

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Кафедра биологической химии

В. Г. Подковкин

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ
ГОМЕОСТАЗА И АДАПТАЦИИ**

*Утверждено редакционно-издательским советом университета
в качестве практикума*

Самара
Издательство «Самарский университет»
2009

УДК 577.1
ББК 28.072
П44

Рецензент директор Института экспериментальной медицины
и биотехнологий СамГМУ д-р мед. наук, проф. Л.Т. Волова

Подковкин, В. Г.

44 Молекулярные механизмы гомеостаза и адаптации : практикум /
В. Г. Подковкин. - Самара: Изд-во «Самарский университет», 2009. - 88 с.

В данном практикуме по спецкурсу «Молекулярные механизмы гомеостаза и адаптации» приводятся современные методы исследования катехоламинов, стероидных гормонов, азотсодержащих информонов - гормонов, медиаторов, гистогормонов: ацетилхолина, гистамина, серотонина, тироксина. Каждая тема концентрирует теоретическую информацию, позволяющую понять принцип метода и целесообразность всех этапов анализа. Эти методы могут также быть использованы при проведении самостоятельных научных исследований, в том числе при подготовке курсовых и дипломных работ.

Здесь содержится также ряд лабораторных работ, позволяющих студентам самостоятельно познакомиться с некоторыми биологическими эффектами микроволнового излучения, магнитных полей как на молекулярном уровне, так и на уровне целостного организма.

Предназначен для студентов, специализирующихся по биологической химии.

УДК 577.1
ББК 28.072

- © Подковкин В. Г., 2009
- © Самарский государственный университет, 2009
- © Оформление. Издательство «Самарский университет», 2009

ВВЕДЕНИЕ

Практикум предназначен для студентов университета, изучающих спецкурс «Молекулярные механизмы гомеостаза и адаптации». В нем представлен комплекс современных методов исследования гормонов и медиаторов, позволяющий оценить состояние симпато-адреналовой, холинергической, гистаминергической, серотонинергической систем и активность щитовидной железы. Использование этих исследований позволяет дать всестороннюю оценку состояния регулирующих систем организма. Ряд методов представлен в виде микромодификаций, разработанных автором, что дает возможность производить анализ нескольких биохимических показателей в небольшом количестве биологического материала.

Эндокринные железы реализуют свои функции управления гуморально с помощью гормонов, к которым относят специфические вещества, необходимые для регуляции процессов обмена веществ и выделяемые железами внутренней секреции непосредственно в кровь и лимфу.

Гормоны обладают строгой специфичностью, высокой биологической активностью и дистантным характером действия. С током циркулирующей крови гормоны поступают во все органы и ткани, но проявляют свое действие только в определенных органах и тканях-мишенях, клетки которых имеют специфические рецепторы к гормонам. В известной мере большинство эндокринных желез и вырабатываемые ими гормоны можно рассматривать как гуморальное звено рефлекторной дуги. При этом связь между нервной и эндокринной системами выполняет гипоталамус с помощью нейросекреторных клеток, продуцирующих под влиянием нервных импульсов пептидные гормоны - либерины и статины, которые поступают в гипофиз по портальным кровеносным сосудам, регулируют в нем образование тропных гормонов, стимулирующих функции других желез внутренней секреции.

Нервная и эндокринная системы участвуют в регуляции обмена веществ, в адаптации, в защите организма от химических, физических и других факторов.

Все гормоны и медиаторы по химической природе делят на азотосодержащие и стероидные. Среди азотосодержащих, в свою очередь, различают производные аминокислот и их аналогов, а также белково-пептидные гормоны. В настоящем практикуме предлагаются методы исследования некоторых гормонов и медиаторов, производных аминокислот и их аналогов.

Часть 1. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ ГОРМОНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ РЕГУЛЯЦИИ

В медицинской практике обычно исследуют функциональное состояние звеньев нейрогуморальной регуляции, объединяемых по принципу - основной гуморальный продукт системы (гормон-регулятор), его активирующие и ингибирующие гуморальные факторы, тропные гормоны, специфический рецепторный аппарат эффекторных клеток, ферменты синтеза и катаболизма гормона-регулятора, его активные и неактивные предшественники и катаболиты в цепи синтеза и распада. **Основными принципами построения гормональных исследований являются следующие:** 1) использование широкого спектра методов, позволяющего характеризовать активность различных этапов обмена гормона-регулятора; 2) проведение одномоментных исследований в различных биологических средах - крови, моче, тканях; 3) изучение не только количественных показателей активности нейрогуморальной системы, но и качественной стороны ее по соотношению гормона с величинами его предшественников и катаболитов.

Характерной особенностью всех секретируемых в кровь гормонов и других физиологически активных веществ выступает быстрое их выведение из кровотока, причем скорость элиминации, как правило, пропорциональна концентрации; полупериод циркуляции гормонов в крови колеблется от нескольких минут до нескольких десятков минут. Удаление их из крови в большинстве случаев происходит при прохождении крови через печень, почки, легкие и другие ткани и зависит от величины локального кровотока; лишь немногие гормоны подвергаются химическим изменениям непосредственно в крови. **Как на скорость секреции в кровь, так и на элиминацию из нее гормонов оказывают влияние многие** эндогенные и экзогенные факторы, в связи с чем методология **проведения** гормональных исследований **требует соблюдения следующих условий:** 1) строгое выполнение правил взятия материала для исследования; 2) соблюдение условий проведения обследования; 3) адекватность выбора сроков исследования его целям; 4) адекватность контрольных исследований опытным; 5) функциональное построение исследования (изучение динамики показателей активности исследуемой системы нейроэндокринной регуляции, циркадной динамики ее, применение проб, нагрузок).

Химические методы определения содержания гормонов и медиаторов в крови и моче основаны на реакциях, свойственных каким-либо молекулярным группировкам, включающим родственные гормону соединения, поэтому необходимо применение сложных методов выделения и очистки для анализа индивидуальных веществ, чаще всего различных хроматографических приемов, сопряженных с потерями. Без этих этапов результаты анализов позволяют судить лишь о суммарном содержании в биологическом материале нескольких родственных соединений. В связи с этим **биологические методы**

определения гормонов и других активных веществ не потеряли своего значения, несмотря на низкую их производительность и недостаточно высокую воспроизводимость результатов.

Немаловажную роль в изучении содержания гормонов в организме сыграли *методы масс-спектрометрии, газово-жидкостной хроматографии*, а также методы, основанные на воспроизведении *in vitro* некоторых естественных эндогенных процессов обмена гормонов, – *методы сатурационного анализа и радиоферментные методы*. Суть сатурационного («насыщающего») анализа заключается в том, что анализируемый материал добавляют в систему, состоящую из известного количества меченого радиоактивными изотопами анализируемого соединения и специфического связывающего его белка. Часть меченого вещества вытесняется из связи с белком добавленным определяемым аналогом; активность вытеснения зависит от количества последнего. Определяя либо количество вытесненного, либо, наоборот, оставшегося связанным меченого соединения, судят о количестве определяемого немеченого аналога.

Сатурационный анализ существует в двух вариантах: 1) радиоиммунный анализ, когда в качестве связывающих белков берут антитела к изучаемому соединению, полученные путем иммунизации лабораторных животных, и 2) конкурентное связывание, когда используются присутствующие в организме белки, прочно связывающие гормоны. Радиоиммунный анализ применяют как для определения гормонов белковой природы, являющихся полными антигенами, так и для многих низкомолекулярных веществ, обладающих свойствами неполных антигенов (гаптенов). Для конкурентного связывания необходимы транспортные белки плазмы крови или рецепторные белки, содержащиеся в органах-мишенях, особенно чувствительных к действию гормонов. Так как многие гормоны не обладают видовой специфичностью, для анализа материала, взятого у человека, подходят рецепторные белки из органов лабораторных животных.

Методы сатурационного анализа чрезвычайно чувствительные и специфичные, однако их специфичность в некоторых случаях оказывается недостаточной, так как антитела могут связывать не только молекулы гормона, но и продукты их неполного синтеза или деградации, обладающие сходной антигенной структурой, но биологически неактивные.

Конкурентное связывание позволяет определять часто лишь суммарное количество нескольких более или менее родственных между собой соединений, которые к тому же вносят различный вклад в конечный результат, особенно в условиях патологии или стрессорного воздействия, так как связывающая способность используемого белка для них неодинакова. Радиоэнзимные методы предполагают применение очищенных ферментов одного из путей деградации гормонов с использованием меченых радиоактивными изотопами донаторов групп, переносимых в ходе этой реакции на молекулу гормона (например, метилирование его) с последующим количественным опре-

делением образовавшегося метаболита, по которому судят о содержании гормона. Предварительно из исследуемого образца удаляют эндогенные метаболиты этого гормона. Так как действию фермента подвергаются многие родственные соединения, для определения индивидуально каждого из них применяют хроматографическое разделение образовавшихся метаболитов. Чувствительность и специфичность методов высока.

Неконъюгированные глюкокортикоиды образуют прочные комплексы с белком транскортином (глобулин) и менее прочные - с другими белками крови. До 20 % секретируемых гормонов бывает прочно адсорбировано на эритроцитах. Определение связывающей способности транскортина, в редких случаях полностью используемой организмом, имеет диагностическое значение. С мочой экскретируются свободные гормоны, их парные соединения, предшественники и другие метаболиты.

Для определения содержания в биологических жидкостях глюкокортикоидов используют или спектр веществ, содержащих ОН-группу в 17-м положении (17-оксикортикостероиды), или флуоресценцию в кислой среде стероидов. При этом определяют более узкую группу веществ (11-оксикортикостероиды), практически сумму гидрокортизона и кортикостерона. С помощью тонкослойной и колоночной хроматографии удастся выделить отдельные соединения, их свободные и связанные с белком формы.

Сатурационный анализ специфичнее, но он все же не позволяет выявлять индивидуальные вещества. Использование цветной реакции с метадинитробензолом дает возможность определять 17-кетостероиды - очень широкий спектр веществ, основная масса которых является метаболитами мужских половых гормонов и глюкокортикоидов.

Секреция глюкокортикоидов имеет четкую сезонную и циркадную периодичность: зимой она выше, летом - ниже, максимум содержания в крови отмечается утром, минимум - в полночь. Концентрация этих гормонов в крови, как и АКТГ, подвержена значительным колебаниям с неправильным периодом, поэтому определение в одной, случайно взятой, порции крови обычно малоинформативно.

Исследование гуморальных продуктов гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы проводят для дифференциальной диагностики форм гиперкортицизма или гипокортицизма и выбора вида их лечения. При этом применяют функциональные пробы, построенные на регуляторных взаимоотношениях внутри системы. Помимо моделирования гиперфункции отдельных звеньев этой системы (введение АКТГ, дексаметазона, активация передней доли гипофиза лизин-вазопрессинном, усиление секреции кортиколиберина введением L-ДОФА), используют способность метопирона (вещество SU-4880) избирательно подавлять гидроксирование стероидных молекул в 11-м положении, в результате чего в коре надпочечников синтезируются неполноценные предшественники гормонов, возрастают концентрация АКТГ в крови и секреция 11-дезоксикортикостероидов. Одновременное определение

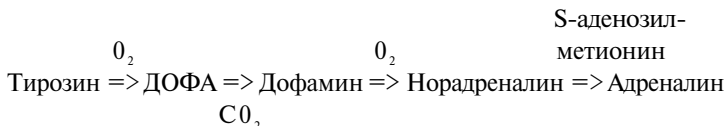
в крови и моче спектра гуморальных продуктов системы дает более полное представление о ее функциональном состоянии, о морфологическом и биохимическом уровне ее поражения.

Наиболее активный минералокортикоид - альдостерон синтезируется в клубочковой зоне коры надпочечников. Меньшей и несколько отличающейся от него физиологической активностью обладают его предшественники в цепи синтеза - дезоксикортикостерон (ДОК) и 18-оксидезоксикортикостерон (18-ОН-ДОК), кортикостерон. Синтез альдостерона возрастает в физиологических условиях под воздействием ангиотензина, солей калия и АКТГ, при снижении содержания натрия (поваренной соли) в пище и при переходе из горизонтального в вертикальное положение. Последние два фактора могут изменить содержание альдостерона в крови в несколько десятков раз. Без учета их влияния невозможно установление истинной нормальной величины секреции альдостерона. В крови содержание альдостерона определяют радиоиммунным методом или косвенно судят о нем по содержанию натрия и калия. С мочой выводятся в основном его метаболиты - кислотолабильная конъюгата и парное соединение его тетрагидропроизводного метаболита. Тесная связь между ренин-ангиотензиновой системой и альдостероном позволяет объединить их в одну систему.

Тема 1

КАТЕХОЛАМИНЫ

Катехоламинами называют адреналин, норадреналин и дофамин, поскольку их можно рассматривать, как производные катехола или 1,2-дигидроксibenзола. Главный путь синтеза катехоламинов включает следующие стадии:



Концентрация адреналина в крови животных особенно повышается при стрессовых состояниях, возрастая за время, исчисляемое секундами или минутами, почти в тысячу раз. Стимулируя расщепление гликогена и увеличение содержания глюкозы в крови, ускоряя ритм сердца и увеличивая сердечный выброс, адреналин приводит животное в состояние готовности к борьбе или к бегству, участвуя тем самым в адаптации его в чрезвычайной ситуации.

Исследование катехоламинов включает следующие этапы: сбор и хранение материала, выделение из него изучаемых веществ и их количественное определение.

Катехоламины быстро разрушаются в щелочной и нейтральной среде и относительно долго сохраняются в кислой среде, особенно при замораживании. Поэтому мочу для анализа собирают в сосуд с серной кислотой, кровь - с хлорной или трихлоруксусной кислотами, органы и ткани гомогенизируют с теми же кислотами. Выделяют катехоламины путем адсорбции на окиси алюминия. Адсорбент готовят таким образом, чтобы он не содержал слишком мелких частиц, так как их трудно улавливать и они могут уносить при промывании часть исследуемых веществ. Для адсорбции необходима щелочная среда. Однако в сильно щелочной среде катехоламины очень быстро разрушаются. Поэтому оптимальное значение pH 8,2-8,5 (допустимо от 8 до 9). Адсорбции препятствуют соли тяжелых металлов, которые связывают добавлением ЭДТА. Элюируют раствором уксусной кислоты. Затем катехоламины окисляют иодом при pH 6-6,5. Перед доведением pH добавляют ЭДТА для предотвращения выпадения осадка гидроокиси алюминия. Затем окисленные продукты превращаются в флуоресцирующие соединения в щелочной среде. С целью предотвращения их быстрого разрушения добавляется аскорбиновая кислота. Для отдельного определения концентрации адреналина, норадреналина и ДОФА используются различия в интенсивности их флуоресценции при разных длинах волн.

Лабораторная работа № 1

ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕКТРА ФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ КАТЕХОЛАМИНОВ

Цель работы: исследовать спектр флуоресценции адреналина, норадреналина, дофамина и ДОФА.

Реактивы

1. 5 н. раствор уксусной кислоты. 165 мл ледяной уксусной кислоты довести до 500 мл водой. Оттитровать.
 2. 0,25 н. раствор уксусной кислоты. 25 мл 5 н. уксусной кислоты довести до 500 мл водой.
 3. 0,33 М раствор фосфата натрия. 64 г 12-водной соли растворить в воде, довести до 500 мл.
 4. 0,1 н. иод - готовить из фиксаля (1 ампулу - до 500 мл).
 5. Сульфит натрия безводный.
 6. 5 н. раствор гидроксида натрия. 200 г растворить в воде, довести до 1 л.
 7. Щелочной сульфит. 500 мг щелочного сульфита растворить в 2 мл воды. Добавить 18 мл 5 н. раствора гидроксида натрия, перемешать. Прилить 20 мл 5 %-ного раствора ЭДТА, перемешать. Готовить перед использованием.
 8. Адреналин. 0,2 мл 0,1 %-ного раствора (из ампулы) растворить в 10 мл 1 н. соляной кислоты, готовится из фиксаля. Концентрация - 20 мкг/мл (стандартный раствор). Хранить 2-3 недели плотно закрытым.
 9. Норадреналин. 0,1 мл 0,2 %-ного раствора (из ампулы) растворить в 10 мл 1 н. соляной кислоты. Концентрация - 20 мкг/мл (стандартный раствор). Хранить 2-3 недели плотно закрытым.
 10. Дофамин. 1 мг дофамина растворить в 1 мл воды, 0,2 мл этого раствора - в 10 мл 1 н. соляной кислоты (стандартный раствор). Концентрация - 20 мкг/мл. Хранить 2-3 недели плотно закрытым.
 11. Диоксифенилаланин (ДОФА). 1 мг ДОФА растворяют в 1 мл концентрированной соляной кислоты. 0,2 мл этого раствора - в 10 мл 1 н. соляной кислоты (стандартный раствор). Концентрация - 20 мкг/мл. Хранить 2-3 недели плотно закрытым.
- Реактивы сохранить для выполнения последующих работ.

Ход работы

1. К 1 мл стандартных растворов добавить по 4 мл дистиллированной воды, перемешать. 1 мл полученного раствора прилить к 9 мл 0,25 н. уксусной кислоты, перемешать. Разлить этот раствор по 3 мл в 3 пробирки - 2 опытные и 1 контрольную.
2. В опытные пробирки добавить по 1,2 мл раствора фосфата натрия, перемешать. Приготовить щелочной сульфит в нужном количестве.

3. Прилить 0,1 мл раствора иода, перемешать. Если проб много, последний этап методики (пункт 10) выполнять с 5-7 пробирками в несколько приемов.

4. Добавить 1 мл щелочного сульфита, перемешать. Немедленно, не позднее чем через 2 минуты, прилить 0,5 мл 5 н. уксусной кислоты. Тщательно перемешать. ,

5. Для приготовления контрольных проб (5) смешать в колбе 6 мл фосфата натрия, 0,5 мл иода, 5 мл щелочного сульфита, 2,5 мл 5 н. уксусной кислоты. Разлить полученную смесь в контрольные пробирки по 2,8 мл, перемешать.

6. Поместить все пробирки в кипящую водяную баню на 5 минут. Затем охладить в воде со льдом.

7. Флуоресценцию измеряют не позднее чем через час при следующих длинах волн возбуждения и флуоресценции соответственно:

313 нм и 365 нм;

313 нм и 405 нм;

313 нм и 436 нм;

365 нм и 470 нм;

405 нм и 470 нм;

436 нм и 470 нм;

365 нм и 510 нм;

405 нм и 510 нм;

436 нм и 510 нм.

Лабораторная работа № 2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АДРЕНАЛИНА, НОРАДРЕНАЛИНА, ДОФАМИНА И ДОФА В КРОВИ И ТКАНЯХ

(Э. Ш. Матлина и соавт., 1963, в модификации В. Г. Подковкина, 1988)

Цель работы: определить содержание адреналина, норадреналина, дофамина и ДОФА в надпочечнике и в головном мозге крысы.

Реактивы

1. 10 %-ный раствор трихлоруксусной кислоты.

2. 1 %-ный спиртовой раствор фенолфталеина.

3. 5 %-ный раствор ЭДТА (этилендиаминтетраацетат, трилон Б).

4. 5 %-ный раствор аммиака (нашатырный спирт).

5. Окись алюминия. К 200 г порошка добавить 400 мл воды, встряхивать в закрытой колбе 1 минуту. Затем 1 минуту отстаивать. Слить воду вместе с неуспевшими осесть частицами. Повторить промывание 20 раз. Прокалить порошок в термостате в течение 3-5 часов при температуре 120-150°. Хранить в закрытой колбе.

6. 5 н. раствор уксусной кислоты. 165 мл ледяной уксусной кислоты довести до 500 мл водой. Оттитровать.

7. 0,25 н. раствор уксусной кислоты. 25 мл 5 н. уксусной кислоты довести до 500 мл водой.

8. 0,33 М раствор фосфата натрия. 64 г 12-водной соли растворить в воде, довести до 500 мл.

9. 0,1 н. иод - готовить из фиксанала (1 ампулу - до 500 мл).

10. Сульфит натрия безводный.

11. 5 н. раствор гидроксида натрия. 200 г растворить в воде, довести до объема 1 л.

12. Щелочной сульфит. 500 мг безводного сульфита натрия растворить в 2 мл воды. Добавить 18 мл 5 н. раствора гидроксида натрия, перемешать. Прилить 20 мл 5 %-ного раствора ЭДТА, перемешать. Готовить перед использованием.

13. Адреналин. 0,2 мл 0,1 %-ного раствора (из ампулы) растворить в 10 мл 1 н. соляной кислоты (готовится из фиксанала). Концентрация - 20 мкг/мл (стандартный раствор). Хранить 2-3 недели плотно закрытым.

14. Норадреналин. 0,1 мл 0,2 %-ного раствора (из ампулы) растворить в 10 мл 1 н. соляной кислоты. Концентрация - 20 мкг/мл (стандартный раствор). Хранить 2-3 недели плотно закрытым.

15. Дофамин. 1 мг дофамина растворить в 1 мл воды, 0,2 мл этого раствора в 10 мл 1 н. соляной кислоты (стандартный раствор). Концентрация - 20 мкг/мл. Хранить 2-3 недели плотно закрытым.

16. Диоксифенилаланин (ДОФА). 1 мг ДОФА растворяют в 1 мл концентрированной соляной кислоты, 0,2 мл этого раствора - в 10 мл 1 н. соляной кислоты (стандартный раствор). Концентрация - 20 мкг/мл. Хранить 2-3 недели плотно закрытым.

Сбор и хранение материала

В мерный цилиндр, содержащий 10 мл 10 %-ного раствора трихлоруксусной кислоты собирают 5 мл крови (или другие количества в том же соотношении), тщательно перемешивают, оставляют на 30 минут для экстракции. При необходимости можно оставить на сутки в холодильнике. Органы и ткани быстро извлекают, взвешивают и гомогенизируют в 10 %-ном растворе трихлоруксусной кислоты (10 мл на 1 г ткани). Через 30 минут центрифугируют 15 минут при 3000 об/мин. Экстракт может храниться несколько дней в холодильнике.

Ход работы

1. Экстракт вылить в колбу, добавить 10 мл 5 %-ного раствора ЭДТА, 1 каплю фенолфталеина, перемешать. Прибавлять по каплям раствор аммиака (нашатырный спирт) при непрерывном перемешивании до появления слабо-розовой окраски (от одной капли, рН 8,2-8,5). Если раствор будет ярко-

красным, значит, аммиак добавлен в избытке и его необходимо нейтрализовать 10 %-ной серной кислотой до розовой окраски.

2. Поскольку катехоламин быстро разрушается в щелочной среде, немедленно добавить 0,5 г окиси алюминия. Встряхивать на механической качалке 5 минут.

3. После отстаивания слить воду, не допуская потери осадка.

4. Налить в колбу 20-25 мл воды и 1 каплю раствора аммиака, взболтать. После отстаивания слить воду, не допуская потери осадка. Промыть осадок еще раз таким же способом.

5. Прилить в колбу 7 мл 0,25 н. уксусной кислоты. Встряхивать на механической качалке 5 минут.

6. После отстаивания перенести по 3 мл надосадочной жидкости в 2 пробирки (опытную и контрольную). На этом этапе анализ можно прервать на несколько дней.

7. В опытные пробирки добавить по 1,2 мл раствора фосфата натрия, перемешать. Приготовить щелочной сульфит в нужном количестве.

8. Прилить 0,1 мл раствора иода, перемешать. Если проб много, последний этап методики (пункт 10) выполнять с 5-7 пробирками в несколько приемов.

9. Добавить 1 мл щелочного сульфита, перемешать. Немедленно, не позднее чем через 2 минуты, прилить 0,5 мл 5 н. уксусной кислоты. Тщательно перемешать.

10. Для приготовления контрольных проб (20) смешать в колбе 24 мл фосфата натрия, 2 мл иода, 20 мл щелочного сульфита, 10 мл 5 н. уксусной кислоты. Разлить полученную смесь в контрольные пробирки по 2,8 мл, перемешать.

11. Поместить все пробирки в кипящую водяную баню на 5 минут. Затем охладить в воде со льдом.

При выполнении анализов обрабатываются следующие пробы

1. *Стандарт.* К 0,5 мл стандартного раствора адреналина добавить 4,5 мл воды, перемешать. 0,5 мл полученного раствора прилить к 6,5 мл 0,25 н. уксусной кислоты, перемешать. Разлить этот раствор по 3 мл в 2 пробирки (опытную и контрольную) и выполнить с ними последний этап анализа (пункты 7-11).

2. *Контроль* делается к каждому опыту и стандарту (пункты 10-11).

3. Опыт.

Флуоресценцию измеряют не позднее чем через час при следующих длинах волн возбуждения и флуоресценции соответственно:

1. 313 нм и 365 нм (E_1);

2. 313 нм и 405 нм (E_2);

3. 365 нм и 510 нм (E_3);

4. 436 нм и 510 нм (E_4).

Расчет. Концентрацию исследуемых веществ вычисляют по следующим формулам:

$$C_{DOFA} = \frac{E_1}{E_{DOFA_1}};$$

$$C_D = \frac{E_2 - E_{DOFA_2} C_{DOFA}}{E_{D_2}};$$

$$C_H = \frac{E_3 - E_4 - C_2 (E_{D_3} - E_{D_4})}{E_{H_3} - E_{H_4}};$$

$$C_A = \frac{E_4 - E_{D_4} C_D - E_{H_4} C_H}{E_{A_4}};$$

где C_A – количество адреналина, мкг в исследуемом количестве крови;

C_H – количество норадреналина;

C_D – количество дофамина;

C_{DOFA} – количество ДОФА.

E_1, E_2, E_3, E_4 – флуоресценция исследуемой пробы (за вычетом контроля) при указанных выше длинах волн в условных единицах.

E_A, E_H, E_D, E_{DOFA} – флуоресценция стандартного раствора соответственно адреналина, норадреналина, дофамина и ДОФА при соответствующих длинах волн в условных единицах.

Лабораторная работа № 3

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АДРЕНАЛИНА, НОР АДРЕНАЛИНА, ДОФАМИНА И ДОФА В МОЧЕ

(Э.Ш. Матлина и соавт., 1963, в модификации В.Г. Подковкина, 1986)

Цель работы: определить содержание адреналина, норадреналина, дофамина и ДОФА в моче.

Реактивы

Те же, что и в предыдущем методе, кроме пунктов 1, 6, 9, 10, 12, 15. Дополнительно необходимы следующие реактивы:

1. 10 %-ный раствор серной кислоты;
2. 0,25 %-ный раствор красной кровяной соли - 25 мкг/10 мл;
3. 0,2 %-ный раствор аскорбиновой кислоты в 5 н. гидроокиси натрия - 20 мг/ 10мл. Готовить перед использованием.

Ход работы

1. Собрать мочу в сосуд с раствором серной кислоты в соотношении 1:10. Мочу с кислотой можно хранить в течение нескольких дней в холодильнике в плотно закрытом флаконе.

2. Налить в колбу 50 мл мочи, затем добавить каплю раствора фенолфталеина и 10 мл 5 %-ного раствора ЭДТА, перемешать. Довести до pH = 8,2-8,5, добавляя по каплям раствор аммиака при непрерывном перемешивании. Если раствор будет ярко-красным, значит, аммиак добавлен в избытке и его необходимо нейтрализовать 10%-ной серной кислотой до розовой окраски. Затем добавить 1 г порошка окиси алюминия.

3. Встряхивать на механической качалке 5 минут.

4. После отстаивания слить жидкость, не допуская потери осадка.

5. Налить в колбу 20-25 мл воды, добавить каплю раствора аммиака, взболтать. После отстаивания слить воду, не допуская потери осадка. Промыть осадок еще раз таким же способом.

6. Налить в колбу 10 мл 0,25 н. уксусной кислоты. Встряхивать на механической качалке 5 минут.

7. После отстаивания отобрать по 3 мл надосадочной жидкости в 2 пробирки (опытную и контрольную). На этом этапе анализ можно прервать на несколько дней.

8. Добавить в каждую пробирку по 0,5 мл раствора ЭДТА и по 1,2 мл раствора фосфата натрия, перемешать. Проверить - pH = 6-6,5. Взвесить аскорбиновую кислоту в нужном количестве, растворить в 5 н. гидроокиси натрия.

9. Добавить в опытные пробирки по 0,1 мл раствора красной кровяной соли. Перемешать. Через 4 минуты прилить по 1 мл (в опытные и контрольные пробы) раствора аскорбиновой кислоты в 5 н. NaOH. Перемешать. В контрольные пробы добавить по 0,1 мл красной кровяной соли. Перемешать.

При выполнении анализов обрабатываются следующие пробы

1. Стандарт. К 0,5 мл стандартного раствора адреналина добавить 4,5 мл воды, перемешать. 0,5 мл полученного раствора прилить к 9,5 мл 0,25 н. уксусной кислоты, перемешать. Разлить этот раствор по 3 мл в 3 пробирки (2 опытные и 1 контрольную) и выполнять с ними последний этап анализа (пункты 8-9).

2. Контроль делается к каждому опыту и стандарту (пункт 9).

3. Опыт.

Измеряют флуоресценцию опытных и контрольных проб на флуориметре «БИАН-130» при 3 длинах волн возбуждения каждую. Первичные светофильтры: 365 нм, 405 нм, 436 нм. Вторичный светофильтр - 510 нм. Интенсивность свечения стабильна в течение 25-30 минут.

Расчет

Количество адреналина, норадреналина и ДОФА в моче рассчитывается по следующим формулам

$$y = \frac{E_2 - E_1}{H_1}; \quad x = \frac{E_1 - yH}{A_1}; \quad z = \frac{E_3 - 0,75A_1x - 2,32H_1y}{D_3},$$

где x – количество адреналина; y – норадреналина; z – ДОФА в мкг в исследуемой пробе (50 мл);

E_1, E_2, E_3 – флуоресценция исследуемой пробы при длинах волн 436, 405 и 365 нм соответственно (за вычетом флуоресценции контрольной пробы);

A, H, D_3 – флуоресценция стандартных растворов адреналина (436 нм), норадреналина (436 нм) и ДОФА (365 нм).

Лабораторная работа № 4

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДОФАМИНА В МОЧЕ

Цель работы: определить содержание дофамина в моче.

Реактивы

1. 5 н. раствор уксусной кислоты.
2. 0,25 н. раствор уксусной кислоты.
3. 0,33 М раствор фосфата натрия.
4. 0,1 н. водный раствор иода. 1,27 г кристаллического иода и 25 г иодида калия растворить в 25 мл воды, довести до 100 мл.
5. Щелочной раствор сульфита натрия. 250 мг безводного сульфита натрия растворить в 1 мл воды, затем добавить 9 мл 5 н. раствора гидроокиси натрия. Готовить перед использованием.
6. Стандартный раствор дофамина. 1 мг дофамина растворить в 1 мл воды, прилить 10 мл 1 н. соляной кислоты. Концентрация – 100 мкг/мл. Хранить 2-3 недели плотно закрытым.

Ход работы

Для анализа используется остаток экстракта, полученный после встряхивания 0,25 н. уксусной кислоты с окисью алюминия при определении катехоламинов в моче (пункт 7).

1. По 1 мл уксуснокислого экстракта разливают в 2 пробирки (опытную и контрольную).
2. Прилить в опытную пробирку 2 мл 0,25 н. уксусной кислоты и 0,8 мл 0,33 М раствора фосфата натрия, перемешать.
3. Добавить 0,2 мл 0,1 н. раствора иода, перемешать.
4. Через десять минут прилить 0,5 мл щелочного раствора сульфита натрия, перемешать.
5. Добавить 0,6 мл 5 н. раствора уксусной кислоты, перемешать.
6. Поместить на 5 минут в кипящую водяную баню, затем охладить в воде со льдом.

При выполнении анализов обрабатываются следующие пробы

1. *Стандарт.* 0,1 мл стандартного раствора дофамина прилить к 4,9 мл 0,25 н. уксусной кислоты. С 1 мл полученного раствора выполнить описанную выше методику.

2. *Контроль.* НАТО анализов смешать в колбе 20 мл 0,25 н. уксусной кислоты, 8 мл 0,33 М раствора фосфата натрия, 2 мл 0,1 н. раствора иода, 5 мл щелочного раствора сульфата натрия, 6 мл 5 н. уксусной кислоты, перемешать. Разлить полученную смесь по 4,1 мл в контрольные пробирки, содержащие 1 мл экстракта или стандартного раствора дофамина. Поместить на 5 минут в кипящую водяную баню. Охладить в воде со льдом,

Расчет

Содержание дофамина в моче производят по формуле

$$x = \frac{5,2(E_{оп} - E_k)}{E_s - E_{к/с}}$$

где x – концентрация дофамина в моче, мкг/мл;

$E_{оп}$ – интенсивность флуоресценции опытной пробы;

E_k – интенсивность флуоресценции контрольной пробы;

E_s – интенсивность флуоресценции стандартной пробы;

$E_{к/с}$ – интенсивность флуоресценции контроля к стандарту.

Лабораторная работа № 5

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАТЕХОЛАМИНОВ

(Э.Ш. Матлина и соавт., 1963, в модификации В.Г. Подковкина, 1988)

Цель работы: определить содержание адреналина, норадреналина, дофамина и ДОФА в крови.

Реактивы

Те же, что и в методе исследования крови и тканей. Сбор и хранение материала аналогичны.

Ход анализа

1. Приготовить хроматографическую колонку диаметром 5 мм. 200 г адсорбента встряхнуть с водой и поместить в колонку, перемешать стеклянной палочкой.

2. Экстракт вылить в колбу, добавить 5 мл 5 %-ного раствора ЭДТА, 1 каплю фенолфталеина, перемешать. Прибавлять по каплям раствор аммиака (нашатырный спирт) при непрерывном перемешивании до появления слабо-розовой окраски (от одной капли, рН 8,2-8,5). Если раствор будет ярко-

красным, значит, аммиак добавлен в избытке и его необходимо нейтрализовать 10 %-ной серной кислотой до розовой окраски.

3. Полученный раствор пропустить через колонку. Затем 2 раза промыть колонку 3 мл воды, в которую добавлена 1 капля раствора аммиака.

4. Элюировать катехоламины 7 мл 0,25 н. уксусной кислоты. Перемешать. Разлить в 2 пробирки (опытную и контрольную) по 3 мл.

5. В опытные пробирки добавить по 1,2 мл раствора фосфата натрия, перемешать. Приготовить щелочной сульфит в нужном количестве.

6. Прилить 0,1 мл раствора иода, перемешать. Если проб много, последний этап методики (пункт 9) выполнять с 5-7 пробирками в несколько приемов.

7. Добавить 1 мл щелочного сульфита, перемешать. Немедленно, не позднее чем через 2 минуты, прилить 0,5 мл 5 н. уксусной кислоты. Тщательно перемешать.

8. Для приготовления контрольных проб (20 шт.) смешать в колбе 24 мл фосфата натрия, 2 мл иода, 20 мл щелочного сульфита, 10 мл 5 н. уксусной кислоты. Разлить полученную смесь в контрольные пробирки по 2,8 мл, перемешать.

9. Поместить все пробирки в кипящую водяную баню на 5 минут. Затем охладить в воде со льдом.

При выполнении анализов обрабатываются следующие пробы

1. **Стандарт.** К 0,5 мл стандартного раствора адреналина добавить 4,5 мл воды, перемешать. 0,5 мл полученного раствора прилить к 6,5 мл 0,25 н. уксусной кислоты, перемешать. Разлить этот раствор по 3 мл в 2 пробирки (опытную и контрольную) и выполнить с ними последний этап анализа (пункты 5-9).

2. **Контроль** делается к каждому опыту и стандарту (пункты 5-9).

3. **Опыт.**

Флуоресценцию измеряют не позднее чем через час при следующих длинах волн возбуждения и флуоресценции соответственно:

1. 313 нм и 365 нм (E_1);

2. 313 нм и 405 нм (E_2);

3. 365 нм и 510 нм (E_3);

4. 436 нм и 510 нм (E_4).

Расчет. Концентрацию исследуемых веществ вычисляют по следующим формулам:

$$C_{\text{ДОФА}} = \frac{E_1}{E_{\text{ДОФА}}};$$

$$C_D = \frac{E_2 - E_{DOFA} C_{DOFA}}{E_{D_2}};$$

$$C_H = \frac{E_3 - E_4 - C_2(E_{D_3} - E_{D_4})}{E_{H_3} \cdot E_{H_4}};$$

$$C_A = \frac{E_4 - E_{D_2} C_D - E_{H_4} C_H}{E_{A_4}};$$

где C_A – количество адреналина, мкг в исследуемом количестве крови;

C_H – количество норадреналина;

C_D – количество дофамина;

C_{DOFA} – количество ДОФА;

E_1, E_2, E_3, E_4 – флуоресценция исследуемой пробы (за вычетом контро-
ля) при указанных выше длинах волн в условных единицах;

E_A, E_H, E_D, E_{DOFA} – флуоресценция стандартного раствора соответственно
адреналина, норадреналина, дофамина и ДОФА при соответствующих дли-
нах волн в условных единицах.

К 0,5 мл крови, находящимся в пробирке или мерном цилиндре, добав-
ляют 1 мл 10 %-ной трихлоруксусной кислоты, а в случае исследования мочи
(в количестве 0,5 мл) добавляют в пробирку 0,5 мл 10 %-ной серной кислоты.

Для крови: в пробирке смесь перемешивают тщательно, оставляют на
30 минут для экстракции и центрифугируют.

К исследуемому экстракту биологического материала мочи или крови
для выделения адреналина, норадреналина, дофамина и ДОФА добавляют в
пробирку равный объем 5 %-ного раствора этилендиаминтетраацетата натрия
(ЭДТА), далее доводят рН раствора до 8,2-8,5 0,1 %-ным раствором аммиака.

Затем раствор помещают в хроматографическую колонку, содержащую
окись алюминия.

При этом отношение высоты h хроматографической колонки к ее диа-
метру d выбирают равным 1 (в нашем случае $h = 5$ мм, $d = 5$ мм).

Затем исследуемые вещества элюируют с адсорбента 1 мл 0,25 н. рас-
твора уксусной кислоты. Этот объем делят на две равные части: 0,5 - опы-
тная проба, 0,5 - контрольная проба.

К 0,5 мл элюата добавляют 0,15 мл 5 %-ного ЭДТА и 0,12 мл фосфата
натрия трехзамещенного 0,33 М до рН 6-6,5, окисление катехоламинов про-
изводят 0,1 мл 0,1 н. раствора иода в течение 10 минут.

Через 10 мин иод нейтрализуют приливанием 0,1 мл щелочного сульфита
(500 мл сульфита натрия безводного, 2 мл воды и 18 мл 5 н. NaOH) и далее
добавляют 0,05 мл 5 н. уксусной кислоты.

Раствор помещают в кипящую водяную баню на 5 минут, затем охлаж-
дают в воде, после чего раствор помещают в кювету флуориметра (например,
типа «БИАН-130»), где измеряют интенсивности флуоресценции контроль-
ной и опытной проб, далее определяют:

1. Разность интенсивности ΔE_1 флуоресценции контрольной пробы и опытной пробы при длине волны возбуждения $\lambda_B = 313$ нм и при длине волны флуоресценции $\lambda_\Phi = 365$ нм;

2. Разность интенсивностей ΔE_2 флуоресценции опытной и контрольной пробы при длине волны возбуждения $\lambda_B = 313$ нм и при длине волны флуоресценции $\lambda_\Phi = 405$ нм;

3. Разность интенсивностей ΔE_3 флуоресценции опытной и контрольной пробы при длине волны возбуждения $\lambda_B = 365$ нм и при длине волны флуоресценции $\lambda_\Phi = 510$ нм;

4. Разность интенсивностей ΔE_4 флуоресценции опытной и контрольной пробы при длине волны возбуждения $\lambda_B = 436$ нм и при длине волны флуоресценции $\lambda_\Phi = 510$ нм.

После этого определяют количество в опытном количестве крови (в мкг) адреналина C_A , норадреналина C_N , дофамина $C_{ДА}$ и диоксифенилаланина C_D по формулам:

$$C_D = \frac{\Delta E_1}{\Delta E_{D1}},$$

где ΔE_1 - разность интенсивностей флуоресценции опытной пробы и соответствующей контрольной пробы при длинах волн $\lambda_B = 313$ нм и $\lambda_\Phi = 365$ нм;

ΔE_{D1} - разность интенсивностей флуоресценции стандартного раствора диоксифенилаланина и соответствующей контрольной пробы при длинах волн $\lambda_B = 313$ нм и $\lambda_\Phi = 365$ нм;

$$C_{ДА} = \frac{\Delta E_2 - \Delta E_{D2} C_D}{\Delta E_{ДА2}},$$

где ΔE_2 - разность интенсивностей флуоресценции опытной пробы и соответствующей контрольной пробы при длинах волн $\lambda_B = 313$ нм и $\lambda_\Phi = 405$ нм;

ΔE_{D2} - разность интенсивностей флуоресценции стандартного раствора диоксифенилаланина и соответствующей контрольной пробы при длинах волн $\lambda_B = 313$ нм и $\lambda_\Phi = 405$ нм;

$\Delta E_{ДА2}$ - разность интенсивностей флуоресценции стандартного раствора дофамина и соответствующей контрольной пробы при длинах волн $\lambda_B = 313$ нм и $\lambda_\Phi = 405$ нм;

$$C_N = \frac{\Delta E_3 - \Delta E_4 - C_{ДА} (\Delta E_{ДА3} - \Delta E_{ДА4})}{\Delta E_{Н3} - \Delta E_{Н4}},$$

где ΔE_3 - разность интенсивностей флуоресценции опытной пробы и соответствующей контрольной пробы при длинах волн $\lambda_B = 365$ нм и $\lambda_\Phi = 510$ нм;

ΔE_4 - разность интенсивностей флуоресценции опытной пробы и соответствующей контрольной пробы при длинах волн $\lambda_B = 436$ нм и $\lambda_\Phi = 510$ нм;

$\Delta E_{ДАЗ}$ – разность интенсивностей флуоресценции стандартного раствора дофамина и соответствующей контрольной пробы при длинах волн $\lambda_a = 365$ нм и $\lambda_\phi = 510$ нм;

$\Delta E_{ДАА}$ – разность интенсивностей флуоресценции стандартного раствора дофамина и соответствующей контрольной пробы при длинах волн $\lambda_a = 436$ нм и $\lambda_\phi = 510$ нм;

$\Delta E_{НЗ}$ – разность интенсивностей флуоресценции стандартного раствора норадrenalина и соответствующей контрольной пробы при длинах волн $\lambda_a = 365$ нм и $\lambda_\phi = 510$ нм;

$\Delta E_{НА}$ – разность интенсивностей флуоресценции стандартного раствора норадrenalина и соответствующей контрольной пробы при длинах волн $\lambda_a = 436$ нм и $\lambda_\phi = 510$ нм;

$$C_A = \frac{\Delta E_A - \Delta E_{ДАА} C_{ДА} - \Delta E_{НА} C_{Н}}{\Delta E_{АА}},$$

где $\Delta E_{АА}$ – разность интенсивностей флуоресценции стандартного раствора адреналина и соответствующей контрольной пробы при длинах волн $\lambda_a = 436$ нм и $\lambda_\phi = 510$ нм.

Тема 2

СИСТЕМА АЦЕТИЛХОЛИН - АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗА

Ацетилхолин, осуществляющий взаимодействие между нервными клетками, а также между нервными окончаниями и эффекторными клетками, является медиатором холинэргических синапсов.

При взаимодействии ацетилхолина с гидроксиламином образуется ацетилгидроксамовая кислота. Реакция идет в щелочной среде. Далее в кислой среде ацетилгидроксамовая кислота реагирует с ионами трехвалентного железа с образованием окрашенного комплекса. Оптическая плотность продукта реакции пропорциональна концентрации ацетилхолина.

Активность ацетилхолинэстеразы определяется по разности концентраций ацетилхолина до и после инкубации в течение определенного времени.

Лабораторная работа № 6

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ В ПЛАЗМЕ КРОВИ

(С. Хестрин, 1949)

Цель работы: определить активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) в плазме крови человека и крысы по методу Хестрина.

Реактивы

- 1/15 М фосфатный буферный раствор, pH 7,8. 11,9 г двузамещенного фосфата натрия двухводного растворить в воде, довести до 1 л.
- 9,1 г однозамещенного фосфата калия растворить в воде, довести до 1 л. Смешать 91,5 мл первого раствора и 8,5 мл второго. Проверить на pH-метре.
- 0,35 %-ный раствор ацетилхолина хлористого. 0,2 г (1 ампула) растворить в 57,1 мл воды.
- 2 М раствор гидроксилamina хлористого. 13,9 г реактива растворить в воде, довести до 100 мл.
- 50 %-ная трихлоруксусная кислота. К 250 г реактива прилить 250 мл воды, перемешать до растворения.
- 3,5 н. раствор гидроокиси натрия. 35 мл 5 н. гидроокиси натрия довести водой до 50 мл.
- Смесь 2 М гидроксилamina и 3,5 н. гидроокиси натрия в соотношении 1:1. Готовить перед использованием.
- 12 %-ная соляная кислота. К 300 мл воды прилить 150 мл концентрированной соляной кислоты.
- 0,37 М хлорное железо. 30 г хлорного железа шестиводного растворить в 0,1 н. соляной кислоте, довести до 500 мл.

Ход работы

1. В центрифужные пробирки налить по 1,5 мл фосфатного буфера, 1,5 мл воды, 0,1 мл плазмы, перемешать.
2. Быстро добавить по 1,5 мл ацетилхолина, перемешать. Поместить на 30 минут в водяную баню (37° С).
3. Прилить 0,5 мл 50 %-ной трихлоруксусной кислоты, перемешать палочкой. Центрифугировать 15 минут, 1500 об/мин.
4. Перенести 0,5 мл надосадочной жидкости в чистые пробирки, добавить 1 мл смеси гидросиламина и гидроокиси натрия, перемешать.
5. Через 2 минуты прилить 0,5 мл 12 %-ной соляной кислоты. Перемешать.
6. Добавить 0,5 мл 0,37 М хлорного железа. Перемешать.
7. Через 15 минут измерить оптическую плотность на ФЭКе, свето-фильтр зеленый (540 нм), кювета - 5 мм.

При выполнении анализа обрабатываются следующие пробы

1. **Стандарт.** Вместо 0,1 мл плазмы (пункт 1) добавить 0,1 мл воды (2 пробы).
2. **Контроль.** К 0,5 мл надосадочной жидкости (пункт 5) прилить те же реактивы в обратном порядке (1 проба). После добавления каждого реактива перемешивать.

3. Опыт.

Расчет производят по формуле

$$x = (E_{st} - E_{op})23,46,$$

где x – определяемая активность АХЭ, мкмоль/мл мин;

E_{st} – оптическая плотность стандартной пробы (против контроля);

E_{op} – оптическая плотность опытной пробы.

При определении ацетилхолинэстеразы в плазме крови животных с низкой активностью фермента – крыс, морских свинок, кроликов – состав инкубационной смеси следующий: 0,5 мл фосфатного буфера, 0,5 мл воды, 0,1 мл плазмы, 0,5 мл ацетилхолина. Для остановки реакции добавляют 0,2 мл 50 %-ной трихлоруксусной кислоты. Далее анализ выполняется по вышеописанному методу.

Формула для расчета:

$$x = (E_{st} - E_{op})8,29,$$

Обозначения в формуле те же.

Для определения активности АХЭ в слюне состав инкубационной смеси: 1,5 мл фосфатного буфера, 1,5 мл слюны, 1,5 мл раствора ацетилхолина. Время инкубации 1 час.

Формула для расчета:

$$x = (E_{st} - E_{op})0,78.$$

Обозначения в формуле те же.

Лабораторная работа № 7

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ В ЭРИТРОЦИТАХ

(С. Хестрин, 1949)

Цель работы: определить активность АХЭ в эритроцитах крысы по методу Хестрина.

Реактивы

1. 1/15 М фосфатный буферный раствор, pH 7,8.
2. 0,35 %-ный раствор ацетилхолина хлористого.
3. 2 М гидроксилламин хлористый.
4. 50 %-ная трихлоруксусная кислота.
5. 3,5 н. гидроокись натрия.
6. Смесь 2 М гидроксилламина и 3,5 н. гидроокиси натрия в соотношении 1:1. Готовить перед использованием.
7. 12 %-ная соляная кислота.
8. 0,37 М хлорное железо.
9. 0,2 %-ный раствор тритона X-100.
10. 0,9 %-ный раствор хлористого натрия (изотонический).

Ход работы

1. 1 мл крови, собранной в стакан с 0,1 мл 5 %-ного раствора ЭДТА или нитрата натрия при перемешивании, отцентрифугировать, отсосать плазму, добавить 10 мл изотонического раствора, перемешать.

2. Центрифугировать 15 минут, 3000 об/мин. Отсосать всю надосадочную жидкость. Повторить промывание эритроцитов изотоническим раствором 3 раза. Перенести 0,1 мл эритроцитов в центрифужные пробирки, содержащие 0,4 мл 0,2 %-ного тритона X-100. Перемешать.

3. Через 15 минут прилить 1,5 мл фосфатного буфера и 1 мл воды. Перемешать.

4. Быстро добавить 1,5 мл ацетилхолина, перемешать. Поместить на 30 минут в водяную баню (37° С).

5. Прилить 0,5 мл трихлоруксусной кислоты, перемешать палочкой. Центрифугировать 15 минут, 1500 об/мин.

6. Перенести 0,5 мл надосадочной жидкости в чистые пробирки, добавить 1 мл смеси гидроксилламина и гидроокиси натрия, перемешать.

7. Через 2 минуты прилить 0,5 мл 12 %-ной соляной кислоты, перемешать.

8. Добавить 0,5 мл 0,37 М хлорного железа. Перемешать.

9. Через 15 минут измерить оптическую плотность на ФЭКе, светофильтр зеленый (540 нм), кювета - 5 мм.

При выполнении анализов обрабатываются следующие пробы

1. **Стандарт.** Вместо 0,1 мл эритроцитов (пункт 2) добавить 0,5 мл воды (2 пробы). Выполняется без добавления тритона X-100.

2. **Контроль.** К 0,5 мл надосадочной жидкости (пункт 6) прилить те же реактивы в обратном порядке (1-я проба).

3. **Опыт.**

Расчет производят по формуле

$$x = (E_{st} - E_{op}) 23,46,$$

где x – определяемая активность АХЭ, мкмоль/мл мин;

E_{st} – оптическая плотность стандартной пробы (против контроля);

E_{op} – оптическая плотность опытной пробы.

При определении активности ацетилхолинэстеразы в эритроцитах крыс, морских свинок, кроликов время инкубации увеличивается до 1 часа. Расчет производится по приведенной выше формуле, результат делится на два.

Лабораторная работа № 8

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ

(Т.В. Правдич-Неминская, 1949)

Под влиянием ацетилхолинэстеразы происходит гидролиз ацетилхолина с образованием холина и уксусной кислоты. Кислота подкисляет реакционную среду, что приводит к изменению окраски индикатора, интенсивность которой измеряют с помощью колориметра.

Цель работы: определить активность АХЭ в плазме крови и в эритроцитах крысы человека по изменению рН среды.

Реактивы

1. Раствор ацетилхолинхлорида. 0,2 г ацетилхолинхлорида (1 ампулу) растворить в 2 мл дистиллированной воды.

2. Индикатор - феноловый красный. 0,1 г сухого индикатора растереть в ступке с 5,7 мл 0,5 н. NaOH, после растворения объем довести дистиллированной водой до 25 мл (основной раствор).

3. Вероналовый буфер. рН = 8,4. 390 мг медиала растворить в 100 мл дистиллированной воды, добавить 4,5 мл 0,1 н. соляной кислоты, затем - 0,75 мл основного раствора индикатора, Проверить рН. Объем довести дистиллированной водой до 200 мл.

4. 0,05 %-ный водный раствор прозерина.

Ход работы

1. В опытные и контрольные пробирки внести по 2,5 мл вероналового буфера и по 0,1 мл сыворотки, перемешать.
2. В контрольные пробирки добавить по 0,1 мл раствора прозерина, перемешать.
3. Смесь прогреть при температуре 37° С в течение 5 минут.
4. Затем добавить в опытные и контрольные пробирки по 0,1 мл раствора ацетилхолинхлорида, перемешать.
5. Инкубировать при температуре 37° С в течение 20 минут.
6. После инкубации в опытные пробирки быстро добавить по 0,1 мл раствора прозерина, перемешать.
7. Колориметрировать на ФЭКе в кювете с толщиной слоя 5 мм при зеленом светофильтре (длина волны 540 нм). Колориметрирование можно проводить в течение 1 часа.

Расчет производят по формуле

$$x = 8,67 (E_k - E_{оп}),$$

где x - определяемая активность АХЭ мкмоль/мл мин;

E_k - оптическая плотность контрольной пробы;

$E_{оп}$ - оптическая плотность опытной пробы.

Лабораторная работа № 9

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЦЕТИЛХОЛИНОПОДОБНЫХ ВЕЩЕСТВ В КРОВИ

(С. Хестрин, 1949)

Цель работы: определить концентрацию ацетилхолиноподобных веществ в крови крысы.

Реактивы

1. 10 %-ный раствор трихлоруксусной кислоты.
2. 2 М гидроксилламин хлорид.
3. 3,5 н. раствор гидроксида натрия.
4. Смесь 2 М гидроксилламина и 3,5 н. гидроксида натрия в соотношении 1:1. Готовить перед использованием.
5. 12 %-ный раствор соляной кислоты.
6. 0,37 М раствор хлорного железа.

Ход работы

1. К 1 мл крови прилить 2 мл 10 %-ной трихлоруксусной кислоты. Центрифугировать 15 минут, 3000 об/мин. Экстракт можно хранить несколько суток замороженным.
2. К 0,5 мл экстракта прилить 1 мл смеси гидроксилламина и гидроксида натрия. Перемешать.

3. Через 2 минуты добавить 0,5 мл 12 %-ной соляной кислоты. Перемешать.

4. Прилить 0,5 мл 0,37 М хлорного железа. Перемешать.

5. Через 15 минут измерить оптическую плотность на спектрофотометре, длина волны 490 нм.

6. **Контроль.** К 0,5 мл экстракта добавляются те же реактивы, в обратном порядке. После добавления каждого реактива перемешивать.

Следить, чтобы на стенках кюветы не было пузырьков газа.

Концентрацию ацетилхолиноподобных веществ вычисляют по калибровочной кривой.

Тема 3

ТИРЕОИДНЫЕ ГОРМОНЫ

Синтез тиреоидных гормонов протекает в щитовидной железе путем иодирования тирозиновых остатков тиреоглобулина - белка с молекулярной массой 660 тысяч, построенного из пяти тысяч аминокислот и содержащего около 120 тирозилов и 300 углеводов.

99,95 % тироксина содержится в крови в соединении с тироксинсвязывающим глобулином. Поэтому предлагаемый показатель - белковосвязанный иод адекватно характеризует функциональную активность щитовидной железы.

Для оценки функции щитовидной железы необходимо определение концентрации тироксина в крови. Количественное определение белковосвязанного иода является адекватным тестом, поскольку 99,95 % тироксина содержится в крови в соединении с тироксинсвязывающим глобулином.

На первом этапе белки плазмы осаждаются и затем сжигаются при нагревании с нитратом калия. Это необходимо для того, чтобы весь иод перешел в ионы Г. На втором этапе количественного определения используется свойство ионов иода ускорять реакцию разложения роданида железа в присутствии нитратов и нитритов в кислой среде. Величина, характеризующая ускорение названной реакции, пропорциональна концентрации иода. Количество роданида железа, имеющего оранжевую окраску, измеряется колориметрически.

Лабораторная работа № 10

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВОСВЯЗАННОГО ИОДА

(Ю.И. Еремин и соавт., 1980)

Цель работы: определить содержание белковосвязанного иода в сыворотке крови крысы и в сыворотке крови человека.

Реактивы

1. 10 %-ный раствор сульфата цинка.
2. 1 н. раствор гидроксида натрия. 40 г реактива растворить в воде, довести до 1 л. Оттитровать.
3. 20 %-ный раствор нитрата калия.
4. 0,006 М раствор роданида калия (0,6 г/л).
5. 2 %-ный раствор нитрата натрия.
6. 10 %-ный раствор железоаммонийных квасцов в 2 н, азотной кислоте. Азотную кислоту готовить из фиксанала. При его отсутствии развести концентрированную кислоту. Концентрацию определить титрованием.
7. Стандартный раствор иодида калия. 13 мг реактива растворить в 100 мл воды. Полученный раствор развести в 100 раз. Концентрация - 1 мкг/мл.

Рабочий раствор готовится перед использованием разведением стандартного раствора в 100 раз. Концентрация - 0,01 мкг/мл.

Ход работы

1. В центрифужные пробирки налить 1 мл воды, добавить 0,05 мл исследуемой сыворотки, перемешать.

2. Прилить 0,1 мл раствора сульфата цинка, перемешать.

3. Добавить 0,05 мл 1 н. раствора гидроокиси натрия, перемешать.

4. Центрифугировать 10 минут, 1500 об/мин. Удалить надосадочную жидкость.

5. К осадку прилить 5 мл воды, тщательно перемешать стеклянной палочкой до получения однородной суспензии. Центрифугировать 10 минут, 1500 об/мин. Удалить надосадочную жидкость.

6. К осадку добавить 0,025 мл 1 н. раствора гидроокиси натрия, 0,05 мл 20 %-ного раствора нитрата калия, тщательно перемешать стеклянной палочкой до получения однородной взвеси.

7. Поместить пробирки в термостат с температурой 70-74° С на 2-3 часа до полного высыхания. На этом этапе анализ можно прервать на несколько суток.

8. Нагреть пробирку в пламени спиртовки до полного сгорания содержимого. Продукт сгорания должен быть светло-желтым. Если останутся черные вкрапления, необходимо продолжать нагревание до их исчезновения. На этом этапе анализ также можно прервать на 1-2 дня.

9. Налить в пробирки по 2,5 мл воды, тщательно перемешать стеклянной палочкой. Через 30 минут еще раз перемешать и центрифугировать 15 минут, 3000 об/мин.

10. 2 мл надосадочной жидкости перенести в чистые пробирки. Добавить 0,3 мл роданида калия, 0,5 мл нитрита натрия, 0,8 мл раствора квасцов. После добавления квасцов быстро перемешать путем встряхивания пробирок и немедленно поместить их в водяную баню с температурой 37° С.

11. Через 20 минут перенести пробирки в воду со льдом, охлаждать 1-2 минуты.

12. Быстро произвести измерения оптической плотности проб на ФЭКе. Длина волны - 440 нм, толщина кюветы - 5 мм.

При выполнении анализов обрабатываются следующие пробы

1. *Стандарт.* Со смесью 1 мл рабочего раствора иодида калия и 1 мл воды выполняют последний этап анализа (пункты 10-12).

2. *Контроль.* С 2 мл воды выполняют последний этап анализа (пункты 10-12).

3. Опытные пробы обрабатываются в количестве не более 5-7 штук, иначе за время измерения их оптическая плотность может существенно измениться.

Расчет производят по формуле

$$x = 25 \frac{E_k - E_{op}}{E_k - E_{st}}$$

где x – концентрация белковосвязанного иода в сыворотке, мкг %;

E_k – оптическая плотность контроля;

E_{op} – оптическая плотность опытной пробы;

E_{st} – оптическая плотность стандарта.

Лабораторная работа № 11

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВОСВЯЗАННОГО ИОДА В СЛЮНЕ

В результате проведенных в ЦНИЛ Самарского государственного медицинского университета экспериментальных исследований выявлены ранее неизвестные свойства слюны человека, а именно: между концентрациями гормонов щитовидной железы в крови и в слюне существует положительная корреляционная связь. Коэффициент корреляции составлял 0,94 у практически здоровых лиц и 0,76 у больных тиреотоксикозом. Было установлено, что у практически здоровых людей концентрация белковосвязанного иода в слюне составляла от 1,1 до 2,2 мкг%, у больных тиреотоксикозом – от 2,3 до 6,2 мкг%.

В связи с этим установлена возможность и целесообразность использования слюны в качестве биологической жидкости для оценки функции щитовидной железы по определению в слюне концентрации тиреоидных гормонов, например, по величине концентрации белковосвязанного иода.

Цель работы: определить содержание белковосвязанного иода в слюне человека.

Реактивы

1. 10 %-ный раствор сульфата цинка.
2. 1 н. раствор гидроокиси натрия. 40 г реактива растворить в воде, довести до 1 л. Оттитровать.
3. 20 %-ный раствор нитрата калия.
4. 0,006 М раствор роданида калия (0,6 г/л).
5. 2 %-ный раствор нитрата натрия.
6. 10 %-ный раствор железозаммонийных квасцов в 2 н. азотной кислоте. Азотную кислоту готовить из фиксанала. При его отсутствии развести концентрированную кислоту. Концентрацию определить титрованием.
7. Стандартный раствор иодида калия. 13 мг реактива растворить в 100 мл воды. Полученный раствор развести в 100 раз. Концентрация – 1 мкг/мл.

Рабочий раствор готовится перед использованием разведением стандартного раствора в 100 раз. Концентрация – 0,01 мкг/мл.

Ход работы

В качестве биологической жидкости используют слюну человека, перед забором пробы которой обследуемый промывает ротовую полость кипяченой водой, просушивая полость салфеткой.

Сбор слюны производят в химически чистые пробирки в количестве 0,5-1 мл.

Для анализа в центрифужные пробирки наливают 4 мл воды, добавляют 0,2 мл исследуемой слюны, 0,4 мл 10 %-ного раствора сульфата цинка, 0,2 мл 1 н. раствора гидроксида натрия. Далее центрифугируют в течение 10 минут при 1500 об/мин. и удаляют надосадочную жидкость.

К осадку приливают 5 мл воды, перемешивают, центрифугируют в течение 10 минут при 1500 об/мин и удаляют надосадочную жидкость.

Затем к осадку добавляют 0,1 мл 1 н. раствора гидроксида натрия, 0,2 мл 20 %-ного раствора нитрата калия, помещают пробирки в термостат с температурой 70-75° С на 2-3 часа до полного высыхания.

После этого нагревают пробирку в пламени спиртовки до полного сгорания содержимого, о чем свидетельствует светлая окраска содержимого без черных пятен. Далее наливают в пробирки по 10 мл воды, перемешивают и центрифугируют в течение 15 минут при 3000 об/мин.

Затем 2 мл надосадочной жидкости переносят в чистые пробирки, добавляют 0,3 мл 0,006 М роданида калия, 0,5 мл 2 %-ного нитрита натрия, 0,8 мл 10 %-ного раствора железоаммонийных квасцов в 2 н. азотной кислоте и помещают в водяную баню с температурой 37° С на 30 минут. После этого пробирки опускают в воду со льдом на 1-2 минуты. Затем производят измерение оптической плотности проб на спектрофотометре при длине волны 440 нм.

По определенной оптической плотности или калибровочной кривой определяют концентрацию белковосвязанного иода, повышенная концентрация которого свидетельствует об увеличении концентрации тиреоидных гормонов, а сниженная его концентрация - о снижении их концентрации.

Расчет производят по формуле:

$$x = 25 \frac{E_k - E_{op}}{E_k - E_{st}}$$

где x – концентрация белковосвязанного иода в сыворотке, мкг %;

E_k – оптическая плотность контроля;

E_{op} – оптическая плотность опытной пробы;

E_{st} – оптическая плотность стандарта.

При возрастании концентрации гормонов щитовидной железы в исследуемой слюне делают вывод об усилении функции щитовидной железы, а при уменьшении – о снижении функции щитовидной железы.

Тема 4 ГИСТАМИН И СЕРОТОНИН

Гистамин и серотонин являются биогенными аминами, образующимися при декарбоксилировании соответственно гистидина и 5-окситриптамина в тучных клетках соединительной ткани, в базофилах крови, из которых освобождаются при травмах, ожогах, при взаимодействии аллергенов с рецепторами тучных клеток - иммуноглобулинами класса E. Они участвуют в развитии воспалительной, в том числе аллергической, реакции, вызывая расширение капилляров, повышение их проницаемости, ускоряя приток фагоцитов в очаг воспаления.

Гистамин участвует в секреции соляной кислоты в желудке, стимулирует сокращение гладких мышц в легких.

Серотонин выполняет роль медиатора в нейронах, находящихся, главным образом, в гипоталамусе и стволе мозга. Значительное количество серотонина содержится в стенке кишечника. Он угнетает секрецию сока поджелудочной железы, а также сокращение желудка и передних отделов кишечника, усиливая одновременно перистальтику задних отделов кишечника. В эпифизе серотонин может подвергаться ацетилированию и метилированию, превращаясь при этом в гормон мелатонин.

Исследование гистамина и серотонина включает следующие этапы: сбор и хранение материала, выделение из него изучаемых веществ и их количественное определение.

Гистамин и серотонин быстро разрушаются в щелочной и нейтральной средах и относительно долго сохраняются в кислой среде, особенно при замораживании. Поэтому кровь для анализа собирают в сосуд с хлорной или трихлоруксусной кислотой, ткани гомогенизируют в одной из этих кислот. После осаждения белков экстракты замораживают.

Далее исследуемые вещества экстрагируют смесью бутанола с хлороформом. Для эффективной экстракции необходима щелочная среда и высокая концентрация солей. Поскольку серотонин в этих условиях разрушается, в раствор добавляют аскорбиновую кислоту для предотвращения его окисления. Затем исследуемые вещества экстрагируются из органической фазы соляной кислотой.

Для количественного определения гистамина используется реакция с ортофталевым альдегидом в щелочной среде с образованием флуоресцирующего соединения. Продукт реакции нестойк, и для его стабилизации создают кислую среду. Серотонин образует флуоресцирующее соединение с нингидрином при нагревании в нейтральной среде. Эта реакция применяется для определения его концентрации.

Хроматографический метод определения гистамина и серотонина имеет следующие особенности. Поскольку хлорная и трихлоруксусная кислоты мешают адсорбции гистамина на ионообменной смоле, их предварительно

удаляют. Трихлоруксусную кислоту экстрагируют диэтиловым эфиром. Экстракция бывает полной в том случае, если водная фаза до конца экстракции сохраняет кислую реакцию. Этого достигают добавлением сильной кислоты. Хлорную кислоту удаляют добавлением карбоната калия, в результате чего выпадает осадок перхлората калия. Далее, после экстракции, смесь хлороформа с бутанолом пропускают через хроматографическую колонку с ионообменной смолой (катионит). Гистамин адсорбируется на смоле, а серотонин остается в органической фазе. Затем серотонин экстрагируют соляной кислотой. Гистамин элюируют с колонки соляной кислотой. Предварительно удаляют остатки органической фазы с помощью спирта. Далее ведут анализ так же, как в предыдущем методе.

Лабораторная работа № 12

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГИСТАМИНА И СЕРТОНИНА МЕТОДОМ ЭКСТРАКЦИИ

(В.Г. Подковкин, 1995)

Цель работы: определить концентрацию гистамина и серотонина в головном мозге крысы методом экстракции.

Реактивы

1. 10 %-ный раствор трихлоруксусной кислоты.
 2. 7 %-ный раствор аскорбиновой кислоты. Готовится перед использованием.
 3. 1 н. раствор гидроксида натрия.
 4. Калий углекислый безводный.
 5. Смесь бутанола и хлороформа 3:2.
 6. 1 н. раствор соляной кислоты.
 7. 0,1 н. раствор соляной кислоты.
 8. 96 %-ный этиловый спирт, дважды перегнанный.
 9. 0,1 %-ный раствор ортофталевого альдегида в этиловом спирте.
 10. 1,5 М раствор ортофосфорной кислоты.
 11. 0,33 М раствор фосфата натрия.
 12. 0,1 М водный раствор нингидрина.
 13. Стандартный раствор гистамина. 1 мг гистамина гидрохлорида растворяют в 1 мл воды, 0,1 мл этого раствора - в 10 мл 1 н. соляной кислоты.
- Рабочий раствор. Перед анализом к 1 мл стандартного раствора добавляют 9 мл 10 %-ного раствора трихлоруксусной кислоты (концентрация - 1 мкг/мл).
14. Стандартный раствор серотонина. 1 мг серотонина креатин-сульфата растворяют в 1 мл воды, 0,1 мл этого раствора - в 10 мл 1 н. соляной кислоты.

Рабочий раствор. Перед анализом к 1 мл стандартного раствора добавляют 9 мл 10 %-ного раствора трихлоруксусной кислоты (концентрация - 1 мкг/мл).

Сбор и хранение материала

В центрифужные пробирки с 4 мл 10 %-ного раствора трихлоруксусной кислоты вносят 1 мл крови, тщательно перемешивают, оставляют на 30 минут для экстракции. Ткани и органы лабораторных животных быстро извлекают, взвешивают и гомогенизируют в 10 %-ном растворе трихлоруксусной кислоты (10 мл на 1 г ткани). Так же как и кровь, гомогенат оставляют для экстракции на 30 минут; при необходимости можно оставить в холодильнике на 1-2 суток. Затем перемешивают и центрифугируют 15 минут при 3000 об/мин. Материал можно хранить в замороженном состоянии. Потери исследуемых веществ при хранении в течение 1 месяца не превышают 3-5 %.

Ход работы

К 4 мл экстракта добавляют 0,2 мл раствора аскорбиновой кислоты и 4 г безводного карбоната калия, перемешивают. Затем приливают 5 мл смеси бутанола и хлороформа, энергично встряхивают 3 минуты. После расслоения фаз 4 мл органической фазы (верхний слой) переносят в другой флакон, куда добавляют 10 мл 0,1 н. раствора соляной кислоты и встряхивают 3 минуты. После расслоения отсасывают в 2 пробирки по 4 и 5 мл водной фазы.

Определение гистамина

К 4 мл экстракта добавляют 0,5 мл 1 н. раствора гидроксида натрия, 0,1 мл раствора ортофталевого альдегида, тщательно перемешивают. Через 4 минуты приливают 0,5 мл 1,5 М раствора ортофосфорной кислоты, перемешивают. Величину флуоресценции измеряют при длине волны 470 нм, используя для возбуждения светофильтр с максимумом пропускания 365 нм на флуориметре «БИАН-130». Интенсивность свечения стабильна в течение 30 минут.

Определение серотонина

К 5 мл экстракта добавляют 0,33 М раствора фосфата натрия для доведения рН до 6,5-7. Проверяют с помощью универсальной индикаторной бумаги. Затем приливают 0,1 мл 0,1 М раствора нингидрина, перемешивают и помещают в термостат на 30 минут при температуре 75° С. Охлаждают в воде. Через 1 час измеряют флуоресценцию при длине волны 470 нм. Длина волны возбуждения 365 нм.

Стандарт. Со смесью 2 мл рабочего раствора серотонина и 2 мл рабочего раствора гистамина выполняют все вышеописанные процедуры.

Контроль. С 4 мл 10 %-ного раствора трихлоруксусной кислоты выполняют все вышеописанные процедуры.

Расчет концентрации гистамина и серотонина производят по формуле

$$x = K \frac{E_{op} - E_k}{E_s - E_k},$$

где x – концентрация гистамина (серотонина) в мкмоль/л;

K – коэффициент, равный для гистамина 6,79, для серотонина – 3,08;

E_{op} – флуоресценция исследуемой пробы;

E_s – флуоресценция стандартной пробы;

E_k – флуоресценция контрольной пробы.

Лабораторная работа № 13

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГИСТАМИНА И СЕРОТОНИНА МЕТОДОМ ИОНООБМЕННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

(В.Г. Подковкин, 1990)

Цель работы: определить концентрацию гистамина и серотонина в крови крысы методом ионообменной хроматографии.

Реактивы

1. 57 %-ный раствор хлорной кислоты.
2. 10 %-ный раствор трихлоруксусной кислоты.
3. Диэтиловый эфир для наркоза.
4. 5 н. раствор гидроксида натрия.
5. 1 н. раствор гидроксида натрия.
6. Калия карбонат безводный.
7. н-Бутанол.
8. Хлороформ.
9. Смесь бутанола и хлороформа 3 : 2.
10. Ионообменная смола КБ-4П-2 или КБ-4 с размером частиц 0,1-0,2 мм. Смолу размалывают до указанного размера, промывают 1 н. раствором гидроксида натрия, три раза водой. Повторяют промывание три раза. Помещают смолу в хроматографическую колонку диаметром 5 мм. Высота 10 мм. Перед анализом через колонку пропускают 1 мл бутанола.
11. 1 н. раствор соляной кислоты.
12. 0,1 н. раствор соляной кислоты.
13. 96 %-ный этиловый спирт.
14. 0,1 %-ный раствор ортофталевого альдегида в этиловом спирте.
15. 1,5 М раствор ортофосфорной кислоты.
16. 0,33 М раствор фосфата натрия.
17. 0,1 М водный раствор нингидрина.
18. Стандартный раствор серотонина. 1 мг серотонина растворяют в 1 мл воды. 0,1 мл этого раствора - в 10 мл 1 н. соляной кислоты.

19. Стандартный раствор гистамина. 1 мг гистамина растворяют в 1 мл воды, 0,1 мл этого раствора - в 10 мл 1 н. соляной кислоты.

Сбор и хранение материала

В центрифужную пробирку с 2 мл 10 %-ной трихлоруксусной кислоты вносят 0,5 мл крови, перемешивают, оставляют на 30 минут для экстракции. Ткани и органы быстро извлекают, взвешивают и гомогенизируют в 10 %-ной трихлоруксусной кислоте (10 мл на 1 г ткани). Так же как и кровь, гомогенат выдерживают для экстракции 30 минут. При необходимости можно оставить в холодильнике на 1-2 суток. Затем перемешивают и центрифугируют 15 минут при 3000 об/мин. Если экстракт остается при этом мутным, его фильтруют через мелкопористый фильтр. Материал может храниться несколько дней в холодильнике.

Ход работы

К 2 мл экстракта добавляют 0,1 мл 57 %-ной хлорной кислоты, 5 мл эфира и встряхивают 1 минуту. Эфир отсасывают, приливают еще 5 мл, снова встряхивают. Такое промывание повторяют 3 раза. Затем к пробам прибавляют 2 г карбоната калия и 2,5 мл смеси бутанола с хлороформом, встряхивают 3 минуты. После этого центрифугируют 3 минуты при 3000 об/мин, отсасывают 2 мл органической фазы и пропускают через хроматографическую колонку с ионообменной смолой. Затем прошедшую через колонку смесь встряхивают с 4 мл 0,1 н. соляной кислоты в течение 3 минут. После расслоения фаз отсасывают 4 мл водной фазы для определения серотонина.

Колонку промывают 1 мл этилового спирта, 3 мл воды и элюируют гистамин 4 мл 0,1 н. соляной кислоты. Для восстановления работоспособности колонку промывают 10 мл 1 н. соляной кислоты, затем 10 мл воды. Хранить смолу следует в воде.

Определение гистамина

К элюату добавляют 0,15 мл 5 н. раствора гидроксида натрия, 0,1 мл раствора ортофталевого альдегида, тщательно перемешивают. Через 4 минуты приливают 0,5 мл 1,5 М раствора ортофосфорной кислоты, перемешивают. Величину флуоресценции измеряют при длине волны 470 нм, используя для возбуждения светофильтр с максимумом пропускания 365 нм на флуориметре «БИАН-130». Интенсивность свечения стабильна в течение 30 минут.

Определение серотонина

К экстракту добавляют 0,33 М раствор фосфата натрия для доведения рН до 6,5-7. Затем приливают 0,1 мл 0,1 М раствора нингидрина, перемешивают и помещают в термостат на 30 минут при температуре 75° С. Охлаждают в воде и через час измеряют флуоресценцию при длине волны 470 нм. Длина волны возбуждения - 365 нм.

Стандарт. Со смесью 0,1 мл стандартного раствора гистамина, 0,1 мл стандартного раствора серотонина и 2 мл 10 %-ной трихлоруксусной кислоты выполняют все вышеописанные процедуры.

Контроль. С 2 мг 10 %-ной трихлоруксусной кислоты выполняют описанную методику.

Расчет концентрации гистамина или серотонина производят по формуле

$$x = \frac{E_{Op} - E_K}{E_{St} - E_K},$$

где x – концентрация гистамина (серотонина) в мкмоль/л;

E_{Op} – флуоресценция исследуемой пробы;

E_{St} – флуоресценция стандартной пробы;

E_K – флуоресценция контрольной пробы.

Лабораторная работа № 14

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГИСТАМИНА И СЕРОТОНИНА В СЛЮНЕ

Обычно для определения содержания серотонина и гистамина в качестве биологического материала, который берется у людей при исследовании, используют кровь, однако ее забор из вены является травматичным для человека, имеет место повреждение кровеносного сосуда, иногда с последующими нарушениями кровообращения, занесением инфекции в кровь. Эти обстоятельства, а также болевые ощущения и отрицательные эмоции часто служат причиной отказа больных от обследования, тем более в тех случаях, когда необходимо проведение серии анализов с короткими интервалами времени.

Кроме того, при заборе крови человека из вены требуется специально подготовленное помещение с обученным медицинским персоналом, стерильные инструменты и одноразовые шприцы, что приводит к увеличению стоимости обследования.

Цель работы: определить концентрацию гистамина и серотонина в слюне человека методом ионообменной хроматографии.

Реактивы

1. 57 %-ный раствор хлорной кислоты.
2. 10 %-ный раствор трихлоруксусной кислоты.
3. Диэтиловый эфир для наркоза.
4. 5 н. раствор гидроксида натрия.
5. 1 н. раствор гидроксида натрия.
6. Калия карбонат безводный.
7. н-Бутанол.
8. Хлороформ.
9. Смесь бутанола и хлороформа 3 : 2.

10. Ионообменная смола КБ-4П-2 или КБ-4 с размером частиц 0,1-0,2 мм. Смолу размалывают до указанного размера, промывают 1 н. раствором гидроксида натрия, три раза водой. Повторяют промывание 3 раза. Помещают смолу в хроматографическую колонку диаметром 5 мм. Высота - 10 мм. Перед анализом через колонку пропускают 1 мл бутанола.

11. 1 н. раствор соляной кислоты.

12. 0,1 н. раствор соляной кислоты.

13. 96 %-ный этиловый спирт.

14. 0,1 %-ный раствор ортофталевого альдегида в этиловом спирте.

15. 1,5 М раствор ортофосфорной кислоты.

16. 0,33 М раствор фосфата натрия.

17. 0,1 М водный раствор нингидрина.

18. Стандартный раствор серотонина. 1 мг серотонина растворяют в 1 мл воды. 0,1 мл этого раствора - в 10 мл 1 н. соляной кислоты.

19. Стандартный раствор гистамина. 1 мг гистамина растворяют в 1 мл воды. 0,1 мл этого раствора - в 10 мл 1 н. соляной кислоты.

Сбор и хранение материала

В центрифужную пробирку с 2 мл 10 %-ной трихлоруксусной кислоты вносят 0,5 мл крови, перемешивают, оставляют на 30 минут для экстракции. Ткани и органы быстро извлекают, взвешивают и гомогенизируют в 10 %-ной трихлоруксусной кислоте (10 мл на 1 г ткани). Так же как и кровь, материал для экстракции выдерживают 30 минут. При необходимости можно оставить в холодильнике на 1-2 суток. Затем перемешивают и центрифугируют 15 минут при 3000 об/мин. Если экстракт остается при этом мутным, его фильтруют через мелкопористый фильтр. Материал может храниться несколько дней в холодильнике.

Ход работы

В качестве биологического материала используют слюну человека, перед забором пробы которой обследуемый промывает ротовую полость кипяченой водой и обсушивает салфеткой.

В центрифужные пробирки, содержащие 4 мл 1 н. раствора хлорной кислоты, вносят 1 мл слюны, тщательно перемешивают, выдерживают 30 минут для экстракции, а при необходимости можно оставить в холодильнике на 1-2 суток. Затем перемешивают и центрифугируют 15 минут при 3000 об/мин. При необходимости материал можно хранить в замороженном состоянии. При этом потери исследуемого вещества при хранении в течение одного месяца не превышают 3-5 %.

Далее к 4 мл экстракта прибавляют 2 г карбоната калия и 5 мл смеси бутанола и хлороформа в соотношении 3 : 2, встряхивают 3 минуты. После этого пробы центрифугируют 3 минуты при 3000 об/мин, отсасывают 4 мл органической фазы и пропускают через хроматографическую колонку с диамет-

ром 3 мм и высотой 16 мм и с помещенной в нее ионообменной смолой КБ-4 или КБ-4П-2 или Bio Rex-70 в H^+ -форме, размер гранул $0,1 \pm 0,02$ мм. Колонку промывают 1 мл этилового спирта, 3 мл воды и элюируют гистамин 4 мл 0,1 н. соляной кислоты при скорости движения элюирующего раствора 0,4 мл/мин. Для восстановления работоспособности колонку промывают 10 мл 1 н. соляной кислоты, затем 10 мл воды. Хранить ионообменную смолу следует в воде.

К элюату приливают 0,15 мл 5 н. раствора гидроксида натрия, 0,1 мл 0,1 %-ного раствора ортофталевого альдегида в этиловом спирте, тщательно перемешивают. Через 4 минуты приливают 0,5 мл 1,5 М раствора ортофосфорной кислоты, перемешивают. Величину флуоресценции измеряют при длине волны 470 нм, используя для возбуждения светофильтр с максимумом пропускания 365 нм на флуориметре «БИАН-130». Интенсивность свечения стабильна в течение 30 минут.

Для определения серотонина к органической фазе, прошедшей через хроматографическую колонку, добавляют 0,33 М раствора фосфата натрия для доведения рН до 6,5-7. Затем приливают 0,1 мл 0,1 М раствора нингидрина, перемешивают и помещают в термостат на 30 минут при температуре $75^\circ C$. Охлаждают в воде и через час измеряют флуоресценцию при длине волны 470 нм. Длина волны возбуждения - 365 нм.

Расчет концентрации гистамина или серотонина производят по формуле

$$x = \frac{E_{op} - E_k}{E_{st} - E_k},$$

где x – концентрация гистамина (серотонина) в мкмоль/л;

E_{op} – флуоресценция исследуемой пробы;

E_{st} – флуоресценция стандартной пробы;

E_k – флуоресценция контрольной пробы.

По определенной интенсивности флуоресценции или калибровочной кривой определяют концентрацию серотонина и гистамина, повышенная концентрация которых свидетельствует об увеличении уровня этих веществ в организме, о повышении их концентрации в крови. Понижение содержания любого из этих веществ в слюне свидетельствует соответственно об уменьшении их количества в организме.

Лабораторная работа № 15
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГИСТАМИНА
КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ
(Н.В. Климкина, С.И. Питман, 1973)

Основой метода является реакция гистамина с диазотированным паранитроанилином, в результате которой образуется окрашенное соединение. Его оптическая плотность при длине волны 540 нм пропорциональна концентрации.

Цель работы: определить концентрацию гистамина в крови колориметрическим методом.

Реактивы

1. 10 %-ный раствор трихлоруксусной кислоты.
 2. 7 %-ный раствор аскорбиновой кислоты. Готовится перед использованием.
 3. 5 н. раствор гидроксида натрия.
 3. 1 н. раствор гидроксида натрия.
 4. Карбонат натрия безводный.
 5. 20 %-ный раствор карбоната натрия.
 6. Смесь бутанола и хлороформа 3:2.
 7. Концентрированная соляная кислота (36 %-ная HCl).
 8. 1 н. раствор соляной кислоты.
 9. 0,5 н. раствор соляной кислоты.
 10. Тимоловый синий. 10 мг индикатора растворить в 10 мл воды с добавлением 0,1 мл 1 н. гидроксида натрия.
 11. 4 %-ный раствор нитрита натрия.
 12. 0,1 %-ный раствор паранитроанилина. К 100 мг реактива приливают 3 мл концентрированной соляной кислоты и нагревают на кипящей водяной бане до растворения. Доводят объем до 100 мл.
 13. Диазореактив. Готовят перед употреблением смешиванием 10 мл раствора № 12 и 1 мл раствора № 11.
 14. Стандартный раствор гистамина. 1 мг гистамина гидрохлорида растворяют в 1 мл воды, 0,1 мл этого раствора - в 10 мл 1 н. соляной кислоты.
- Рабочий раствор. Перед анализом к 1 мл стандартного раствора добавляют 9 мл 10 %-ного раствора трихлоруксусной кислоты (концентрация 1 мкг/мл).

Сбор и хранение материала

В центрифужные пробирки с 4 мл 10 %-ного раствора трихлоруксусной кислоты вносят 1 мл крови, тщательно перемешивают, оставляют на 30 минут для экстракции. Ткани и органы лабораторных животных быстро извлекают, взвешивают и гомогенизируют в 10 %-ном растворе трихлоруксусной

кислоты (10 мл на 1 г ткани). Так же как и кровь, гомогенат выдерживают для экстракции 30 минут; при необходимости можно оставить в холодильнике на 1-2 суток. Затем перемешивают и центрифугируют 15 минут при 3000 об/мин. Материал можно хранить в замороженном состоянии. Потери исследуемых веществ¹ при хранении в течение 1 месяца не превышают 3-5 %.

Ход работы

К 4 мл экстракта добавляют 0,2 мл раствора аскорбиновой кислоты и 1 каплю тимолового синего, перемешивают. После этого прибавляют по каплям 5 н. раствор гидроксида натрия до появления светло-красной окраски. Перемешивают после каждой капли. Затем приливают 1 н. раствор гидроксида натрия до светло-желтой окраски. Если раствор окрасится в синий цвет (щелочная реакция), немедленно добавляют каплю 1 н. соляной кислоты до появления желтой окраски. Добавляют 2 г безводного карбоната натрия, перемешивают. Затем приливают 5 мл смеси бутанола и хлороформа, энергично встряхивают 3 минуты. После расслоения фаз 4 мл органической фазы (верхний слой) переносят в другой флакон, куда добавляют 3 мл 0,5 н. раствора соляной кислоты и встряхивают 3 минуты. После расслоения отсасывают 2 мл водной фазы.

К экстракту приливают 0,5 мл нитрата натрия, перемешивают и помещают в кипящую водяную баню на 2 минуты. Затем охлаждают в воде со льдом и добавляют 0,5 мл диазореактива, 1 мл карбоната натрия и 0,15 мл гидроксида натрия, перемешивая после прибавления каждого реактива.

Измерение оптической плотности производят на спектрофотометре при длине волны 540 нм в кюветах шириной 10 мм.

Стандарт. Со смесью 0,1 мл стандартного раствора гистамина и 4 мл 10%-ной трихлоруксусной кислоты выполняют все вышеописанные процедуры.

Контроль. С 4 мл 10 %-ной трихлоруксусной кислоты выполняют описанную методику.

Расчет концентрации гистамина или серотонина производят по формуле

$$x = \frac{E_{op} - E_k}{E_{st} - E_k},$$

где x – концентрация гистамина в мкмоль/л;
 E_{op} – флуоресценция исследуемой пробы;
 E_{st} – флуоресценция стандартной пробы;
 E_k – флуоресценция контрольной пробы.

Лабораторная работа № 16
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГИСТАМИНА В СЛЮНЕ
КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Цель работы: определить концентрацию гистамина в слюне колориметрическим методом.

Реактивы

1. 10 %-ный раствор трихлоруксусной кислоты.
 2. 7 %-ный раствор аскорбиновой кислоты. Готовится перед использованием.
 3. 5 н. раствор гидроксида натрия.
 3. 1 н. раствор гидроксида натрия.
 4. Карбонат натрия безводный.
 5. 20 %-ный раствор карбоната натрия.
 6. Смесь бутанола и хлороформа 3 : 2.
 7. Концентрированная соляная кислота (36 %-ная HCl).
 8. 1 н. раствор соляной кислоты.
 9. 0,5 н. раствор соляной кислоты.
 10. Тимоловый синий. 10 мг индикатора растворить в 10 мл воды с добавлением 0,1 мл 1 н. гидроксида натрия.
 11. 4 %-ный раствор нитрита натрия.
 12. 0,1 %-ный раствор паранитроанилина. К 100 мг реактива приливают 3 мл концентрированной соляной кислоты и нагревают на кипящей водяной бане до растворения. Доводят объем до 100 мл.
 13. Диазореактив. Готовят перед употреблением смешиванием 10 мл раствора № 12 и 1 мл раствора № 11.
 14. Стандартный раствор гистамина. 1 мг гистамина гидрохлорида растворяют в 1 мл воды, 0,1 мл этого раствора - в 10 мл 1 н. соляной кислоты.
- Рабочий раствор. Перед анализом к 1 мл стандартного раствора добавляют 9 мл 10 %-ного раствора трихлоруксусной кислоты (концентрация - 1 мкг/мл).

Ход работы

В качестве биологического материала используют слюну человека, перед забором пробы которой обследуемый промывает ротовую полость кипяченой водой.

В центрифужные пробирки, содержащие 4 мл 10 %-ного раствора трихлоруксусной кислоты, вносят 1 мл слюны, тщательно перемешивают, оставляют на 30 мин для экстракции, а при необходимости можно оставить в холодильнике на 1-2 суток. Затем перемешивают и центрифугируют 15 минут при 3000 об/мин. При необходимости материал можно хранить в заморожен-

ном состоянии. При этом потери исследуемого вещества при хранении в течение одного месяца не превышают 3-5 %.

Далее к 4 мл экстракта добавляют 0,1 мл 57 %-ной хлорной кислоты, 5 мл эфира и встряхивают 1 мин. Эфир отсасывают, приливают еще 5 мл эфира, снова встряхивают. Такое промывание повторяют 3 раза. Затем к пробам прибавляют 2 г карбоната калия и 5 мл бутанола, встряхивают 3 минуты. После этого пробы центрифугируют 3 минуты при 3000 об/мин, отсасывают 4 мл органической фазы и пропускают через хроматографическую колонку с диаметром 3 мм и высотой 10 мм и с помещенной в нее ионообменной смолой. Колонку промывают 1 мл этилового спирта, 3 мл воды и элюируют гистамин 2 мл 0,2 н. соляной кислоты. Для восстановления работоспособности колонку промывают 10 мл 1 н. соляной кислоты, затем 10 мл воды. Хранить ионообменную смолу следует в воде.

К экстракту приливают 0,5 мл 4 %-ного нитрита натрия, перемешивают и помещают в кипящую водяную баню на 2 минуты. Затем охлаждают в воде со льдом и добавляют 0,5 мл диазореактива, получаемого при смешивании 10 мл 0,1 %-ного раствора пара-нитроанилина в 0,1 н. соляной кислоте с 1 мл 4 %-ного нитрита натрия, 1 мл карбоната натрия и 0,15 мл гидроксида натрия, перемешивая после прибавления каждого реактива.

Измерение оптической плотности производят на фотоколориметре при длине волны 540 нм в кюветках шириной 10 мм.

По определенной оптической плотности или калибровочной кривой определяют концентрацию гистамина, повышенная концентрация которого свидетельствует о гипергистаминемии.

Расчет концентрации гистамина производят по формуле

$$x = \frac{E_{op} - E_k}{E_{st} - E_k},$$

где x – концентрация гистамина (серотонина) в мкмоль/л;

E_{op} – флуоресценция исследуемой пробы;

E_{st} – флуоресценция стандартной пробы;

E_k – флуоресценция контрольной пробы.

Тема 5

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ

Глюкокортикоиды - гормоны, образующиеся в корковом веществе надпочечников. По химической природе являются производными циклопентанопергидрофенантрена. Оказывают регулирующее влияние на углеводный обмен. Содержание глюкокортикоидов в крови повышается при экстремальных, стрессовых ситуациях, физических воздействиях. Концентрация подвержена суточным и сезонным колебаниям.

Метод определения кортикостероидов включает следующие этапы: сбор и хранение материала, выделение из него кортикостероидов (экстракция, очистка экстракта), количественное исследование.

Во время взятия крови необходимо соблюдать следующие условия: устранить все факторы, вызывающие напряжение (стресс); для предотвращения влияния липидов на процесс очистки и экстракции производить взятие крови натощак; ввиду имеющегося суточного ритма содержания кортикостероидов в крови следует стандартизировать время забора крови. Плазму необходимо отделить от эритроцитов как можно быстрее, после чего ее можно хранить в замороженном состоянии несколько дней.

Стероиды выделяют из крови экстракцией хлороформом. Однако хлороформный экстракт содержит наряду с кортикостероидами значительное количество различных примесей - липидов, пигментов. Поэтому перед проведением количественного определения гормонов требуется очистка экстракта. Для этого перед экстракцией часть примесей удаляют из биологического материала с помощью гексана. Затем хлороформный экстракт промывают слабым раствором щелочи (2 %-ный карбонат натрия).

Флуориметрическое определение базируется на свойстве стероидов флуоресцировать в растворах крепкой серной кислоты и этилового спирта. Причем 95 % всей флуоресценции анализируемой плазмы приходится на долю кортизола и кортикостерона.

Лабораторная работа № 17

ОПРЕДЕЛЕНИЕ 11-ОКСИКОРТИКОСТЕРОИДОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ

(Ю.А. Панков, И.Я. Усватова, 1965, в модификации В.Г. Подковкина, 1988)

Цель работы: определить концентрацию 11-оксикортикостероидов в плазме крови.

Реактивы

1. Гексан, дважды перегнанный в колбе с дефлегматором.
2. Хлороформ.
3. 2 %-ный раствор карбоната натрия.

4. Серная кислота концентрированная химически чистая, выдерживающая пробу Саваяля.

5. 96 %-ный этиловый спирт, дважды перегнанный.

6. Смесь спирта и серной кислоты 3 : 7 по объему. Готовится перед использованием. Налить в колбу спирт, затем кислоту, перемешать, охладить в воде.

7. Стандартный раствор. 0,1 мл гидрокортизона из флакона (концентрация - 25 мг/мл) развести в 2,5 мл спирта.

Рабочий раствор. 0,1 мл стандартного раствора развести в 10 мл спирта (10 мкг/мл).

Ход работы

1. В центрифужные пробирки, помещенные в специальный штатив, налить 0,7 мл воды и по 0,3 мл плазмы. Прилить 3 мл гексана. Встряхивать 1 минуту.

2. Тщательно отсосать гексан (верхний слой). К водной фазе добавить 5 мл хлороформа. Встряхивать энергично 3 минуты.

3. Удалить водную фазу (верхний слой). Добавить 1 мл раствора карбоната натрия. Встряхивать энергично 1 минуту.

4. Удалить водную фазу. Прилить 1 мл дистиллированной воды. Встряхивать 1 минуту. Центрифугировать 10 минут, 1500 об/мин.

5. Перенести 4 мл хлороформа (нижний слой) в другие центрифужные пробирки. Добавить 5 мл смеси спирта с серной кислотой. Встряхивать 1 минуту путем перевертывания штатива. Затем удалить весь хлороформ (верхний слой).

6. Флуориметрировать через час после встряхивания. Светофильтры 436 нм (первичный) и 510 нм (вторичный).

При выполнении анализов обрабатываются следующие пробы

1. *Стандарт.* К 5 мл смеси спирта и серной кислоты добавить 0,1 мл рабочего раствора гидрокортизона за 1 час до измерения. Тщательно перемешать. Встряхивать с 4 мл хлороформа. Хлороформ удалить.

2. *Контроль.* 5 мл смеси спирта и серной кислоты встряхивать с 4 мл хлороформа. Хлороформ удалить

3. *Опыт.*

Расчет производят по формуле

$$x = 4,2 \frac{E_{op} - K}{E_{st} - K},$$

где x – определяемая концентрация кортикостероидов в плазме, мкг/мл;

E_{op} – флуоресценция опытной пробы;

K – флуоресценция контроля;

E_{st} – флуоресценция стандартной пробы.

Надпочечник взвешивают и гомогенизируют в 2 мл 15 %-ного этилового спирта.

Печень (500 мг) гомогенизируют в 5 мл 15 %-ного этилового спирта.

Слюну берут для анализа в количестве 1 мл.

При расчетах учитывают разведение.

Лабораторная работа № 18

ОПРЕДЕЛЕНИЕ 11-ОКСИКОРТИКОСТЕРОИДОВ В СЛЮНЕ

В результате проведенных экспериментальных исследований выявлены ранее неизвестные свойства слюны человека, а именно: между концентрациями 11-оксикортикостероидов в крови и в слюне существует положительная корреляционная связь.

В связи с этим установлена возможность и целесообразность использования в качестве биологической жидкости слюны для оценки функции коры надпочечников по определению в слюне концентрации 11-оксикортикостероидов.

Цель работы: определить концентрацию 11-оксикортикостероидов в слюне.

Реактивы

1. Гексан, дважды перегнанный в колбе с дефлегматором.
2. Хлороформ.
3. 2 %-ный раствор карбоната натрия.
4. Серная кислота концентрированная химически чистая, выдерживающая пробу Саваля.
5. 96 %-ный этиловый спирт, дважды перегнанный.
6. Смесь спирта и серной кислоты 3 : 7 по объему. Готовится перед использованием. Налить в колбу спирт, затем кислоту, перемешать, охладить в воде.
7. Стандартный раствор. 0,1 мл гидрокортизона из флакона (концентрация 25 мг/мл) развести в 2,5 мл спирта.

Рабочий раствор. 0,1 мл стандартного раствора развести в 10 мл спирта (10 мкг/мл).

Ход работы

В качестве биологической жидкости используют слюну человека, перед забором пробы которой обследуемый промывает ротовую полость кипяченой водой, просушивая полость салфеткой.

Сбор слюны производят в химически чистые пробирки в количестве 1 -3 мл.

Для анализа берут 0,5 мл слюны, добавляя 0,5 мл дистиллированной воды и 1 мл 50 %-ного этилового спирта. Затем приливают 3 мл гексана и

встряхивают в течение одной минуты. После этого удаляют гексан и в водной фазе добавляют 5 мл хлороформа, встряхивают в течение 3 минут.

После удаления водной фазы добавляют 1 мл 2 %-ного раствора карбоната натрия, встряхивают 1 минуту. Затем удаляют водную фазу, далее приливают 1 мл дистиллированной воды, встряхивают 1 минуту.

После этого центрифугируют смесь в течение 10 минут при 1500 об/мин.

Переносят 4 мл хлороформа в пробирки, содержащие 1,5 мл смеси 96 %-ного этилового спирта и 96 %-ной серной кислоты, выдерживающей пробу Саваля, в соотношении 3 : 7 по объему. Далее встряхивают в течение 1 минуты, удаляют хлороформ.

А через 1 час измеряют интенсивность флуоресценции на аппарате «БИАН-130». Длина волны возбуждения - 436 мкм, флуоресценции - 510 мкм.

Для определения концентрации 11-оксикортикостероидов сравнивают интенсивность флуоресценции исследуемой и стандартной проб, содержащих изучаемые гормоны известной концентрации в слюне:

$$x = 2,5 \frac{E_{on} - E_k}{E_{cm} - E_k},$$

где x — определяемая концентрация кортикостероидов в слюне, мкг/мл;

E_{on} - интенсивность флуоресценции опытной пробы;

E_{cm} - интенсивность флуоресценции стандартной пробы, содержащей 1 мкг гормонов;

E_k - интенсивность флуоресценции контрольной пробы, не содержащей гормонов.

При возрастании концентрации 11-оксикортикостероидов в исследуемой слюне делают вывод об усилении функции коры надпочечников, а при уменьшении концентрации - о снижении функции коры надпочечников.

Лабораторная работа № 19

ОПРЕДЕЛЕНИЕ 17-ОКСИКОРТИКОСТЕРОИДОВ В МОЧЕ ПО РЕАКЦИИ С ФЕНИЛГИДРАЗИНОМ ПОСЛЕ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА

(метод Silber, Porter, 1957, в модификации Н.А. Юдаева
и М.А. Креховой, 1960)

Метод основан на измерении количества окрашенных веществ, образующихся в результате реакции между фенилгидразином и 17, 21-диокси-ацетоновой группировкой молекулы стероида в кислой среде. Глюкуроиды 17, 21-диокси-20-кетостероидов освобождаются из связанного состояния путем ферментативного гидролиза Р-глюкуронидазой.

Цель работы: определить концентрацию 11-оксикортикостероидов в моче.

Реактивы

1. Хлороформ химически чистый свежеперегнанный.

Вместо хлороформа можно использовать в тех же количествах метиленадихлорид.

Лучшие результаты достигаются при применении хлороформа для наркоза. Для определения 17-ОКС в моче бывает достаточно одной перегонки этого хлороформа над безводным углекислым натрием (добавляемым в количестве 30-40 г на 1 л хлороформа). Первые и последние 30-40 мл хлороформа при перегонке удаляют.

2. 0,1 н. раствор едкого натра.

3. 2 н. раствор едкого натра.

4. Солянокислый фенилгидразин, дважды перекристаллизованный из спирта, последнюю перекристаллизацию проводят из очищенного этилового спирта. 5-10 г вещества растворяют в 30-40 мл этанола при нагревании, непрерывно встряхивая сосуд круговыми движениями и периодически делая перерывы на 20-30 с. Охлаждают содержимое вначале при комнатной температуре, а затем в холодильнике (не менее 1 ч) до полной кристаллизации. Кристаллы переносят в бюхнеровскую воронку с двумя бумажными фильтрами, высушивают под вакуумом, который создают в колбе Бунзена. Процедуру повторяют от начала до конца еще раз. Высушивают фенилгидразин до постоянного веса, хранят в темноте в эксикаторе на протяжении 2-3 месяцев.

5. Разбавленная серная кислота. 310 мл концентрированной серной кислоты (выдерживающей пробу Савая) приливают осторожно к 190 мл дистиллированной воды.

6. Серноспиртовой реактив. 100 мл разбавленной серной кислоты смешивают с 150 мл абсолютного свежетожденного этилового спирта.

7. Этиловый спирт очищенный.

8. Фенилгидразиновый реактив. 21,7 г солянокислого фенилгидразина, дважды перекристаллизованного из спирта, растворяют в 50 мл спиртового раствора серной кислоты.

9. Ацетатный буфер, рН 4,5. 5,79 г уксуснокислого натрия растворяют в 10 мл дистиллированной воды, добавляют 3,25 мл ледяной уксусной кислоты и смесь доводят до 1 л дистиллированной водой.

10. Стандартный раствор кортизона или гидрокортизона (20 мкг в 1 мл). Навеску в 1 мг стандарта растворяют в 50 мл дважды отогнанного метанола или хлороформа. Стандартный раствор держат в стеклянной посуде, обернутой черной светонепроницаемой бумагой, в холодильнике.

11. Безводный сернокислый натрий ч. д. а. или х. ч.

12. 2 н. раствор соляной кислоты.

13. Метанол, дважды отогнанный.

14. р-глюкуронидаза с активностью не менее 100 000 ед. в 1 г препарата.

Перед анализом навеску порошка Р-глюкуронидазы, содержащую 500 ед. активности на 1 мл мочи, растворяют в центрифужной пробирке в 11 мл дистиллированной воды, периодически помешивая ее содержимое в течение 30 минут. Центрифугированием при 3000 об/мин на протяжении 1-2 минут отделяют осадок. Раствор готовят перед применением в соответствии с количеством мочи, подлежащей обработке. Цррошок хранят в холодильнике в посуде с притертой пробкой.

Ход работы

Измеряют суточное количество мочи и отбирают 50 мл ее. рН мочи доводят до 6,5, добавляя каплями в пробу 2 н. едкий натр или 2 н. соляную кислоту (при этом допустимо пользоваться универсальной индикаторной бумагой). Из этой пробы в две эрленмейеровские колбы вносят по 10 мл подкисленной мочи (для установления свободных 17-ОКС). К ним доливают по 5 мл ацетатного буфера и пробы помещают до следующего дня в холодильник для дальнейшей обработки. Затем в две эрленмейеровские колбы приливают еще по 5 мл подкисленной мочи (для определения связанных 17-ОКС). Эти пробы кипятят (на электрической плитке) в течение 5 минут для удаления ингибитора фермента, прикрывая их воронками, чтобы не выпаривалась вода. После этого охлаждают их до комнатной температуры и добавляют в каждую колбу по 5 мл ацетатного буфера, по 5 мл раствора Р-глюкуронидазы. Пробы ставят в термостат на 16-20 ч при температуре +37° С.

Для экстракции кортикостероидов из мочи хлороформом все 4 пробы (2 колбы мочи без гидролиза и 2 - после гидролиза) переносят в делительные воронки (емкостью 150 мл) и доливают к ним по 75 мл (5-кратный объем) очищенного и дважды перегнанного хлороформа. При отсутствии делительных воронок экстракционные процедуры можно проводить в самих колбах. Хлороформ вливают порциями, обмывая им внутренние стенки колбы (для более полного использования мочи). Делительные воронки плотно закрывают пробками, энергично встряхивают в течение 2 минут и оставляют в штативах для расслаивания фаз. Затем удаляют верхний слой мочи обычным сливанием (если экстракцию осуществляют в делительных воронках) или осторожным отсасыванием капиллярной пипеткой с помощью водоструйного насоса, начиная с проб без гидролиза. Энергичным встряхиванием промывают хлороформные экстракты сначала 7,5 мл 6,1 н. раствора едкого натра, а затем (после расслаивания фаз) 3 мл воды. После встряхивания в течение 15 с верхний слой удаляют. Для освобождения от остатков воды к пробам прибавляют по 2 г безводного серноокислого натрия. Колбы плотно закрывают пробками и вновь встряхивают. Ставят в холодильник на 2 ч (или до следующего дня). После этого отмеривают цилиндром в чистые круглодонные колбы с притертыми пробками по 50 мл каждого хлороформного экстракта (2/3 от цельного количества), осторожно сливая хлороформ с осадка или отфильтровывая его от порошка серноокислого натрия.

Экстракцию хлороформных экстрактов мочи и стандартного вещества фенилгидразиновым реактивом, развитие окраски проб осуществляют исходя из того, что из имеющихся двух проб мочи без гидролиза и двух проб мочи после гидролиза каждая первая проба будет служить контрольной на неспецифическую окраску, развивающуюся от действия серной кислоты. Поэтому к каждой первой пробе прибавляют по 4 мл спиртового раствора серной кислоты без фенилгидразина, а к каждой второй пробе и стандартному раствору (1 мл стандартного раствора выпаривают досуха, а затем растворяют в 50 мл хлороформа) приливают по 4 мл спиртового раствора серной кислоты с фенилгидразином. Все колбы плотно закрывают притертыми пробками и энергично встряхивают на протяжении 2 минут. Оставляют их в штативе для рас-сдаивания фаз, а затем капиллярной пипеткой, соединенной с водоструйным насосом, отсасывают нижний хлороформный слой (из-за опасности отсосать верхний слой перед опусканием пипетки в раствор зажимают каучуковый шланг, соединяющий пипетку с водоструйным насосом, отпускают шланг только тогда, когда пипетка коснется дна колбы). Для развития окраски все пробы с реактивами инкубируют в водяной бане при +60° С в течение 20 минут, затем охлаждают в водопроводной воде.

Измерение интенсивности окраски производят на спектрофотометре типа СФ-26 (СФ-4, СФ-4А, СФ-16 и другие) в кюветках с толщиной слоя 10 мм (общий объем кюветы - 4 мл) при длине волны 410 нм или на ФЭКе с синим светофильтром. Компенсационной жидкостью служит чистый реактив - спиртовой раствор серной кислоты. Оптическую плотность опытных проб и стандартного раствора измеряют путем сравнения с экстинкцией спиртового раствора серной кислоты с фенилгидразином.

Расчет. Сначала рассчитывают количество свободных 17-ОКС.

Содержание свободных 17-ОКС в пробе (без гидролиза) находят из соотношения:

$$\frac{C_1}{E_1 - E_2} = \frac{C}{E_3},$$

где C_1 – количество 17-ОКС в пробе без гидролиза (мкг); E_1 – оптическая плотность опытной пробы без гидролиза; E_2 – оптическая плотность контрольной пробы без гидролиза; E_3 – оптическая плотность стандартного раствора (за вычетом экстинкции контрольной пробы к стандартной); C – количество стандарта (мкг).

Если отношение $\frac{C}{E_3}$ выразить через Q , то формула приобретет вид

$$C_1 = (E_1 - E_2)Q.$$

Количество свободных 17-ОКС в суточной моче рассчитывают по формуле

$$x = \frac{C_1 a}{10 \cdot 2/3 \cdot 1000}, \text{ или } \frac{C_1 3a}{10 \cdot 2 \cdot 1000},$$

где x – количество свободных 17-ОКС в суточной моче (мг); $\frac{C_1}{10 \cdot 2/3}$ – содержание (мкг) свободных 17-ОКС в 1 мл мочи; $(10 - \text{количество мочи (мл) в пробе}; 2/3 - \text{часть хлороформного экстракта, использованного для анализа}); a$ – суточное количество мочи (мл); 1000 – коэффициент для перевода из мкг в мг.

Количество суммарных 17-ОКС (мкг) в пробе рассчитывают по той же формуле, что и для свободных:

$$C_2 = (E_{\text{оп. проба с гидрол.}} - E_{\text{к. проба после гидрол.}}) Q.$$

Экскрецию суммарных 17-ОКС с суточной мочой (мг) находят следующим образом:

$$x = \frac{C_2 a}{5 \cdot 2/3 \cdot 1000}, \text{ или } \frac{C_2 3a}{5 \cdot 2 \cdot 1000},$$

где x – количество суммарных 17-ОКС в суточной моче (мг); $\frac{C_2}{5 \cdot 2/3}$ – содержание (мкг) суммарных 17-ОКС в 1 мл мочи.

Для перевода размерности мг/сут в мкмоль/сут первый показатель умножают на коэффициент 2,76.

Уровень суточной экскреции свободных 17-ОКС колеблется в норме от 0,04 до 0,28 мг/сут (0,38 мкмоль/сут). Содержание суммарных 17-ОКС в суточной моче варьирует от 1,31 до 7,39 мг (3,6-20,4 мкмоль), в среднем 3,7 мг (10,2 мкмоль).

Как видно, на долю свободных 17-ОКС в моче приходится от 1 до 7% от общего их количества.

Лабораторная работа № 20

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ - ВЛИЯНИЯ НА КОНЦЕНТРАЦИЮ ОКСИПРОЛИНА В СЛЮНЕ

В качестве биологического материала, который берется у обследуемого человека, обычно используется кровь. Как известно, для забора крови необходим стерильный процедурный кабинет, опытный медперсонал, одноразовые шприцы. Это вызывает необходимость в соответствующих материальных расходах (зарплата медсестры и другого персонала для поддержания стерильности в процедурном кабинете, приобретение расходуемых материалов). При взятии крови из вены в медицинской практике в ряде случаев имеет место повреждение кровеносного сосуда, иногда с последующими нарушениями кровообращения. Встречается занос инфекций в кровь, известны случаи заражения гепатитом и ВИЧ. Подобные явления происходят нечасто и, как правило, из-за недостаточной квалификации медперсонала. Эти обстоятельства, а также болевые и

другие неприятные ощущения и эмоции часто служат причиной отказа части больных от обследования. Тем более нежелательно взятие крови из вены в тех случаях, когда необходимо проведение серии анализов с небольшими промежутками времени. Соотношение же свободного и пептидсвязанного оксипролина в моче существенно отличается от имеющегося в крови.

Из данных литературы известно о том, что в слюне содержится оксипролин, но при этом отсутствуют данные о взаимосвязи между концентрацией свободного и белковосвязанного оксипролина в крови и слюне. Экспериментально выявлена положительная корреляционная связь между концентрацией свободного и белковосвязанного оксипролина в сыворотке крови и слюне. Коэффициент корреляции у практически здоровых людей для свободного оксипролина $r = 0,61$, для белковосвязанного $r = 0,62$. У обследованных 22 больных язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки коэффициент корреляции между содержанием свободного оксипролина в слюне и сыворотке крови составил 0,75, а белковосвязанного - 0,77. Этими данными обосновывается возможность и целесообразность использования слюны для оценки метаболизма коллагена в организме по определению концентрации оксипролина в слюне.

Цель работы: определить концентрацию оксипролина в слюне.

Реактивы

1. Раствор окислителя.

7 %-ный водный раствор хлорамина Б. Сохраняет свою активность в темноте при комнатной температуре в течение нескольких недель.

Ацетат-цитратный буфер (рН 6.0). Для его приготовления растворяют в воде 57 г ацетата натрия тригидрата; 45,5 г трехзамещенного цитрата натрия 5,5 г лимонной кислоты моногидрата и 385 мл изопропилового спирта и доводят водой до 1 л. Непосредственно перед определением растворы хлорамина Б и ацетат-цитратный буфер смешивают в отношении 1 : 4.

2. Изопропиловый спирт.

3. Реактив Эрлиха.

п-Диметиламинобензальдегид растворяют в 57 %-ной хлорной кислоте (НСЮ_3) в отношении 2 г альдегида на 3 мл кислоты. Раствор стабилен в течение 3 недель в темной склянке при комнатной температуре.

Перед определением оксипролина 3 объема раствора п-диметиламинобензальдегида смешивают с 13 объемами изопропилового спирта (реактив Эрлиха)

4. Стандартный раствор оксипролина (1 мг/100 мл).

Готовят в 1 мм растворе соляной кислоты (0,44 мл концентрированной кислоты доводят дистиллированной до 500 мл). Раствор хранится при 4° С в течение нескольких месяцев.

5. 6 н. раствор серной кислоты.

6. Этиловый спирт.

Ход работы

При определении свободного оксипролина к 4 мл слюны обследуемого человека прибавляют 16 мл этилового спирта, перемешивают, центрифугируют в течение 15 минут при скорости 3000 об/мин.

Надосадочную жидкость выпаривают на водяной бане. К сухому остатку приливают 0,3 мл воды и перемешивают. К 0,25 мл пробы прибавляют 0,25 мл изопропилового спирта, перемешивают, прибавляют 0,25 мл окислителя и тщательно перемешивают. Через 4 минуты прибавляют 1,5 мл реактива Эрлиха и перемешивают.

Далее помещают пробу в водяную баню при 60° С на 30 минут. После инкубации пробу охлаждают до комнатной температуры. Затем измеряют оптическую плотность опытной и стандартной проб против контроля на фотозлектроколориметре при длине волны 540 нм в кювете 0,5 см.

При определении белковосвязанного оксипролина к 4 мл слюны прибавляют 16 мл этилового спирта, перемешивают и центрифугируют в течение 15 минут со скоростью 3000 об/мин. Надосадочную жидкость сливают, прибавляют 1,5 мл насыщенного раствора гидроксида бария, перемешивают и переносят в ампулу для гидролиза, который проводят в течение 20 ч при температуре 124° С.

Далее гидролизат нейтрализуют 1-2 каплями 6 н. раствора серной кислоты до рН 5,5-5,6 и измеряют объем жидкости.

Нейтрализат пропускают через хроматографическую колонку с ионообменной смолой КРС-8п в Н-форме с диаметром гранул 0,1-0,25 мм, диаметр колонки - 3 мм, заполненной ионообменной смолой до высоты 6 мм и скоростью движения нейтрализата, равной 0,2 мл в минуту.

Затем оксипролин элюируют 1 мл 1 н. соляной кислоты, после чего солянокислый элюат нейтрализуют 5 н. гидроксидом натрия до рН 6,8-7.

К 0,25 мл полученного раствора приливают 0,25 мл изопропилового спирта, добавляют 0,25 мл окислителя и тщательно перемешивают. Через 4 минуты прибавляют 1,5 мл реактива Эрлиха и перемешивают.

Далее помещают пробы в водяную баню (60° С) на 30 минут. После инкубации охлаждают до комнатной температуры и измеряют оптическую плотность на фотозлектроколориметре при длине волны 540 нм и по калибровочной кривой определяют концентрацию оксипролина.

При диагностике и оценке метаболизма коллагена по повышенной концентрации свободного оксипролина в слюне судят об усилении распада коллагена в организме человека, а по повышенной концентрации белковосвязанного оксипролина в слюне - об усилении процессов биосинтеза коллагена. Известно влияние глюкокортикоидов на эти процессы.

Тема 6

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭЛЕКТРОЛИТОВ В КРОВИ И МОЧЕ МЕТОДОМ ПЛАМЕННОЙ ФОТОМЕТРИИ

Метод пламенной фотометрии основан на способности атомов различных химических элементов возбуждаться и испускать лучи света определенной длины волны при сжигании солей минеральных веществ в пламени. Излучения различных элементов выделяют с помощью специальных светофильтров. Попадая на фотоэлемент, световой поток возбуждает фототок, который регистрируется гальванометром. Интенсивность свечения пропорциональна концентрации исследуемого элемента в биологическом материале.

Лабораторная работа № 21

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЛИЯ И НАТРИЯ В КРОВИ

Цель работы: определить концентрацию натрия и калия в плазме и эритроцитах крови человека и крысы.

Реактивы

1. Раствор соли натрия - 1 г/л. 2,5418 г хлористого натрия вносят в мерную колбу емкостью 1000 мл, растворяют и доводят до метки дистиллированной водой. 1 мл раствора содержит 1 мг натрия.

2. Раствор соли калия - 1 г/л. 1,9069 г хлористого калия помещают в мерную колбу емкостью 1000 мл, растворяют и доливают до метки дистиллированной водой. 1 мл раствора содержит 1 мг калия.

Ход работы

Рабочие стандартные растворы для определения калия в плазме крови готовят, беря за основу средний уровень калия (18 мг/100 мл; 4,62 ммоль/л) и натрия в плазме (310 мг/100 мл; 134,8 ммоль/л), а также используя разведение плазмы и эритроцитов 1 : 20.

В 5 мерных колб емкостью 100 мл вносят соответственно 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4 мл раствора соли калия, а затем в каждую из них добавляют по 16,5 мл основного стандартного раствора хлористого натрия.

Рабочие стандартные растворы для определения натрия в плазме крови готовят, учитывая применяемое разведение и эритроцитов плазмы 1 : 100 и средний уровень в ней натрия (134,8 ммоль/л). В 7 мерных колб емкостью 100 мл вносят соответственно 2,6; 2,8; 3,0; 3,4; 3,8; 4,0; 4,2 мл раствора соли натрия и доводят объем до метки дистиллированной водой.

Измерения количества калия и натрия производят на пламенном фотометре. Концентрацию рассчитывают с помощью калибровочной кривой.

Часть 2. АДАПТАЦИЯ ОРГАНИЗМА К ВОЗДЕЙСТВИЮ ФИЗИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Тема 1

ОЦЕНКА РЕАКЦИИ ОРГАНИЗМА НА ИЗЛУЧЕНИЯ КОМПЬЮТЕРНОГО ВИДЕОДИСПЛЕЙНОГО ТЕРМИНАЛА

Компьютеры находят все более широкое распространение и применение во всех областях современной жизни. Все большее количество людей становятся пользователями персональных компьютеров. Большинство используемых в настоящее время видеодисплейных терминалов имеют в основе своей конструкции электронно-лучевую трубку. Это устройство - источник электромагнитных излучений в широком диапазоне частот. Особенность работы на персональном компьютере, в отличие, например, от телевизора, заключается в том, что пользователь находится в непосредственной близости от экрана, что увеличивает интенсивность воздействия на него упомянутых излучений.

Результаты многочисленных исследований свидетельствуют о неблагоприятном влиянии электромагнитных излучений компьютерного видеодисплейного терминала и других сопутствующих факторов (определенной позы при работе, напряжения глаз) на организм пользователя.

При этом известны данные о различиях индивидуальной чувствительности к названным факторам. Выявление таких различий может позволить дать рекомендации о более щадящем режиме работы или о прекращении использования персонального компьютера лицам, у которых выявлена повышенная чувствительность к указанным воздействиям.

У обследуемого человека определяют концентрацию 11-оксикортикостероидов в слюне непосредственно перед работой на компьютере и через 30 минут после начала работы на компьютере. При увеличении концентрации 11-оксикортикостероидов в слюне обследуемого человека после работы на компьютере, если оно не превышает пределов физиологической нормы, делают вывод о нормальной реакции организма на излучения видеодисплейного терминала. В случае снижения концентрации 11-оксикортикостероидов в слюне - об отклонении от нормы реакции организма на излучения видеодисплейного терминала. В случае отсутствия изменений концентрации 11-оксикортикостероидов в слюне у обследуемого человека определяют их концентрацию в слюне через 60 минут после начала работы на компьютере. В этом случае аналогично при увеличении концентрации 11-оксикортикостероидов в слюне обследуемого человека после работы на компьютере, если оно не превышает пределов физиологической нормы, делают вывод о нормальной реакции организма на излучения видеодисплейного терминала. При снижении концентрации 11-оксикортикостероидов в слюне - об отклонении от нормы реакции организма на излучения.

Известно, что адаптация организма к различным неблагоприятным воздействиям окружающей среды, в том числе излучениям, зависит от функционального состояния гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы. В норме в процессе адаптации организма к внешним воздействиям идет увеличение секреции глюкокортикоидов. Однако когда адаптационно-компенсаторные механизмы нарушены, этого не происходит, отмечается отсутствие такой реакции со стороны коры надпочечников.

У пользователей персональных компьютеров обычно наблюдается увеличение концентрации глюкокортикоидов в крови. При этом заявители обнаружили, что у некоторых лиц систематически после работы на персональном компьютере отмечается снижение секреции глюкокортикоидов. Эти лица (а также для сравнения и те, у которых наблюдалась нормальная реакция коры надпочечников) были нами обследованы по ряду показателей: частота сердечных сокращений, артериальное давление, время и скорость нахождения колец Ландольта, показатель внимания, количество ошибок, субъективные показатели (самочувствие, активность, настроение), ряд биохимических показателей и другие тесты.

Анализ полученных данных показал корреляцию исследованных показателей с концентрацией 11-оксикортикостероидов в слюне. Характер взаимосвязи свидетельствует о более выраженном отрицательном влиянии на организм человека воздействия компьютерного видеодисплейного терминала у лиц, для которых характерно снижение уровня 11-оксикортикостероидов в слюне через 30 минут после начала работы на компьютере. На эту группу людей компьютер влияет негативно, на это указывают, в частности, скачки артериального давления, уменьшение внимания, субъективных показателей самочувствия, активности и настроения.

Это может объясняться нарушением у них адаптационно-компенсаторных механизмов. Таким лицам можно рекомендовать ограничение времени работы на персональном компьютере и более глубокое обследование в соответствии с ранее известным способом.

В некоторых случаях у этой группы лиц в первые 30 минут работы на компьютере изменения концентрации 11-оксикортикостероидов в слюне могут отсутствовать, однако снижение этого показателя происходит в течение следующих 30 минут. Для них характерна эмоциональная неустойчивость, иногда с признаками расшатанности нервной системы.

У другой группы лиц с нормальными адаптационными процессами в начальный период работы на компьютере в первые 30 минут наблюдается возрастание уровня 11-оксикортикостероидов в слюне, одновременно улучшаются внимание, субъективные показатели самочувствия, артериальное давление практически не меняется. Им свойственна эмоциональная устойчивость (тест по Айзенку).

В некоторых случаях у этих лиц изменения концентрации 11-оксикортикостероидов в слюне в первые 30 минут могут отсутствовать, однако в течение следующих 30 минут при продолжении работы на компьютере происходит возрастание этого показателя.

Лабораторная работа № 22

РЕАКЦИЯ ОРГАНИЗМА НА ИЗЛУЧЕНИЯ КОМПЬЮТЕРНОГО ВИДЕОДИСПЛЕЙНОГО ТЕРМИНАЛА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТЕПЕНИ АДАПТАЦИИ СЕРДЦА К ФИЗИЧЕСКИМ НАГРУЗКАМ

Для оценки степени адаптации сердца к физическим нагрузкам используют сердечно-сосудистую пробу Руфье-Диксона. У испытуемого, находящегося в положении лежа не менее 5 минут, определяют число пульсаций за 15 с (P1). Затем в течение 45 секунд испытуемый должен выполнять 30 приседаний, после чего он садится и у него вновь подсчитывают число пульсаций за первые 15 с (P2), а затем в последние 15 с первой минуты периода восстановления (P3).

$$\text{Индекс Руфье-Диксона} = \frac{(4P2 - 70) + 4(P3 - P1)}{10}$$

При величине индекса Руфье-Диксона от 0 до 2,9 степень адаптации сердца к физическим нагрузкам считается высокой, от 3 до 5,9 - средней, от 6 до 8 - посредственной, больше 8 - низкой.

Цель работы: выявить особенности реакции организма на излучение компьютерного видеодисплейного терминала в зависимости от степени адаптации сердца к физическим нагрузкам.

Ход работы

1. Определяют индекс Руфье-Диксона у всех студентов находящейся на занятиях группы. Делят студентов на подгруппы в зависимости от величины индекса Руфье-Диксона.

2. Студенты работают за компьютером в течение 30 минут. До и после работы за компьютером у них определяют артериальное давление и пульс, а также собирают слюну для биохимического исследования.

3. Определяют концентрацию 11-оксикортикостероидов в слюне.

4. Делают выводы относительно особенностей реакции организма на излучение компьютерного видеодисплейного терминала в зависимости от степени адаптации сердца к физическим нагрузкам.

ТЕПЛОВОЙ ЭФФЕКТ МИКРОВОЛНОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

При изучении биологического действия радиоволн исключительно важное значение имеет соблюдение ряда методических и технических приемов и требований, вытекающих из особенностей взаимодействия электромагнитного поля и биологического объекта.

Многообразие применяемых методических приемов крайне затрудняет сопоставление и анализ результатов исследований, полученных разными авторами, и лишает возможности использовать эти данные при решении практических задач.

Изложенные рекомендации касаются технического обеспечения экспериментов, способов облучения, обоснования выбора объектов исследования, методов регистрации функций, а также некоторых закономерностей взаимодействия ЭМИ и биообъекта.

Биологическое действие радиоволн зависит в первую очередь от их параметров, а также анатомических особенностей объекта.

Характер и выраженность биологической реакции на облучение в значительной степени определяется параметрами воздействующего ЭМИ. Основными из них являются следующие.

1. Длина волны (частота колебаний). От нее зависят:

- глубина проникновения ЭМИ внутрь тканей организма;
- количество поглощенной и отраженной объектом энергии;
- дифракционные явления на поверхности тела;
- явления резонанса и другие процессы.

2. Интенсивность излучения измеряется:

- в диапазоне микроволн в Вт/см^2 (мкВт/см^2);
- в диапазоне радиоволн (длина волны более 1 м) в величинах напряженности электрического поля (В/м) и магнитного поля (А/м).

С интенсивностью облучения прежде всего связана степень выраженности реакции биологического объекта на воздействие.

3. Экспозиция характеризует время, в течение которого объект находится в зоне действия электромагнитного поля. Экспозиция складывается из времени фактического облучения биообъекта и времени его пребывания в зоне действия поля без облучения.

В зависимости от режима облучения (непрерывного или прерывистого) экспозиция может совпадать с временем фактического облучения или значительно его превосходить.

Прерывистые воздействия подразделяются на периодические и аperiodические. В первом случае целесообразно учитывать продолжительность каждого воздействия и частоту их следования, во втором - суммарную про-

должительность фактического воздействия ЭМИ в течение времени пребывания в зоне облучения.

Экспозицией определяется как выраженность реакции биологического объекта, так и возможность развития приспособительных и кумулятивных эффектов.

4. Плотность падающей (поглощенной) энергии выражается в мВтхмин/см² и определяется как произведение интенсивности облучения на экспозицию. Значение этого параметра в развитии биологического эффекта может существенно изменяться в зависимости от интенсивности и экспозиции.

5. Поляризация: линейная или эллиптическая. В зависимости от ориентации тела относительно плоскости поляризации количество поглощенной энергии, следовательно, и биологический эффект могут значительно различаться.

6. Модуляция (амплитудная, частотная) может вызывать некоторые специфические реакции организма.

Техническое обеспечение эксперимента имеет свои характерные особенности в зависимости от диапазона длин волн используемых ЭМИ, способа осуществления воздействия, размеров объекта и других условий.

1. В опытах с воздействием ЭМИ микроволнового диапазона (длина волны от 1 м до 0,1 мм) биологический объект может подвергаться общему (тотальному), одностороннему (сбоку, со стороны спины, живота и т. д.) или локальному (местному) облучению.

Основным видом облучения является такое, при котором поверхность тела подвергается равномерному воздействию ЭМИ. Для выполнения этого требования в исследованиях на крупных животных и людях необходимо:

- все опыты проводить в свободном пространстве или в помещениях, оборудованных радиопоглощающими материалами и лишенными предметов, отражающих ЭМИ. В наибольшей степени этому требованию соответствуют безэховые камеры. Камера изготавливается из металла, так как металлы не пропускают (отражают) ЭМИ. Изнутри она покрыта радиопоглощающим веществом. Это необходимо для того, чтобы внутри не происходило многократного отражения ЭМИ, что может вызвать неравномерное облучение. По этой причине камера называется безэховой. В ней создается эффект облучения в свободном пространстве. Удовлетворительные условия облучения создаются в достаточно большом зале с покрытием его задней (противоположной излучателю) стены радиопоглощающим материалом;
- биологический объект следует размещать на таком удалении от излучателя, которое отвечает условию формирования плоской электромагнитной волны (то есть в дальней зоне, на расстоянии не менее 3 - 4 длин волн);
- инструментальным методом определить интенсивность воздействия и оценить степень равномерности распределения ЭМИ в пределах об-

ласти пространства, занимаемого облучаемым объектом. Размер этой области определяется площадью проекции его тела на плоскость, перпендикулярную направлению распространения электромагнитной волны. Степень равномерности облучения контролируется путем измерения его интенсивности в 3-5 точках, соответствующих расположению головы, туловища, таза;

- не допускать наличия вблизи биологического объекта никаких металлических предметов (ошейники, детали фиксирующих устройств, электроды, отводящие провода и т. п.), искажающих структуру электромагнитного поля;
- соблюдать строго определенную поляризацию излучения, действующего на организм (во всех экспериментах она должна быть постоянной относительно продольной оси биообъекта);
- исходя из данных о пространственном распределении ЭМИ определить допустимый размер и количество одновременно экспонируемых объектов;
- крупные биообъекты (человек, собака) желательно экспонировать только по одному. При этом требуется выяснить структуру электромагнитного поля не только в месте расположения объекта, но и в экспериментальном помещении;
- максимальное количество одновременно облучаемых мелких экспериментальных животных (мыши, крысы, морские свинки) определяется степенью равномерности распределения ЭМИ в пределах области пространства, занимаемого всей группой животных.

Для снижения влияния взаимных отражений и искажений структуры поля рекомендуется медленно вращать блок фиксационных камер (клеток, пеналов) с биологическими объектами при облучении их сверху или снизу, а также периодически изменять места положения биообъектов в блоке при облучении сбоку.

2. При исследовании *in vitro* на микроорганизмах, биологически активных веществах и некоторых других объектах (молекулы, клетки, культуры тканей) облучение обычно осуществляется в раскрыве рупора или волноводе (резонаторе). В этих опытах требуется соблюдать следующие условия:

- строго контролировать количество падающей на объект, отраженной и проходящей энергии;
- обеспечить постоянство согласования генератора с волноводом (использовать для развязки аттенюаторы с достаточным ослаблением и волновода с нагрузкой), добиваясь одинаковой во времени отдачи мощности и постоянства коэффициента бегущей волны в тракте;
- учитывать вносимые биологическим объектом искажения в распределение электромагнитного поля - образование «горячих пятен» на облучаемой поверхности. Для выявления «горячих пятен» можно использовать визуальные методы регистрации ЭМИ: терморезистивную бумагу, жидкие кристаллы, люминофорные пленки и др.;

- применять кюветы, пробирки и др. сосуды, в которых производится облучение биологических сред, изготовленные из радиопрозрачных материалов (полистирол, плексиглас и т. п.);
- при перестройке частоты генератора учитывать изменение реакции нагрузки, возможность появления волн высших типов и образование за счет многократного отражения ЭМИ энергии пучностей при суперпозиции падающей и отраженной волн, приводящих к возникновению «горячих пятен».

3. При проведении локальных облучений рекомендуется осуществлять воздействия через отверстия (диафрагмы) в экранах из радиопоглощающих материалов или с помощью специальных контактных облучателей. При этом необходимо:

- во-первых, определить и поддерживать постоянной интенсивность облучения;
- во-вторых, при выборе участка тела, подлежащего воздействию, выяснить характер распределения электромагнитной энергии на выходе облучателя или в отверстии экрана в пределах подлежащей облучению области. Для определения структуры электромагнитного поля следует использовать методы его визуализации.

4. В экспериментах с воздействием на биообъект напряженности переменного электрического или магнитного поля (с длиной волны более 1 м) необходимо:

- для создания более равномерной напряженности поля, воздействующего на биологический объект, и исключения влияния краевых эффектов на интенсивность и равномерность облучения применять конденсаторы или катушки индуктивности (соленоиды) достаточно большого размера;
- стабилизировать величину напряжения на пластинах конденсатора, в котором находится животное, или силу тока в соленоиде.

ИЗУЧЕНИЕ ТЕПЛОВОГО ЭФФЕКТА МИКРОВОЛНОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Цель работы: выявить особенности теплового эффекта микроволнового излучения в зависимости от состава исследуемой жидкости.

Реактивы

1. Изотонический раствор хлорида натрия.
2. Дистиллированная вода.
3. Гексан или гептан.

Оборудование

1. Источник микроволнового излучения - аппарат «Луч-58» с экранирующей (безэховой) камерой.
2. Пластмассовый сосуд прямоугольной формы.
3. Термометр лабораторный.

Порядок работы на аппарате «Луч-58»

1. Установите ручку переключателя «компенсатор» в положение «1». При этом должна включиться левая зеленая лампа, а стрелка индикатора отклониться вправо. Ручку «компенсатор» поворачивайте вправо до тех пор, пока стрелка индикатора не установится на середине зеленого сектора шкалы.

2. Через 1-5 минут после включения аппарата в сеть загорается желтая лампа, что свидетельствует о том, что истекло время, необходимое для разогрева катода магнетрона (предварительно ручку завода часов поверните по часовой стрелке на полный оборот до упора).

3. Переведите клавишу «контроль» в положение «мощность» и установите по процедурным часам время 3-5 минут.

4. Для включения высокого напряжения ручку переключателя «мощность» переведите в положение «1». При этом загорается правая зеленая лампа, а стрелка индикатора отклоняется вправо.

5. По истечении установленного на часах времени высокое напряжение автоматически выключается, что сопровождается кратковременным звуковым сигналом. При этом погаснет зеленая лампа.

6. Для повторного включения высокого напряжения ручку переключателя «мощность» поворотом против часовой стрелки поставьте в положение «0». Если ручка переключателя «мощность» при повторном включении не установлена на «0», то высокое напряжение на генератор подаваться не будет.

7. По окончании работы выключите аппарат, установив ручку переключателя «компенсатор» поворотом против часовой стрелки в положение «выкл».

При первом включении аппарата или после длительного перерыва в работе (более 2 месяцев) необходимо осуществить тренировку магнетрона. Тренировка магнетрона производится включением переключателя «мощность» с выдержкой времени по 10-15 минут в каждом из 7 положений.

Во время работы аппарата необходимо следить, чтобы стрелка индикатора не заходила за красную черту. Если стрелка к ней приближается, поверните переключатель «компенсатор» против часовой стрелки.

Ход работы

1. Наполните сосуд изотоническим раствором.
2. Измерьте температуру раствора.
3. Поместите сосуд в экранирующую камеру на расстоянии 40 см от излучающей антенны.
4. Включите аппарат. Экспозиция 5 минут.
5. Измерьте температуру.
6. Вычислите мощность установки.
7. Повторите измерения при расстоянии от излучающей антенны 1 м; при минимальной мощности излучения.
8. Повторите измерения с дистиллированной водой и гексаном. Сделайте выводы.

Тема 3

ВЛИЯНИЕ МИКРОВОЛНОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ

Радиобиологические исследования могут проводиться на людях, различных животных, насекомых, растениях, а также на более простых организмах (бактериях, вирусах, простейших, грибах и т. д.). В качестве биологических объектов могут также использоваться изолированные органы и ткани, биологически активные вещества (ферменты, гормоны и т. д.), модели биологических структур.

Выбор объекта определяется задачами исследования. Они могут быть связаны:

- с изучением механизма действия радиоизлучений на организм;
- с обоснованием предельно допустимых уровней облучения радиоволнами;
- с изучением возможностей использования радиоизлучений в медицине и биологии.

В экспериментах, проводимых с целью изучения механизма действия ЭМИ, в качестве объекта исследования могут быть использованы как высшие организмы, так и простейшие, микроорганизмы, ферментные препараты и другие биологические объекты. При этом применимы и самые разнообразные методики, соответствующие решению поставленных задач. Необходимо учитывать лишь общие методические принципы, определяемые особенностями взаимодействия биообъекта и радиоизлучений.

Лабораторная работа № 24

ВЛИЯНИЕ ЭМИ НА АКТИВНОСТЬ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Малатдегидрогеназа - фермент, восстанавливающий яблочную кислоту с образованием щавелевоуксусной; он находится во всех тканях в виде двух клеточных форм: митохондриальной и цитоплазматической, - различающихся по аминокислотному составу, отношению к ингибиторам, электрофоретической подвижности, иммунологическим и другим свойствам.

Определение активности фермента производится с использованием оптического теста Варбурга.

Цель работы: изучить влияние микроволнового излучения на активность малатдегидрогеназы.

Реактивы

1. Фосфатный буфер pH 7,4 (80 мл 1/15 М двухзамещенного фосфата натрия и 20 мл 1/15 М однозамещенного фосфата калия).

2. Раствор НАД-Н в фосфатном буфере рН 7,4 (3,9 мг НАД-Н растворить в 28 мл фосфатного буфера).
3. Раствор щавелевоуксусной кислоты (3 мг этой кислоты растворяют в 2,5 мл дистиллированной воды в пробирке с притертой пробкой).
4. Суспензию фермента развести буферным раствором в 1000 раз.

Ход работы

В пробирку вносят 0,1 мл раствора фермента, 2,8 мл реактива (2), инкубируют 10 минут при комнатной температуре. Затем добавляют 0,1 мл реактива (3), тщательно перемешивают и быстро переносят в кювету спектрофотометра.

Оптическую плотность пробы измеряют на 1-й и 10-й минутах против контрольной пробы. В контрольную пробу вместо фермента добавляют воду.

Во время инкубации между 1-й и 10-й минутами одну из параллельных проб в кювете помещают в камеру для облучения ЭМИ. Экспозиция - 5 минут. Расстояние от излучающей антенны - 5 см.

После завершения измерений сравните полученные результаты и сделайте выводы.

ВЛИЯНИЕ МИКРОВОЛНОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ОРГАНИЗМ ЖИВОТНОГО

В развитии ответной реакции на воздействие ЭМИ, наряду с *физическими параметрами излучения*, существенное значение имеют также *анатомо-топографические и функциональные характеристики* биологического объекта. Основными из них являются следующие.

1. Геометрические размеры объекта. Значение этого показателя существенно меняется в зависимости от длины волны. Наибольшее значение он имеет в случае воздействия на биообъект ЭМИ микроволнового диапазона. С геометрическими размерами объекта связана степень облучаемости структур.

2. Удаленность жизненно важных органов от облучаемой поверхности тела. При одинаковых параметрах воздействия облучаемость органов у крупных и мелких животных различна.

3. Степень васкуляризации облучаемых органов. Она влияет на сохранение теплового баланса и различные виды обмена.

4. Уровень организации биообъекта определяет видовую резистентность к воздействию ЭМИ и компенсаторно-приспособительные возможности организма.

5. Функциональное состояние объекта. В зависимости от функционального состояния выраженность реакции на радиооблучение может варьировать в широких пределах.

При постановке эксперимента по исследованию биологического эффекта ЭМИ необходимо учитывать следующие закономерности.

1. От поверхности тела человека и животных отражается заметная доля энергии микроволн: 70-80 % - в метровом диапазоне, 55-60 % - в дециметровом, 40-55 % - в миллиметровом и сантиметровом.

2. Микроволны поглощаются в тканях в силу потерь энергии за счет ионной проводимости и релаксационных колебаний дипольных молекул воды. Оба эти процесса и обуславливают преобразование энергии микроволн в тепловую.

3. По мере уменьшения длины волны все более значительная доля поглощаемой в тканях энергии ЭМИ обуславливается дипольными потерями: в 10-сантиметровом диапазоне эта доля составляет 50 %, а в 3-сантиметровом - уже 98 %.

4. Глубина проникновения ЭМИ в ткани с высоким содержанием воды (кровь, кожа, мышцы, мозг) составляет: в метровом диапазоне - 2-4 см, в дециметровом - 1-2 см, в миллиметровом и сантиметровом - от сотых долей миллиметра до 6-8 мм; в жировые ткани и кости соответственно 12-20,3-8 и 0,1-1 см.

При обосновании предельно допустимых уровней облучения и проведении других исследований, связанных с необходимостью переноса экспериментальных данных на человека, рекомендуется:

- в качестве объекта использовать крупных животных, размеры тела которых и глубина залегания органов близки к таковым у человека; из доступных экспериментальных животных в этих опытах целесообразно использовать крупных собак или свиней;
- опыты проводить не только на интактных, но и на функционально ослабленных животных с целью уточнения пороговых уровней поражения.

Методика облучения

Все экспериментальные животные должны подвергаться длительному мнимому облучению (имитации воздействия) с воспроизведением всех этапов реального облучения, исключая влияние ЭМИ. Критерием подготовленности животных к опытам с воздействием ЭМИ является стойкая нормализация всех исследуемых функций.

Способ фиксации животного и положение его тела по отношению к излучателю должны быть определены заранее. При проведении длительных облучений необходимо предусмотреть возможность кратковременного отдыха животных; его продолжительность и периодичность устанавливается по стабильности исследуемых показателей у контрольных животных.

При исследовании действия микроволн животных целесообразно ориентировать по отношению к излучателю левой стороной тела (из-за расположения на этой стороне сердца и доминирующего полушария) или чередовать стороны облучения. В радиодиапазоне ($A > 1$ м) продольную ось тела в целях унификации опытов рекомендуется направлять вдоль силовых линий поля (в конденсаторе или соленоиде).

При моделировании условий хронического облучения желательно учитывать общую продолжительность жизни экспериментального животного. В целях сопоставления полученных данных и возможности экстраполяции их на человека наряду с другими экспозициями рекомендуется систематическое облучение по 1 часу в день на протяжении 1/10-1/30 средней продолжительности жизни избранного вида животных.

Методы регистрации физиологических функций

При проведении радиобиологических исследований в целях предотвращения изменений электромагнитного поля, могущих исказить биологический эффект, а также обусловить возникновение артефактов при регистрации физиологических показателей, необходимо соблюдение ряда методических требований. К их числу относятся в первую очередь следующие.

1. Вся регистрация физиологических функций с помощью электрофизиологических методов (ЭЭГ, ЭМГ, ЭКГ) и измерение температуры с помо-

щью термопар, термисторов или термометров должны производиться только до или после облучения.

2. Для регистрации физиологических показателей в процессе облучения необходимо:

- исключить введение в организм или наложение на поверхность тела животного различных металлических датчиков (термопары, электроды и т. п.), а также фистульных трубок и других металлических включений;
- применять методы, не требующие контакта металлических датчиков с телом животного; в частности, можно применять датчики, основанные на преобразовании механических колебаний в электрические (например, пьезодатчики для исследования мышечного тонуса и т. п.) или дистанционные регистраторы (например, по инфракрасному излучению).

Рекомендации по методике оценки результатов исследований

При анализе результатов исследования биологического действия радиоволн наиболее важное значение имеет информативность наблюдаемых показателей. Эти показатели в зависимости от интенсивности и других параметров облучения могут характеризовать радиочувствительность или радиопоражаемость организма. Под радиочувствительностью понимается свойство организма реагировать на радиоволновое облучение. Понятие радиопоражения включает все виды изменений в организме, которые свидетельствуют о наличии в нем функциональных и структурных нарушений.

Оценку полученных данных рекомендуется производить:

1) с учетом дифференцирования выявленных изменений по принципу радиочувствительности - радиопоражаемости. Критериями для такого разграничения должны быть данные о характере функциональных сдвигов в процессе многократных облучений, об угнетении защитно-приспособительных механизмов и о нарушении функций органов и систем. Наиболее информативными показателями радиопоражений можно считать:

- а) нарушение высшей нервной деятельности (экспериментальный невроз);
- б) угнетение газообмена;
- в) нарушение секреторной функции желудка (признаки гастрита);
- г) стойкие нарушения функции сердечно-сосудистой системы (дистонии, изменения ЭКГ и др.);
- д) длительно сохраняющееся угнетение функций и изменение состава форменных элементов крови;
- е) выраженное снижение устойчивости организма к инфекции и другим факторам внешней среды (теплу, холоду, воздействиям электромагнитной природы и т. д.);
- ж) стойкие нарушения обмена веществ;
- з) длительные нарушения гормональной функции.

Безусловным показателем радиопоражаемости является возникновение выраженных структурных изменений в организме, в частности в хрусталике глаза (катаракта), в семенниках, в слизистой оболочке желудка (язва) и т. д.;

2) в связи с неодинаковой чувствительностью различных органов и систем к радиоволнам желательнее исследовать наиболее радиочувствительные органы и системы а также применять методы искусственного повышения чувствительности организма; последнее может быть достигнуто путем резкого повышения нагрузки на механизмы компенсации действием других неблагоприятных факторов (рентгеновское излучение, токсины и т. д.);

3) при изучении сравнительной биологической эффективности радиоволн разных параметров использовать принцип «поиска равных биоэффектов». Суть принципа состоит в изменении одного из параметров излучения (интенсивности или экспозиции), при котором бы возникал эффект, аналогичный ранее полученному;

4) принцип «поиска равных биоэффектов» целесообразно использовать также для обоснования межвидовых коэффициентов переноса экспериментальных данных, в том числе коэффициентов переноса данных с животных на человека.

Лабораторная работа № 25

ИЗУЧЕНИЕ ТЕПЛОВОГО ЭФФЕКТА ПРИ ОБЛУЧЕНИИ ИНТАКТНОГО ЖИВОТНОГО

Цель работы: исследовать тепловой эффект при облучении интактного животного.

Ход работы

1. Измерьте ректальную температуру у крысы с помощью электротермометра ТПЭМ-1, используя малый датчик.

2. Поместите крысу в фиксирующую клетку левым боком к излучающей антенне в центре поля облучения. Вставьте клетку в экранирующую камеру на расстоянии 1 м от излучающей антенны. Произведите облучение с экспозицией 15 минут при минимальной мощности установки (ППМ 1 мВт/см²).

3. Повторно измерьте температуру тела крысы и сравните с результатом первого измерения. Сделайте вывод о влиянии микроволнового излучения на организм.

4. Повторите облучение животного при следующих условиях:

- максимальная мощность установки, расстояние от антенны - 1 м, экспозиция - 15 минут (ППМ 10 мВт/см²);
- при той же мощности расстояние от антенны - 40 см, экспозиция - 5 минут (ППМ 30 мВт/см²);
- при тех же условиях экспозиция - 15 минут.

Сделайте выводы о влиянии мощности излучения, расстояния от излучающей антенны и экспозиции на биологический эффект микроволнового излучения.

Тема 5

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МАГНИТНЫХ ПОЛЕЙ НА НЕРАВНОВЕСНЫЕ СИСТЕМЫ

Одной из удачных моделей для изучения дестабилизирующего влияния электромагнитных полей на элементарную неравновесную реакцию, выбранную в качестве модели живой системы, является реакция оседания оксихлорида висмута в воде, предложенная Дж. Пиккарди. Суть ее заключается в том, что при слиянии определенных количеств солянокислого раствора хлористого висмута с водой образуется молочно-белый коллоидный раствор, твердые частицы которого сравнительно быстро оседают на дно.

Повторяя многократно и в разных вариантах эту реакцию, Дж. Пиккарди установил, что скорость оседания твердых частиц в разных стаканчиках весьма сильно флуктуирует как при одномоментной постановке реакции в нескольких одинаковых сосудах, так и при проведении эксперимента в разное время. Все его попытки добиться стабильности хода реакции успехом не увенчались, так как даже существенные изменения концентрации раствора, чистоты воды, температуры, освещенности, степени встряхивания сосудов достаточно слабо влияли на скорость оседания коллоидных частиц и не уменьшали величину флуктуации. Применяя различные методы проведения эксперимента и сопоставляя их обобщенные результаты с показателями солнечной активности, Пиккарди нашел весьма четкую корреляционную связь между этими двумя процессами.

Длительные многолетние исследования этого явления, проведенные Пиккарди и его последователями, позволили выявить зависимость характера флуктуации различных тестов от времени дня, сезона, места, уровня солнечной активности и т. д. Учитывая явную нестабильность хода реакции Пиккарди, ее простоту, малую зависимость от чистоты реагентов и условий проведения опыта, а также четкую связь с солнечной активностью, ее использование в качестве модели, на которой изучались закономерности влияния естественных и слабых искусственных ЭМП на неравновесные системы. Конкретная методика проведения эксперимента заключается в следующем.

В несколько тонкостенных химических стаканчиков вносят по 5 мл полурнормального солянокислого раствора хлористого висмута. Затем одновременно добавляют по 25 мл дистиллированной воды. Воду желательно предварительно пропустить через МП напряженностью 3200 А/м со скоростью 2 см/с. Такая предварительная обработка воды была предложена Пиккарди, так как реакция в этом случае идет более стабильно.

Стаканчики с реагентами устанавливаются в заранее определенное место. Твердые частицы коллоидного раствора начинают оседать, образуя четкую границу раздела с просветленной жидкостью. Реакция считается законченной в момент полного оседания, что определяется по соответствию гра-

нищы раздела фаз и метки на стаканчике, нанесенной заблаговременно по предварительным опытам.

Точность отсчета момента полного оседания соответствует величине $\pm 10-15$ с при среднем времени оседания 7-10 минут, т. е. погрешность измерения составляет 1-2 %.

Лабораторная работа № 26

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МАГНИТНЫХ ПОЛЕЙ НА НЕРАВНОВЕСНЫЕ СИСТЕМЫ НА ПРИМЕРЕ РЕАКЦИИ ПИККАРДИ КАК МОДЕЛИ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ

Цель работы: изучение влияния магнитных полей на реакцию Пиккарди.

Ход работы

Воспроизвести реакцию оседания оксихлорида висмута и определить местоположение границы раздела фаз после полного завершения реакции в соответствии с приведенным описанием техники ее воспроизведения.

Сравнить течение реакции оседания оксихлорида висмута в соленоиде при напряженности магнитного поля 450 Э, 100 Э, 15 Э с течением этой реакции при невключенном соленоиде.

Сравнить течение реакции оседания оксихлорида висмута в экранирующих камерах из пермаллоя, алюминия и в обычном помещении.

Сравнить течение реакции оседания оксихлорида висмута в обычном помещении, вблизи работающего электромотора и перед экраном компьютера.

Сделать выводы.

Тема 6

ИЗУЧЕНИЕ ВОСПРИЯТИЯ МАГНИТНЫХ ПОЛЕЙ ЧЕЛОВЕКОМ

Лабораторная работа № 27

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОСПРИЯТИЯ ПОСТОЯННОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ ЧЕЛОВЕКОМ

Цель работы: проанализировать особенности восприятия постоянного магнитного поля у студентов.

Ход работы

1. Испытуемый помещает ладонь в соленоид магнитной установки УМ-7 и занимает такое положение, когда он не видит источник питания установки.
2. Экспериментатор включает источник питания на 1 минуту и затем выключает.
3. Испытуемый описывает возникшие ощущения.
4. Экспериментатор включает источник питания, но разъединяет разъем соединения источника питания с соленоидом.
5. Опыт повторяется несколько раз. При этом необходимо, чтобы испытуемый не знал о том, включено ли магнитное поле. Каждый раз испытуемый сообщает о своих ощущениях.
6. Эксперимент повторяется несколько раз (10-15) с разными испытуемыми и с использованием различных значений напряженности магнитного поля (450, 300, 100, 30, 15 Э).
7. Возможна модификация опыта, когда испытуемому каждый раз сообщают, был ли он прав или ошибся относительно наличия или отсутствия магнитного поля.
8. После завершения экспериментов необходимо описать полученные результаты и сделать выводы.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Биогенный магнетит и магниторецепция. М.: Мир, 1989. Т. 1-2.
2. Биологическое действие гипомагнитных полей: тез. 1-го симпоз. Тбилиси, 1991.
3. Биохимия гормонов и гормональной регуляции / под ред. Н.А. Юдаева. М.: Медкнига, 1976. 379 с.
4. Влияние естественных и слабых искусственных магнитных полей на биологические объекты: материалы 2-го Всесоюзного симпоз. Белгород, 1973.
5. Дубров А.П. Геомагнитное поле и жизнь. Л.: Гидрометеиздат, 1974.
6. Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии. Минск: Беларусь, 1982.
7. Копанев В.И., Шакула А.В. Влияние ГГМП на биологические объекты. Л.: Наука, 1985.
8. Краткая медицинская энциклопедия. В 2 т. / под ред. В.И. Покровского М.: Медицинская энциклопедия. Крон-пресс, 1994.
9. Кудряшов Ю.Б., Исмаилов Э.Ш., Зубкова СМ. Биофизические основы действия микроволн. М.: Изд-во МГУ, 1980.
10. Лабораторные методы исследования в клинике: справочник / под ред. В.В. Меньшикова. М.: Медицина, 1987.
11. Машковский М.Д. Лекарственные средства. В 2 т. Изд. 13-е. Харьков, Торсинг, 1998.
12. Меньшиков В.В. Методы клинической биохимии гормонов и медиаторов. М., 1974.
13. Методы исследования нейро-эндокринных систем // Науч. труды Ленингр. ин-та усовершенств. врачей. Вып. 105. Ч. 3. Л., 1971.
14. О'Мэлли Б., Шрадер У. Рецепторы стероидных гормонов // Молекулы и клетки. Вып. 6. М.: Мир, 1977. С. 266-286.
15. Основы космической биологии и медицины. М.: Наука, 1975.
16. Пресман А.С. Электромагнитные поля в биосфере. М.: Знание, 1971.
17. Пресман А.С. Электромагнитные поля и живая природа. М.: Наука, 1968.
18. Проблемы космической биологии. М.: Наука, 1978. Т. 37.
19. Реакции биологических систем на магнитные поля. М.: Наука, 1978.
20. Рекомендации по методике исследования биологического действия радиоволн. Л., 1973.
21. Розен В.Б. Основы эндокринологии. М.: Высшая школа, 1996.
22. Солнце, электричество, жизнь. М.: Наука, 1972.
23. Строев А.К. Основы биохимии. М.: Наука, 1986.
24. Ткачук В.А. Введение в молекулярную эндокринологию. М.: МГУ, 1983.

25. Физиология гормональной рецепции / под ред. В.Г. Шаляпиной. Л.: Наука. 1986. 231 с.
26. Холодов Ю.А. Магнетизм в биологии. М.: Наука, 1970.
27. Холодов Ю.А. Мозг в электромагнитных полях. М.: Наука, 1982.
28. Чижевский А.Л. Земное эхо солнечных бурь. М.: Наука, 1973.
29. Яковлева М.И. Физиологические механизмы действия электромагнитных полей. Л.: Медицина, 1973.

ОСОБЕННОСТИ ГОРМОНАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ НА ЖИВОТНЫХ

Лабораторных животных часто используют для тех или иных экспериментальных исследований. Успех опытов на животных зависит в первую очередь от того, насколько правильно выбрано лабораторное животное.

Для многочисленных физиологических опытов выбирают лабораторных животных определенных видов, при этом руководствуясь анатомическими и физиологическими особенностями животного. Важен не только вид животного, но и его порода. Это обстоятельство имеет особое значение при проведении некоторых иммунобиологических, онкологических исследований, а также при изучении некоторых инфекционных заболеваний. Для эксперимента следует брать таких животных, которые легко привыкают к лабораторным условиям и удобны в обращении. Следует обратить внимание также и на возраст животных, пол, нрав, упитанность и т. д. Опыт следует проводить сразу на нескольких животных, желательно одного пола, массы и возраста.

Определение возраста животных. Возраст животных определяют главным образом по состоянию зубов, шерсти и когтям. Так, например, возраст собак - по стершимся коронкам резцов (что обычно наблюдается в пятилетнем возрасте) и всех других зубов (к 10-12 годам). Старые кролики, морские свинки, крысы и мыши выглядят дряхлыми: шерсть редкая, без блеска, когти искривленные, глаза мутные, на зубах коричневый или желтоватый налет.

Определение размеров тела и массы. Длину тела измеряют антропометрами, т. е. специальными приборами различных типов, иногда размеры тела и массу животных определяют на глаз. У собак обращают внимание на их внешний вид - экстерьер: форму головы, длину морды, особенности прикуса зубов, состояние мочки носа (у здоровых собак она всегда влажная и холодная), вид шеи, спины и т. д.; часто делают промеры различных частей тела, что позволяет выяснить их физическое состояние. Собак периодически взвешивают, так как масса свидетельствует об их росте и развитии. Кроме того, масса тела является объективным показателем содержания и кормления собак. У кроликов определяют длину тела, объем груди и массу тела. Мелких лабораторных животных измеряют при особых условиях опыта. Для взвешивания мелких животных пользуются обычными чашечными весами с тарированными деревянными ящиками или картонными коробками.

Метка животных. Все животные, находящиеся в питомниках и вивариях, должны иметь номера. Животных можно метить различными методами. Обезьян метят татуировкой на внутренней стороне верхней трети бедра. Татуировку производят с помощью стерильной иглы и после уколов втирают черную тушь. К ошейнику собаки прикрепляют металлический жетон. Кро-

ликам и морским свинкам вставляют в ухо металлическую бляшку с номером. Острием и концами бляшки прокалывают наружную поверхность уха и загибают внутрь на внутренней его поверхности. Применяют и клеймение с помощью татуировальных щипцов. Этот метод метки не приводит к отморожению ушей у кроликов, находящихся зимой в неотапливаемых помещениях.

Татуировку производят хорошо продезинфицированными татуировальными щипцами на обезжиренной спиртом и эфиром внутренней поверхности уха. В место татуировки втирают черную тушь или спиртовую взвесь копоти. Мелких животных, крыс и мышей часто метят, окрашивая шерсть анилиновыми красителями - 0,5 %-ным раствором генцианвиолета или карболового фуксина или насыщенным водным раствором пикриновой кислоты, дающим стойкую желтую окраску. Пометку животных проводят по определенной схеме, удобной для экспериментатора.

Птиц метят с помощью колец, на которых проставляют порядковые номера, или путем проколов в перепонках крыла и лапок.

Измерение температуры. Температуру тела животных измеряют чаще всего по условиям опыта, в основном перед началом опыта и далее в продолжение всего эксперимента, всегда в определенное время, одним и тем же термометром, в течение одного и того же периода. Измерять температуру можно медицинским максимальным или электрическим термометром. Термометры перед употреблением должны храниться в дезинфицирующих растворах - денатурированном спирте или 10 %-ном растворе лизола. Перед употреблением термометр вытирают, встряхивают и, смазав кончик его вазелином, вводят животному в прямую кишку на глубину не более 3,5 см, так как при более глубоком введении температура будет иной. Температуру нужно измерять обязательно через некоторое длительное время после дачи корма (3-4 часа).

Для измерения температуры у морской свинки нужно положить ее на ладонь левой руки брюшком вверх, а правой гладить по животу от шеи до лобковой кости. Термометр вводят после того, как животное успокоится. Вводить термометр надо осторожно во избежание прободения прямой кишки. Можно, чтобы один человек держал морскую свинку, а другой вводил термометр. Чтобы измерить температуру у кролика, его следует предварительно фиксировать, завернув в полотенце. Кролика кладут на колени и обхватывают его туловище так, чтобы голова уперлась в локоть, той же рукой приподнимают хвост, а другой рукой вводят термометр.

Фиксирование животных. Перед проведением различных манипуляций необходимо фиксировать животных в нужном положении. Для этого можно пользоваться различными специальными станками или держателями. Чаще всего применяют более простые приемы: фиксирование на руках, пеленание в полотенце и фиксирование в специальных ящичках. Ящики для фиксирования бывают разных размеров, что зависит от вида используемых животных. Мышей можно фиксировать различными способами, среди которых

наиболее употребительным является захват кожи на затылке у бегущей по столу мыши I и II пальцами левой руки. Мышь фиксируют на ладони левой руки и, захватив хвост и левую заднюю лапку между ладонью и II, III и IV пальцами, немного ее растягивают. Свободной правой рукой можно производить различные манипуляции.

Крысу можно фиксировать с помощью двух корнцангов, захватывая кожу на затылке одним, а кожу хвоста другим и прижимая ее при этом плотно к столу. Удобнее всего пользоваться специальными станками или ящичками для фиксирования, приготовленными из плексигласа или фанеры, с отверстиями на дне, чтобы в ящике не скапливались кал и моча, животных фиксируют в станках, слегка растягивая передние и задние конечности.

Методы взятия крови у лабораторных животных. Существует много способов взятия крови: у обезьян кровь берут из локтевой вены, у овец, собак, кошек - из шейной (яремной) вены или из вены бедра. У кроликов - из вены уха, у морских свинок - из сердца, у птиц - из вен внутренней поверхности крыла, у мышей и крыс - из хвоста путем отрезания кончика или из хвостовой вены. Кровь, полученную из хвоста, собирают в пробирку или отсасывают пастеровской пипеткой.

Взятию крови должна предшествовать специальная обработка поверхности кожи. Соблюдение правил асептики обязательно. Шприц должен быть стерильным и сухим во избежание растворения эритроцитов взятой крови (гемолиз).

У морской свинки кровь берут из сердца в межреберных промежутках между IV-V-VI ребрами. На груди свинки выбривают шерсть и, смазав кожу настойкой йода, нащупывают кончиком пальца толчок сердца. В это место у левого края грудины вкалывают иглу и направляют ее внутрь к средней линии на глубину 1,5-2 см. Удобно использование короткой и толстой иглы длиной 1,5-2 см. Игла должна преодолеть сопротивление плевры, перикарда и сердечной мышцы. Если игла попала в левый желудочек, то кровь начнет поступать в шприц толчками. У свинок массой 500 г и более можно взять не более 10 мл крови, а у взрослых кроликов - 25-30 мл. Тотчас после взятия крови необходимо ввести под кожу подогретый физиологический раствор в двойном количестве.

Для получения больших количеств крови животных обескровливают путем перерезки сонной артерии. Для этого делают продольный разрез кожи на шее, немного отступая от средней линии, обнажают сонную артерию и, отпрепарировав ее от нерва, накладывают две лигатуры, т. е. перевязывают сосуды в двух местах на небольшом расстоянии друг от друга. Перерезают артерии между лигатурами и, захватив пинцетом лигатуру со стороны ее центрального конца, вводят в пробирку, затем осторожно подрезают стенку позади лигатуры, и кровь начинает поступать струей в пробирку. Чтобы ток крови не ослабевал, массируют сердце.

Сбор мочи и кала у лабораторных животных. Экскременты у лабораторных животных чаще всего собирают при балансовых исследованиях.

Прибор для проведения балансовых исследований состоит из двух основных частей: обменной клетки с подставкой и разделительной воронки, предназначенной для раздельного собирания мочи и кала. Обменная клетка представляет собой сетчатую железную клетку цилиндрической формы с круглым вставным дном. В обменной клетке снаружи крепится кормушка и поилка. Отверстие в стенке клетки со стороны кормушки сделано так, что туда просовывается лишь голова животного. Такое устройство предупреждает разбрасывание корма и его загрязнение. Обменную клетку помещают над большой стеклянной воронкой, которая вместе с клеткой крепится на деревянной или железной подставке. Эта воронка обычно бывает диаметром больше дна клетки и обеспечивает сбор мочи и кала без потерь.

Получение цельной крови, сыворотки и плазмы. При взятии крови у лабораторных животных на месте, где предполагается произвести прокол, сначала выстригают шерсть, кожу обезжиривают эфиром и дезинфицируют спиртом или настойкой йода. Вену вблизи места прокола слегка прижимают, чтобы задержать отток крови и вызвать ее набухание. Место введения иглы фиксируют I и II пальцами левой руки, кровопускательную иглу вводят правой рукой под острым углом почти параллельно вене и осторожно продвигают в полость сосуда. Если кровь не вытекает, иглу следует повернуть вокруг продольной оси и вновь продвинуть вперед или назад. Место взятия крови сильно сжимать не следует во избежание попадания в вытекающую кровь тканевой жидкости, что может исказить результаты исследования. Также не рекомендуется брать повторно кровь из одного и того же места.

В клинической практике исследуют цельную кровь, а также плазму и сыворотку. В первом и во втором случаях необходимо предотвратить свертывание крови. К веществам, задерживающим этот процесс, относятся сульфат магния и натрия, цитрат натрия, оксалат натрия, фторид натрия, а также вещества животного происхождения - пептон, гирудин, синантрин, гепарин и др.

Для предотвращения свертывания крови в сосуд для ее сбора наливают четверть объема 25 %-ного раствора сульфата магния или половину объема полунасыщенного раствора сульфата натрия. Удобнее всего применять водные растворы: 20 %-ный раствор цитрата натрия или калия, оксалата натрия, 5 %-ный раствор ЭДТА, гепарин и 10 %-ный раствор фторида натрия. В центрифужные пробирки, градуированные на 10 мл, наливают по 0,3-0,5 мл какого-либо из перечисленных консервантов и доливают кровь до метки. После этого пробирки закрывают пробками и содержимое их тщательно перемешивают.

Следует помнить, что кровь, в которую были добавлены консерванты, необходимо исследовать по возможности в более короткие сроки после ее получения, так как при долгом стоянии может происходить разложение некоторых ее веществ: изменяется реакция, разлагаются азотистые соединения, происходит гликолиз, изменяется проницаемость оболочки эритро-

цитов и т. п. Отделять плазму от эритроцитов необходимо в течение первого часа после получения крови.

В тех случаях, когда свертываемость крови весьма высока, можно собирать ее следующим образом. В химический стакан объемом 25-50 мл наливают 1 мл 5 %-ного раствора ЭДТА и добавляют кровь по каплям при непрерывном перемешивании.

Необходимо учитывать, что при использовании в качестве антикоагулянта гепарина довольно часто наблюдается гемолиз.

Получение плазмы. Жидкую часть крови (плазму) получают из цитратной или оксалатной крови после центрифугирования или отстаивания ее в холодильнике в течение суток.

Получение дефибринированной крови.

Свежевышущенную кровь помещают в стерильную колбу со стеклянными бусинами и начинают взбалтывать ее в момент заполнения сосуда. Примерно через 20 минут нити фибрина оседают на бусинах и свободную от него кровь переливают в новый сосуд.

Получение сыворотки. Для получения сыворотки кровь собирают в пробирки, не допуская ее вспенивания. Для этого струю вытекающей из сосуда крови следует направлять по стенке пробирки. Собранную кровь можно оставить на один час при комнатной температуре или поставить в термостат при 37°C на 20-30 минут. Образовавшийся сгусток крови отделяют от стенок пробирки тонкой стеклянной палочкой, пастеровской пипеткой либо тонкой проволокой, обводя ими осторожно по стенке пробирки вокруг сгустка, затем центрифугируют 15 минут при 3000 об/мин, полученную сыворотку отсасывают пипеткой.

Получение взвеси эритроцитов. Взвесь форменных элементов получают в основном из цитратной крови после ее стояния или после центрифугирования. Центрифугируют кровь при 2000-3000 об/мин в продолжение 15 минут. После центрифугирования кровь расслаивается на плазму (вверху) и форменные элементы (внизу). Плазму отсасывают, а к осевшим на дно сосуда эритроцитам добавляют стерильный изотонический раствор до первоначального объема и вновь центрифугируют. Промывают 3-4 раза до тех пор, пока надосадочная жидкость не станет совершенно прозрачной.

Получение костного мозга. Прижизненное получение костного мозга возможно у всех видов животных и птиц. Костный мозг у лошадей получают путем прокола специальной иглой из грудины или подвздошной кости, у кроликов - из грудины или из берцовой кости, у собак - из грудины и из бедренной кости, у птиц - из коленного сустава или из верхней трети плюсневой кости.

Способы заражения лабораторных животных. Существует много способов заражения, чаще всего применяют подкожное заражение. Для этого кожу приподнимают пинцетом или двумя пальцами и в образовавшуюся складку вкалывают иглу шприца. Чтобы введенный материал не выливался обратно, надо отклонить иглу от первоначального направления немного в

сторону и медленно вводить жидкость. Место прокола можно заклеить коллодием или прижечь раскаленной стеклянной палочкой. Мышам и крысам подкожную инъекцию делают на спине у корня хвоста, кроликам и свинкам - на спине и животе. Для внутрикожного заражения иглу вводят в эпидермис, причем он должен подниматься в виде пузырьков после введения жидкости. Метод скарификации применяют реже. При этом способе заражения выбирают такие участки кожи, которые животное не может достать лапами и зубами (спина). На хорошо обработанном участке кожи делают царапины пером Дженнера или хирургической иглой, после чего наносят каплю материала и втирают ее стеклянной лопаточкой. Иногда втирают материал в некарифицированную кожу (культура чумы и туляремии).

Внутрибрюшинное заражение производят путем впрыскивания материала в брюшную полость. Надо специально фиксировать животное, держа его головой вниз чтобы не поранить кишечник. Самым распространенным является внутривенное заражение, причем пользуются различными венами. Кроликов удобнее всего заражать через краевую вену уха. Крысам и мышам инъекции делают в вены, расположенные по обеим сторонам хвоста, пользуясь туберкулиновыми иглами с короткими концами. Перед инъекцией следует расширить вены, для чего нужно погрузить хвост в горячую воду.

Морским свинкам материал вводят в яремную вену, а птицам - в вену на внутренней поверхности крыла. Вена здесь очень хорошо выступает, если удалить перья. Птиц также заражают внутримышечно. Можно производить заражение через глаз путем закапывания материала на слизистую оболочку глаза, введением материала в переднюю камеру глаза. Заражение в центральную нервную систему осуществляют, вводя материал под твердую мозговую оболочку.

Существуют и естественные пути заражения, среди которых наиболее распространенным является заражение через дыхательные пути и пищеварительный тракт. Заражение через дыхательные пути производят с помощью ингаляции, или введением специального зонда в дыхательные пути, в трахеи и бронхи, или путем закапывания инфекционного материала в нос.

Заражение через пищеварительный тракт производят путем примешивания заразного материала к корму животных, или введения материала через канюлю, т. е. стеклянную трубку с оттянутым концом, или при помощи шприца в рот за щеку, заставляя животное проглотить введенный материал. Чтобы животное открыло рот, надо надавливать на скулы пальцами и открывать рот пинцетом. Тонким зондом или катетером можно вводить материал непосредственно в желудок. Мышам можно вводить материал в желудок иглой с утолщением на конце.

Методы применения наркотических веществ. Наркотические вещества применяют для общего наркоза и местного обезболивания перед хирургическими операциями.

У собак применяют хлороформный, морфинный, гексеналовый, наркотиновый наркоз, у кошек и других животных - эфирный и хлоралгидратный наркоз. Местную анестезию производят обычно 1 %-ным раствором кокаина, 5 %-ным раствором новокаина по 0,5 мл. Для того чтобы увеличить длительность анестезии, к раствору новокаина или кокаина прибавляют от 2 до 5 капель раствора адреналина (1:1000). При анестезии слизистых оболочек носа, глаз, полости рта или прямой кишки можно пользоваться 5 %-ным раствором кокаина. При назначении наркотизирующих средств следует помнить о возможных осложнениях. Применять эти вещества следует осторожно. У мелких лабораторных животных после наркоза часто наблюдается отек легких, и они погибают.

Не все животные одинаково переносят одни и те же наркотические вещества. Кролики не переносят хлороформный наркоз. Собаки переносят морфин очень хорошо, морские свинки, кошки, напротив, плохо. Дают наркоз с помощью специальных масок-намордников, сделанных из металлических сеток, покрытых клеенкой, или с помощью специальных приборов для дачи наркоза. В маску между двумя металлическими сетками кладут вату или губку и смачивают ее наркотизирующим веществом. Очень важно, чтобы наркотизирующее вещество не касалось носа животного. Наступление полного наркоза определяют по исчезновению рефлекса с роговой оболочки и неподвижности животного. Во время дачи наркоза наркотизатор должен следить за состоянием животного. Если при наркозе у животного западает язык, то его немедленно надо вытянуть наружу и закрепить при помощи языкодержателя. При появлении рвоты надо дать рвотным массам стечь, а после этого углубить наркоз большей дозой наркотизирующего вещества. При остановке дыхания или при очень поверхностном дыхании надо немедленно снять маску и сделать искусственное дыхание, под кожу ввести раствор камфоры.

При остановке сердечной деятельности нужно немедленно прекратить подачу наркоза и начать искусственное дыхание. Следует постукивать по грудной клетке в области сердца, делая как бы массаж сердца, и ввести под кожу кофеин и камфору или в вену адреналин. Вводить адреналин следует как можно быстрее, не позже чем через 2-3 минуты после остановки сердца.

ПРАВИЛА ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

К работе с экспериментальными животными допускаются лица, имеющие высшее медицинское, ветеринарное, зоотехническое, фармацевтическое или биологическое образование, получившие разрешение на право использования животных и несущие ответственность за соблюдение Правил.

Лица, имеющие среднее медицинское, ветеринарное или зоотехническое образование (а в учебных учреждениях и студенты) и знакомые с настоящими Правилами, допускаются к проведению несложных и неболезненных процедур на животных без получения персонального разрешения, но под контролем ответственного лица и под его ответственность, за исключением персонала предприятий по производству бактериальных и вирусных препаратов.

При представлении в печать данных о результатах исследований, выполненных с использованием экспериментальных животных, учреждения и отдельные лица обязаны указывать сведения об использовании животных (вид, количество, тип применявшегося обезболивания и т. д.).

Все процедуры на животном, которые могут вызвать у него боль или иного рода мучительное состояние, проводятся при достаточном обезболивании (под местной анестезией или наркозом), кроме случаев использования животных для получения биологических препаратов, их контроля в иммунологических исследованиях. Опыты с применением миорелаксантов, которые не являются обезболивающими средствами, во всех случаях проводятся при полном обезболивании.

Запрещается использование животного для болезненных процедур более чем один раз, кроме животных, взятых для контроля биологических препаратов, в их производстве, животных-доноров и при изучении схем иммунизации.

При необходимости повторных опытов такого рода вопрос должен обсуждаться на ученом совете вуза или института.

При проведении экспериментов и других процедур в условиях повышенного риска нанесения животному болезненных раздражений (травма в затруднительных условиях наблюдения за клинической картиной состояния животного, обездвижение животного, выполнение процедур на животных малоопытными лицами (например, студентами) строго обязательно присутствие лица, ответственного за работу с животными и контроль с его стороны за сохранением адекватного обезболивания.

В послеоперационном периоде животное должно получать квалифицированный уход и адекватное обезболивание.

Животное, которое осталось после эксперимента или другой процедуры искалеченным или нежизнеспособным, должно быть своевременно умерщвлено с соблюдением всех требований гуманности.

Эвтаназия, т. е. гуманное умерщвление животного, производится ответственным лицом или под его непосредственным наблюдением при соблюдении всех требований гуманности в соответствии с требованиями.

Уборка трупа животного может производиться только после того, как смерть будет констатирована лицом, ответственным за работу с животным.

Ответственность за нарушение Правил проведения работ с использованием животных несут руководители учреждений, где проводятся эксперименты, и лица, специально выделенные для проведения этой работы.

Нарушение Правил гуманного обращения с животными и проведение экспериментов в условиях, ставящих под сомнение научную достоверность полученных данных, может повлечь за собой в установленном порядке применение к виновным лицам мер дисциплинарного воздействия, а также запрещение научных публикаций, защиты диссертационных работ и дальнейшего использования экспериментальных животных в научных и учебных целях.

ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ ПРОЦЕДУР НА ЖИВОТНЫХ

1. Подготовка животного к эксперименту

Условия содержания животного в виварии должны обеспечивать для него нормальный биологический фон.

В период введения в эксперимент животное должно адаптироваться к обстановке лаборатории и привыкнуть к экспериментатору.

При доставке в лабораторию крупных животных запрещается применение силовых или болезненных приемов. В случае агрессивных или истеричных животных можно сделать предварительную премедикацию с помощью безыгольных инъекторов с удлиненной насадкой.

Мелких животных (грызунов и пр.) следует брать осторожно; применять кронцанги только с резиновыми насадками; не сжимать животных сильно руками, что причиняет животным травмы и боль. Запрещается оставлять животных в ожидании эксперимента больше, чем это необходимо для проведения премедикации.

Запрещается переносить мелких животных по холоду в неутепленных клетках.

2. Премедикации. Фиксация животного

Премедикация проводится ответственным за работу с животным лицом или под его наблюдением.

Если животное испугано или состояние наркоза наступает не сразу, экспериментатор должен ждать, пока животное не успокоится или не заснет.

Животное можно фиксировать только после того, как подействует наркоз.

При проведении процедур, которые требуют иммобилизации бодрствующих животных, разрешается привязывать животное к лабораторной доске только на непродолжительное время. Для иммобилизации животного на

продолжительное время следует применять ящики-домики и щитки-ошейники.

После фиксации собак с них снимаются повязки-намордники .

Повязки на конечностях животного должны быть мягкими, не препятствовать кровообращению; животному не должна быть придана неудобная поза с вывернутыми конечностями.

При помещении бодрствующего животного в стереотаксический аппарат необходимо провести местное обезбоживание участков головы, подвергающихся сдавлению.

3. Обезболивание

После дачи животному наркоза необходим постоянный контроль со стороны экспериментатора (или анестезиолога) за уровнем наркоза. При использовании миорелаксантов рекомендуется систематическое выведение животного из состояния бездвижения для проверки уровня наркоза.

При первых признаках ослабления наркоза он должен быть углублен. Запрещается применение средств, препятствующих контролю за уровнем наркоза - завязывание морды и т. д.

Все эксперименты с нанесением животному болезненных ощущений, включая эксперименты по изучению шока, должны проводиться с отключением сознания у животного. Допускается нанесение пороговой боли при изучении механизма боли и влияния на организм анальгетиков и анестетиков.

Порог боли определяется индивидуально для каждого животного. Критерием возникновения порогового болевого ощущения следует считать реакцию избегания: отдергивание конечности, перемену места, прыжок. Нанесение болевых раздражений, вызывающих голосовую и активную двигательную (оборонительную) реакцию, запрещается. Пороговые болевые раздражения наносятся в условиях свободного поведения животного.

Наносимая пороговая боль должна быть непродолжительной. Развитие стрессовых состояний у животного в результате болевых раздражений и других мучительных состояний недопустимо.

При биологическом тестировании и производстве медико-биологических препаратов все процедуры проводятся в условиях щажения животного; болезненные процедуры при маркировке животных (отрезание ногтевых фаланг и др.), при взятии крови, при воздействии на слизистую глаза и т. д. должны проводиться под местной анестезией или другого рода обезбоживанием.

Дозы и время введения препаратов должны фиксироваться в соответствующих документах (протокол эксперимента).

4. Уход за животными в послеоперационном периоде

При доставке животного в клетку после операции должны использоваться удобные носилки, исключающие нанесение животному травм, сдвигание повязок. В случае применения миорелаксантов и искус-

ственного дыхания животное должно оставаться в лаборатории до полного восстановления дыхания.

Грызуны, получившие травмы, например, при взятии крови из хвоста, отсаживаются в отдельную клетку во избежание покусов.

Животное в хроническом опыте должно быть помещено в удобную клетку, облегчающую также условия наблюдения и ухода за животным. С момента появления у животного болей оно должно получать седативные и обезболивающие препараты. Животному должен быть обеспечен квалифицированный уход под контролем экспериментатора.

После особо сложных и ответственных операций рекомендуется в первые сутки устанавливать круглосуточное дежурство около животного.

Состояние животного и назначения препаратов должны отмечаться в протоколе эксперимента.

ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ ЭВТАНАЗИИ (УМЕРЩВЛЕНИЯ) ЖИВОТНОГО

Гуманным умерщвлением животного - эвтаназией - называется быстрое и безболезненное умерщвление животного, не сопровождающееся у него чувством тревоги и страдания.

Животное должно получать адекватный уход (анестетики, питание, поение и т. п.) вплоть до самого момента его умерщвления. Умерщвление животных не должно производиться в помещении, где содержатся другие животные, запрещается умерщвлять одних животных на глазах у других.

В острых опытах животное должно умерщвляться до прекращения действия наркоза. Во всех случаях животное должно умерщвляться своевременно - до наступления у него болезненных состояний.

Оптимальным и универсальным методом умерщвления животных является передозировка наркоза - введение анестетика в летальной дозе (дозировка для наркоза $\times 3$).

При соблюдении этих условий допустимо умерщвление животного другими методами:

а) мелких животных: мышей, крыс, лягушек, птиц и др. - путем декапитации;

б) кроликов - путем воздушной эмболии;

в) крупных животных: взрослых собак, свиней и пр. - с помощью пропускания электрического тока, при этом электроды вводятся в область продолговатого мозга и в область крестца.

При необходимости изучать ультраструктуру мозга применяются мгновенные методы эвтаназии (например, мгновенное замораживание при погружении животного в жидкий азот), использование в этом случае электрического тока недопустимо.

Если предусматривается морфологический анализ тканей мозга с использованием светового микроскопа, то для эвтаназии должны применяться анестетики.

Допускается умерщвление животных, используемых в производственных целях, путем обескровливания. При этом может быть подобран метод обезболивания, отличный от фармакологического воздействия.

При проведении эксперимента с применением миорелаксантов допускается умерщвление животного путем отключения искусственного дыхания, но лишь в условиях сохранения адекватного наркоза.

Допускается умерщвление мелких животных с помощью ингаляционного наркоза без предварительного введения других видов анестетиков. Наиболее пригодным для этой цели является хлороформ. Но при этом эвтаназия должна производиться в специальной камере, в теплом помещении, подача хлороформа должна вестись очень небольшими дозами - по капле.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
Часть 1. Основные принципы и методы исследований гормональной системы регуляций	4
Тема 1. Катехоламины	8
<i>Лабораторная работа № 1.</i> Исследование спектра флуоресценции катехоламинов.....	9
<i>Лабораторная работа № 2.</i> Определение адреналина, норадреналина, дофамина и ДОФА в крови и тканях.....	10
<i>Лабораторная работа № 3.</i> Определение адреналина, норадреналина, дофамина и ДОФА в моче.....	13
<i>Лабораторная работа № 4.</i> Определение дофамина в моче.....	15
<i>Лабораторная работа № 5.</i> Хроматографический метод определения катехоламинов.....	16
Тема 2. Система ацетилхолин - ацетилхолинэстераза	21
<i>Лабораторная работа № 6.</i> Определение активности ацетилхолинэстеразы в плазме крови.....	21
<i>Лабораторная работа № 7.</i> Определение активности ацетилхолинэстеразы в эритроцитах.....	23
<i>Лабораторная работа № 8.</i> Определение активности ацетилхолинэстеразы.....	24
<i>Лабораторная работа № 9.</i> Определение ацетилхолиноподобных веществ в крови.....	25
Тема 3. Тиреоидные гормоны	27
<i>Лабораторная работа № 10.</i> Определение белковосвязанного иода.....	27
<i>Лабораторная работа № 11.</i> Определение белковосвязанного иода в слюне.....	29
Тема 4. Гистамин и серотонин	31
<i>Лабораторная работа № 12.</i> Определение гистамина и серотонина методом экстракции.....	32
<i>Лабораторная работа № 13.</i> Определение гистамина и серотонина методом ионообменной хроматографии.....	34
<i>Лабораторная работа № 14.</i> Определение гистамина и серотонина в слюне.....	36
<i>Лабораторная работа № 15.</i> Определение гистамина колориметрическим методом.....	39
<i>Лабораторная работа № 16.</i> Определение гистамина в слюне колориметрическим методом.....	41
Тема 5. Определение глюкокортикоидов	43
<i>Лабораторная работа № 17.</i> Определение 11-оксикортикостероидов в плазме крови.....	43

Лабораторная работа № 18. Определение 11-оксикортикостероидов в слюне.....	45
Лабораторная работа №19. Определение 17-оксикортикостероидов в моче по реакции с фенилгидразином после ферментативного гидролиза.....	46
Лабораторная работа № 20. Исследование биологических эффектов стероидных гормонов - влияния на концентрацию оксипролина в слюне.....	50
Тема 6. Определение электролитов в крови и моче методом пламенной фотометрии.....	53
Лабораторная работа № 21. Определение калия и натрия в крови	53
Часть 2. Адаптация организма к воздействию физических факторов окружающей среды.....	54
Тема 1. Оценка реакции организма на излучения компьютерного видеодисплейного терминала.....	54
Лабораторная работа № 22. Реакция организма на излучения компьютерного видеодисплейного терминала в зависимости от степени адаптации сердца к физическим нагрузкам.....	56
Тема 2. Тепловой эффект микроволнового излучения.....	57
Лабораторная работа № 23. Изучение теплового эффекта микроволнового излучения.....	61
Тема 3. Влияние микроволнового излучения на активность ферментов	63
Лабораторная работа № 24. Влияние ЭМИ на активность малатдегидрогеназы.....	63
Тема 4. Влияние микроволнового излучения на организм животного	65
Лабораторная работа № 25. Изучение теплового эффекта при облучении интактного животного.....	68
Тема 5. Изучение влияния магнитных полей на неравновесные системы	69
Лабораторная работа № 26. Изучение влияния магнитных полей на неравновесные системы на примере реакции Пиккарди как модели биологических систем.....	70
Тема 6. Изучение восприятия магнитных полей человеком.....	71
Лабораторная работа №27. Исследование восприятия постоянного магнитного поля человеком.....	71
Рекомендуемая литература.....	72
Приложение. Особенности гормональных исследований на животных	74
Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных	81
Порядок проведения процедур на животных.....	82
Порядок проведения эвтаназии (умерщвления) животного.....	84

Учебное издание

Подковкин Владимир Георгиевич

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ
ГОМЕОСТАЗА И АДАПТАЦИИ**

Практикум

Редактор Т.А. Мурзинова
Компьютерная верстка, макет Н.П. Бариновой

Подписано в печать 29.12.09. Формат 60x84/16. Бумага офсетная. Печать оперативная.
Усл.-печ. л. 5,1; уч.-изд. 5,5. Гарнитура «Times New Roman». Тираж 100 экз. Заказ № 1792
Изд-во «Самарский университет», 443011, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.
Тел. 8 (846) 334-54-23
Отпечатано на УОП СамГУ