as inhibitors of nitric oxide synthase // *Nippon Yakurigaku Zasshi.* – 2002. – **119**, No 1. – P. 29–35.
6. *Ogawa T., Kimoto M., Sasaoka K.* Purification and properties of a new enzyme, NG, NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase, from rat kidney // *J. Biol. Chem.* – 1989. – **264**, No 17. – P. 10205–10209.
7. *Tyihak E., Moricz A. M., Ott P. G. et al.* The potential of bioarena in the study of the formaldehyde // *J. Planar Chromatogr.* – 2005. – **18**. – P. 67–70.
8. *Yasui M., Matsui S., Ihara M. et al.* Translational synthesis on a DNA template containing N²-methyl-2'-deoxyguanosine catalyzed by the Klenow fragment of Escherichia coli DNA polymerase I // *Nucleic Acids Research.* – 2001. – **29**, No 9. – P. 1994. – 2001.

9. Poortmans J. R., Kumps A., Duez P., Fofonka A. et al. Effect of oral creatine supplementation on urinary methylamine, formaldehyde, and formate // *Med. Sci. Sports Exerc.* – 2005. – **37**, No 10. – P. 1717–1720.
10. Yu P. H., Deng Y. L. Potential Cytotoxic Effect of Chronic Administration of Creatine, a Nutrition Supplement to Augment Athletic Performance // *Medical Hypothesis.* – 2000. – **54**. – P. 726–728.
11. Wyss M., Kaddurah-Daouk R. Creatine and Creatinine Metabolism // *Physiol. Rev.* – 2000. – **80**, No 3. – P. 1107–1213.
12. Ernst P. B., Gold B. D. The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer // *Ann. Rev. Microbiol.* – 2000. – **54**. P. 614–615.
13. Циммерман Я. С. Этиология, патогенез и лечение язвенной болезни, ассоциированной с *Helicobacter pylori*-инфекцией: состояние проблемы и перспективы // *Клин. медицина.* – 2006. – **84**, № 3. – С. 9–19.
14. Avidar G. A simple spectrometric determination of formaldehyde and other aldehydes: application to periodate oxidized glycerol system // *Anal. Biochem.* – 1983. – **134**. – P. 499–504.

*Институт экогигиены и токсикологии
им. Л. И. Медведя, Киев*

Поступило в редакцию 16.03.2007

УДК 616.831:577.122+577.125

© 2007

Т. М. Кучмеровская, Н. М. Гурина, И. А. Шиманский,
член-корреспондент НАН Украины **Г. В. Донченко, С. М. Супрун,**
А. П. Клименко

Системные биохимические нарушения при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите

Reduced levels of total lipids and cholesterol in blood serum were shown after 10 days of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) induction. The elevated content of blood serum phospholipids was observed after 18 days of EAE duration. These alterations were accompanied by the progressive increase in both the total proteolytic activity and acid phosphatase activity with a decreasing effect on alkaline phosphatase in blood serum. Compared to control, the blood content of vitamin B₁₂ was twice lower in the period as early as 10 days after EAE induction. Our findings suggest the presence of system biochemical impairments, which most likely reflect the degree of EAE-related destructive changes in brain and may be of significance as diagnostic and prognostic criteria for multiple sclerosis management.

Рассеянный склероз является хронической патологией ЦНС, в основе которой лежит воспалительный процесс, прогрессирующая демиелинизация и повреждение аксонов. Заболевание характеризуется развитием многочисленных склеротических очагов преимущественно в белом веществе головного и спинного мозга, а также значительными функциональными нарушениями. Клиническими проявлениями рассеянного склероза являются нарушения в двигательной, координаторной, чувствительной сферах, расстройства зрения, а также изменения интеллекта. Деструкция миелиновой оболочки нервных волокон протекает на фоне угнетения синтетических и активации аутолитических процессов обмена белков, липидов и других соединений, что может приводить к накоплению в системном кровотоке избыточного количества продуктов деградации миелина. В конечном итоге развитие патологии, ассоциированное со структурными и функциональными изменениями нервной ткани,