

МИНИСТЕРСТВО ОБЩЕГО И ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО
ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Кафедра биохимии

КАТЕХОЛАМИНЫ

*Спецпрактикум по курсу
"Молекулярная эндокринология"*

Часть 1

Издательство "Самарский университет"
1998

Методические рекомендации предназначены для студентов, специализирующихся по биологической химии, изучающих спецкурс "Молекулярная эндокринология". В практикуме приводятся современные методы исследования катехоламинов, которые могут также быть использованы при проведении самостоятельных научных исследований, в том числе курсовых и дипломных работ. Каждая работа содержит теоретическое вступление, позволяющее понять принцип метода и целесообразность всех этапов анализа. Приведены индивидуальные задания различной степени сложности, что позволяет студентам глубже освоить принцип современной научно-исследовательской работы.

Составители: докт. биол. наук В.Г. Подковкин,

докт. биол. наук М.М. Серых

Отв. редактор канд. биол. наук Ю.П. Фролов

Подковкин В.Г.,
Серых М.М.,
составление, 1998

ВВЕДЕНИЕ

В организме позвоночных животных насчитывается около 10^{15} клеток, дифференцированных примерно на 20 клеточных типов, формирующих высокоспециализированные ткани, органы и системы, ведущую роль в координации и интеграции жизнедеятельности которых выполняет централизованный аппарат управления, представленный нервной, эндокринной и иммунной системами. Однако у животных, наряду с появлением специализированного аппарата централизованного управления, в процессе эволюции сохранилась автоматическая регуляция биохимических процессов на субклеточном уровне при участии метаболитов внутренней среды клеток, характерная для одноклеточных, а также межклеточное управление многоклеточных организмов с помощью гистогормонов (цитогормонов, парагормонов), которые образуются чаще тканеспецифично и обеспечивают саморегуляцию тканевых элементов в пределах близлежащих клеток (паракринно).

Системы специализированного управления жизнедеятельностью большинства организмов могут иметь сходные или полностью совпадающие механизмы их влияний на клетки, обеспечивающие как гомеостаз, так и адаптацию живого организма к изменениям внешней или внутренней среды.

Центральная нервная система осуществляет свою регуляторную функцию преимущественно посредством импульсно-медиаторного механизма передачи специализированных сигналов, сочетающих в себе электрический (внутриклеточный) и химический (медиаторный, локальный, межклеточный) способы. Известно около ста медиаторов, которые можно рассматривать как гистогормоны, вовлекаемые в нервный контроль.

Эндокринные железы реализуют свои функции управления гуморально, с помощью гормонов, к которым относят специфические вещества, необходимые для регуляции процессов обмена веществ, 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 по-

мощью 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. Иммунная система осуществляет контроль дифференцировки клеток в организме и защищает его от несущих чужеродную генетическую информацию биологических агентов, к которым нет рецепторов у нервной и эндокринной систем.

Нервная, эндокринная и иммунная системы регуляции выступают с одной стороны как самостоятельные, а с другой — как тесно взаимосвязанные системы, о чем свидетельствует обнаружение в них общих гормонов и медиаторов (эндорфины, энкефалины, гистамин, серотонин, вазопрессин, окситоцин, норадреналин, ацетилхолин, соматотропин и др.), а также рецепторов к ним. Следует отметить наличие хорошо развитой симпатической и парасимпатической иннервации центральных и периферических лимфоидных органов и рецепторов к гормонам и нейромедиаторам как в лимфоидных органах, так и на отдельных иммунных лимфоцитах (к катехоламинам, холинэргическим веществам, нейропептидам), а также рецепторов в центральной нервной системе и в железах внутренней секреции к медиаторам иммунной системы (интерлейкинам, миелопептидам, тимозину и др.).

На основе принципиально общей функции гистогормоны, нейромедиаторы, гормоны и антитела обозначают как "информоны" — вещества, передающие межклеточную информацию (В.Б. Розен, 1994). Информоны секретируются во внеклеточное пространство, не могут быть использованы в качестве пластического и энергетического материала, способны взаимодействовать с белками-рецепторами в реагирующих клетках и через их посредство направленно изменять характер клеточного метаболизма.

В связи с тем, что гормоны и медиаторы не принимают непосредственного участия в метаболических процессах, а несут лишь регуляторную функцию, их иногда именуют специфическими регуляторами, а область биологической науки, занимающаяся изучением роли и механизмов специфических регуляторов, получила название "молекулярная эндокринология" (В.А. Ткачев, 1983).

В настоящее время известны многие стороны механизма действия гормонов и медиаторов. В большинстве случаев в основе механизмов инициации гормонального эффекта в клетке закономер-

но лежит однотипная функционально сопряженная триада молекул:

1) гормон - внеклеточный сигнальный регулятор,
2) рецептор - клеточный приемник и преобразователь гормонального сигнала;

3) акцепторы - регуляторные структуры клетки, непосредственно взаимодействующие с гормон-рецепторным комплексом и включающие цепи гормон индуцирующих процессов.

Выявлено 2 основных типа циторепциации гормонов:

1) внутриклеточный (преимущественно ядерный), по которому рецептируются стероидные, тиреоидные гормоны и ретиноевая кислота;

2) поверхностный (мембранный), по которому рецептируются белково-пептидные гормоны, катехоламины и все известные негормональные информоны.

При внутриклеточном типе рецeпции гормоны относительно свободно проникают внутрь клетки, затем в ядро, где избирательно связываются с рецепторными белками хроматина, регулируя уровень транскрипции и уровень белков. Такие гормональные эффекты обычно длительны и отставлены во времени (часы, сутки).

При мембранном типе рецeпции гормоны и другие информоны вначале взаимодействуют с мембранными рецепторными белками, не проникая внутрь клетки. Гормональные эффекты при этом типе реакции опосредуются путем подключения внутриклеточных медиаторов. В плазматической мембране акцепторами являются информонзависимые ферментные системы и ионные каналы. В ряде ферментных систем собственно акцепторным местом являются регуляторные мембранные белки, функционально сопряженные с этими ферментами. В случае рецепторов инсулина, ряда факторов роста включаемая гормонакцепторная система (тирозиназа) внедрена в состав самой рецепторной молекулы. Наиболее известны внутриклеточные медиаторы - цАМФ, цГМФ, диацилглицерин (ДАГ), трифосфинозитол(ФзИ), фосфорилированные белки, Ca^{2+} и Na^{+} . Зависимые от ферментов посредники очень быстро образуются в мембране, а исходные катионные медиаторы почти мгновенно входят внутрь клетки через ионные каналы из внеклеточного пространства. Характерной чертой гормонов, действующих с поверхности клетки, являются быстрые, немедленные эффекты (с, мин.), обусловленные активацией уже синтезированных белков.

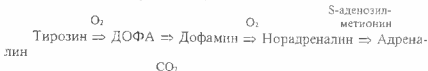
Приведенная классификация типов рецeпции гормонов в известной мере условна. Имеются сведения о том, что для одного и того же гормона рецепторы могут быть локализованы как на по-

верхности цитоплазматической мембраны, так и внутри клеток. В частности, для стероидных и тиреоидных гормонов, помимо внутриклеточных рецепторов, выявлены специфические рецепторы на клеточной мембране, связанные с аденилатциклазной системой, взаимодействие с которыми усиливает (или ускоряет) проявление гормонального эффекта. Кроме того, сопряжение белково-пептидных гормонов с аденилатциклазной системой, генерирующей ц-АМФ, а также с Ca^{2+} -каналами является одним из наиболее значимых, но не единственным путем проведения гормонального сигнала. В настоящее время накоплен обширный материал, показывающий возможность проникновения белково-пептидных гормонов в клетки путем пиноцитоза (интернализации) и существования для них внутриклеточных рецепторов, в том числе внутриядерных рецепторов для соматотропина. Соматотропин обнаруживается в ядре как интактная молекула. Локализация соматотропинсвязывающих белков в ядрах предполагает возможность их непосредственного участия в регуляции экспрессии генов после взаимодействия с соматотропином. Аккумуляция полипептидных гормонов в ядрах клеток-мишеней отмечена также для инсулина, пролактина, фактора роста нервов, эпидермального фактора роста, некоторых интерферонов (М.А.Гаврилин, 1995). Возможно, что именно через внутриклеточные медиаторы эти гормоны оказывают длительные, отсроченные эффекты, обусловленные их влиянием на биосинтетические процессы в клетке.

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.

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:



Адреналин и норадреналин образуются из тирозина в мозговом слое надпочечников и секретируются в кровь. Отношение адреналина к норадреналину в экстрактах мозгового вещества надпочечников значительно варьирует у животных различных видов. На долю норадреналина приходится у человека 10-30%, у коровы 20%, у кошки - 50%, у кита 90 -100%, у морской свинки - около нуля.

В некоторых клетках мозга, в том числе и в гипоталамусе, синтез катехоламинов заканчивается образованием дофамина, а синтез адреналина и норадреналина в них незначителен. В синаптических нервных волокнах дофамин быстро превращается в норадреналин, который накапливается в синаптических пузырьках. Норадреналин является нейромедиатором, действующем на постсинаптические клетки.

В адренэргических синапсах нет ферментов, разрушающих медиатор. Удаление из синапсов катехоламинов происходит путем обратного захвата медиатора пресинаптической мембраной.

Определенные количества катехоламинов могут диффундировать в межклеточное пространство, а затем в кровь. Именно этим, по-видимому, объясняется факт наличия норадреналина в крови, несмотря на то, что мозговое вещество надпочечников секретирует, главным образом, адреналин, а норадреналин секретируется преимущественно в синапсах.

Адреналин повышает уровень сахара крови путем активизации аденилатциклазной системы в клетках печени и мышц, что ведет к фосфорилированию фосфоорилазы, которая усиливает распад гликогена; в жировой ткани он усиливает липолиз. Кроме того, адреналин увеличивает частоту и силу сокращения сердца, суживает кровеносные сосуды, замедляет сокращение желудочно-кишечного тракта.

Норадреналин по сравнению с адреналином оказывает менее выраженное гипергликемическое действие, но более выраженное сосудосуживающее.

Концентрация адреналина в крови животных особенно возрастает 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 животного 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 уплывать и они могут уноситься при промывании части 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 волны.

Индивидуальные задания

1. Исследовать спектр флуоресценции адреналина.
2. Исследовать спектр флуоресценции норадреналина.
3. Исследовать спектр флуоресценции дофамина
4. Исследовать спектр флуоресценции ДОФА.
5. Определить содержание адреналина, норадреналина, дофамина и ДОФА в надпочечнике крысы.

6. Определить содержание адреналина, норадреналина, дофамина и ДОФА в головном мозге крысы.

7. Определить содержание адреналина, норадреналина, дофамина и ДОФА в моче.

8. Определить содержание дофамина в моче.

9. Определить содержание адреналина и норадреналина в крови хроматографическим методом.

ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕКТРА ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ КАТЕХОЛАМИНОВ

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 фиксанала (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% раствора ЭДТА, перемешать. Готовить перед использованием.

8. Адреналин. 0,2 мл 0,1% 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.

9. Норадреналин. 0,1 мл 0,2% 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 опытных 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. Флюоресценцию 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

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

(Э. Ш. Матлина и соавт., 1963 - в модификации -

В. Г. Подковкин, 1988)

РЕАКТИВЫ:

1. 10% раствор трихлоруксусной кислоты.

2. 1% спиртовый раствор фенолфталеина.

3. 5% раствор ЭДТА / этилендиаминтетраацетат, трилон Б/.

4. 5% раствор аммиака /нашатырный спирт/.

5. Окись алюминия. К 200 г. порошка добавить 400 мл. воды, встряхивать в закрытой колбе 1 минуту. Затем 1 минуту отстоять. Слить воду вместе с не успевшими 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. под - 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 одного литра.

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% раствора ЭДТА, перемешать. Готовить перед использованием.

13. Адреналин. 0,2 мл 0,1% 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% 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% 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% 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 анализа

1. Экстракт вылить в колбу, добавить 10 мл 5% 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% 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 (опытная и контрольная) и выполнить с ними последний этап анализа (пункты 7-12).

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)

Концентрацию исследуемых веществ вычисляют по следующим формулам:

$$C_{\text{ДОФА}} = \frac{E_1}{E_{\text{ДОФА}}}$$
$$C_A = \frac{E_2 - E_{\text{ДОФА}} \cdot C_{\text{ДОФА}}}{E_{A_2}}$$
$$C_N = \frac{E_3 - E_A - C_2 (E_{N_3} - E_{N_2})}{E_{N_3} - E_{N_2}}$$
$$C_D = \frac{E_4 - E_{D_4} \cdot C_D - E_{N_4} \cdot C_N}{E_{D_4}}$$

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

C_N - количество норадреналина;

C_D - количество дофамина;

$C_{\text{ДОФА}}$ - 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_N, E_D, E_D - флуоресценция стандартного раствора соответственно адреналина, норадреналина, дофамина и ДОФА при соответствующих длинах волн в условных единицах.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АДРЕНАЛИНА, НОРАДРЕНАЛИНА, ДОФАМИНА И ДОФА В МОЧЕ

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

РЕАКТИВЫ:

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

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

Ход анализов

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% 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% 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 опытных и 1 контрольная) и выполнять с ними последний этап анализа (пункты 8-9).

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

3. Опыт.

Измеряют флюоресценцию 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

количества адреналина, норадреналина и ДОФА в моче производится по следующим формулам:

$$y = \frac{E_2 - E_1}{H_1}; \quad x = \frac{E_1 - y \cdot H}{A_1}; \quad z = \frac{E_1 - 0,75 \cdot A_1 \cdot x - 2,32 \cdot H_1 \cdot y}{D_3};$$

где x - количество адреналина, y - норадреналина, z - ДОФА в мкг в исследуемой пробе /50 мл/;

E_1, E_2, E_3 - флюоресценция исследуемой пробы при длинах волн 436, 405 и 365 нм соответственно / за вычетом флюоресценции контрольной пробы/;

A_1, H_1, D_3 - флюоресценция стандартных растворов адреналина (436 нм), норадреналина (436 нм) и ДОФА (365 нм).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДОФАМИНА В МОЧЕ

РЕАКТИВЫ:

1. 5н. раствор уксусной кислоты.
2. 0,25 н. раствор уксусной кислоты.
3. 0,33М раствор фосфата натрия.
4. 0,1н. 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 5н. раствора гидроокиси натрия. Готовить перед использованием.
6. Стандартный раствор дофамина. 1 мг дофамина растворить в 1 мл воды. прилить 10 мл 1н. соляной кислоты. Концентрация 100 мкг/мл. Хранить 2-3 недели. плотно закрытым.

Ход анализа

Для анализа используется остаток экстракта, полученный после встряхивания 0,25н. 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 0,25н. уксусной кислоты и 0,8 мл 0,33 М раствора фосфата натрия, перемешать.

3. Добавить 0,2 мл 0,н. раствора иода, перемешать.

4. Через десять минут прилить 0,5 мл щелочного раствора сульфита натрия, перемешать.

5. Добавить 0.6 мл 5н. 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 0.25н. уксусной кислоты. С 1 мл полученного раствора выполнить описанную выше методику.

2. Контроль. На 10 анализов смешать в колбе 20 мл 0,25н. уксусной кислоты, 8 мл 0,33М раствора фосфата натрия, 2 мл 0,1н. раствора иода, 5 мл щелочного раствора сульфита натрия, 6 мл 5н. 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.

$$x = \frac{5,2 (E_{op} - E_k)}{E_{sp} - E_{k, 2}}$$

где x - концентрация дофамина в моче, мкг/мл,

E_{op} - интенсивность флуоресценции опытной пробы,

E_k - интенсивность флуоресценции контрольной пробы,

E_{sp} - интенсивность флуоресценции стандартной пробы,

$E_{k, 2}$ - интенсивность флуоресценции контроля к стандарту.

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАТЕХОЛАМИНОВ

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

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. 200г адсорбента встряхнуть с водой и поместить в колонку, перемешать стеклянной палочкой.

2. Экстракт вылить в колбу, добавить 5 мл 5% раствора ЭДТА. 1 каплю фенолфталеина, перемешать. Прибавлять по каплям рас-

твор 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% 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 10) 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) 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 (опытная и контрольная) и выполнить с ними последний этап анализа (пункты 7-12).

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

3. Опыт

Флюоресценцию измеряют не позднее, чем через час при следующих длинах волн возбуждения и флюоресценции 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).

Концентрацию исследуемых веществ вычисляют по следующим формулам:

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

$$C_D = \frac{E_2 - E_{\text{ДОФА}} \cdot C_{\text{ДОФА}}}{E_{D_2}},$$

$$C_N = \frac{E_3 - E_N - C_D \cdot (E_{E_3} - E_{E_N})}{E_{N_3} - E_{E_3}},$$

$$C_A = \frac{E_4 - E_{D_4} \cdot C_D - E_{N_4} \cdot C_N}{E_{A_4}}.$$

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

C_N - количество норадреналина;

C_D - количество дофамина;

$C_{\text{ДОФА}}$ - количество ДОФА

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

$E_A, E_D, E_N, E_{\text{ДОФА}}$ - флуоресценция стандартного раствора соответственно адреналина, норадреналина, дофамина и ДОФА при соответствующих длинах волн в условных единицах.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии. Минск: Беларусь, 1982.
2. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник /Под ред. В.В. Меньшикова. М.: Медицина, 1987.
3. Меньшиков В.В. Методы клинической биохимии гормонов и медиаторов. М. 1974.
4. Методы исследования нейро-эндокринных систем: Научн. труды Ленингр. ин-та усовершенств. врачей, вып. 105, ч. 3. Л., 1971.
5. Розен В.Б. Основы эндокринологии. М.: Высшая школа, 1994.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
Катехоламины	7
Исследование спектра флуоресценции катехоламинов	9
Определение адреналина, норадреналина, дофамина и ДОФА в крови и тканях	10
Определение адреналина, норадреналина и ДОФА в моче	13
Определение дофамина в моче	15
Хроматографический метод определения катехоламинов	16
Рекомендуемая литература	18
Содержание	19