

МИНИСТЕРСТВО ОБЩЕГО И ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО  
ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Кафедра биохимии

# МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭНДОКРИНОЛОГИЯ

*Спецпрактикум по курсу  
“Азотсодержащие соединения”*

*Часть 2*

Издательство “Самарский университет”  
1998

Методические рекомендации предназначены для студентов, специализирующихся по биологической химии, изучающих спецкурс "Молекулярная эндокринология". В практикуме приводятся современные методы исследования азотосодержащих информонов - гормонов, медиаторов, гистогормонов: ацетилхолина, гистамина, серотонина, тироксина, 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.

<b>Составители :</b>	докт. биол. наук	В.Г.Подковкин.
	докт. биол. наук	М.М.Серых.
<b>Отв. редактор</b>	канд. биол. наук	Ю.П. Фролов.

## Тема 1

### СИСТЕМА АЦЕТИЛХОЛИН - АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗА

Ацетилхолин является медиатором холинэргических синапсов, осуществляя взаимодействие между нервными клетками, а также между нервными окончаниями и эффекторными клетками. Пришедший к синапсу нервный импульс деполяризует пресинаптическую мембрану, что ведет к открытию в ней кальциевых каналов. Увеличение содержания кальция в цитозоле нервного окончания вызывает локальное высвобождение ацетилхолина из пресинаптической мембраны в синаптическую щель. Ацетилхолин связывается с рецептором постсинаптической мембраны, который представляет собой катионный канал, состоящий из 5 трансмембранных полипептидов, два из них имеют участки связывания ацетилхолина. При связывании 2-х молекул медиатора с пентамерным комплексом происходит его конформационное изменение, приводящее к открыванию канала примерно на одну миллисекунду, с последующим его закрыванием. Через открытый канал мембраны за этот срок проходит до 30 тысяч ионов натрия, которые деполяризуют мембрану. В мышцах локальная деполяризация постсинаптической мембраны открывает потенциалзависимые  $\text{Na}^+$  каналы, вызывая общую деполяризацию плазматической мембраны мышечной клетки, ведущую к временному открытию кальциевых каналов в мембранах саркоплазматического ретикулума и высвобождению кальция в цитозоль. Повышение внутриклеточной концентрации кальция вызывает сокращение миофибрилл в мышечной клетке. Есть данные о том, что в различных эффекторных клетках (мышечных, секреторных и др.) конечный эффект после взаимодействия ацетилхолина с рецептором обусловлен каскадами внутриклеточных ацетилхолинзависимых реакций с участием посредников (цГМФ, инозитолтрифосфата, диацилглицерола), в том числе участвующих в активировании протеникиназ, а следовательно - в фосфорилировании - дефосфорилировании белков ионных каналов и ферментов.

Для подготовки синапса к восприятию нового импульса должна наступить фаза быстрой инактивации или удаления ме-

диатора. В холинэргических синапсах большая часть ацетилхолина разрушается локализованной в постсинаптической мембране ацетилхолинэстеразой до ацетата и холина, которые активно транспортируются через пресинаптическую мембрану в нервное окончание, где вновь происходит синтез ацетилхолина при участии холинацетилтрансферазы и АТФ.

Некоторая часть ацетилхолина из синаптической щели диффундирует в межклеточное пространство, а затем в кровь. Интерес к поступлению ацетилхолина в кровь и его циркуляции в организме повышается в связи с тем, что рецепторы к ацетилхолину обнаружены в клетках, не имеющих иннервации (эритроциты и иммунные лимфоциты).

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.

#### Индивидуальные задания (на 2 занятия)

1. Определить активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) в плазме крови человека по методу Хестрина.
2. Определить активность АХЭ в плазме крови крысы по методу Хестрина.
3. Определить активность АХЭ в слюне человека.
4. Определить активность АХЭ в эритроцитах крысы по методу Хестрина.
5. Определить активность АХЭ в плазме крови человека по изменению рН среды.
6. Определить активность АХЭ в эритроцитах крысы по изменению рН среды.
7. Определить концентрацию ацетилхолиноподобных веществ в крови крысы.

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ  
АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ В ПЛАЗМЕ КРОВИ  
( С. Хестрин, 1949 )**

**РЕАКТИВЫ:**

1. 1/15M фосфатный буферный раствор, рН 7,8—11,9г двузамещенного фосфата натрия двухводного растворить в воде, довести до 1л.
2. 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 рН-метре.
3. 0,35% раствор ацетилхолина хлористого. 0,2 г (1 ампула) растворить в 57,1 мл воды.
4. 2 М раствор гидроксилamina хлористого. 13,9 г реактива растворить в воде, довести до 100 мл.
5. 50% трихлоруксусная кислота. К 250 г реактива прилить 250 мл воды, перемешать до растворения .
6. 3,5 н. раствор гидроокиси натрия. 35 мл 5н. гидроокиси натрия довести водой до 50 мл.
7. Смесь 2 М гидроксилamina и 3,5 н. гидроокиси натрия в соотношении 1:1. Готовить перед использованием.
8. 12% соляная кислота. К 300 мл воды прилить 150 мл концентрированной соляной кислоты.
9. 0,37 М хлорное железо. 30 г. хлорного железа шестиводного растворить в 0,1 н. соляной кислоте, довести до 500 мл.

**Ход анализа**

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% трихлоруксусной кислоты, перемешать палочкой. Центрифугировать 15 минут, 1500 об/мин.
4. Перенести 0,5 мл надосадочной жидкости в чистые пробирки, добавить 1 мл смеси гидроксилamina и гидроокиси натрия, перемешать.
5. Через 2 минуты прилить 0,5 мл 12% соляной кислоты. Перемешать.
6. Добавить 0,5 мл 0,37 М хлорного железа. Перемешать.
7. Через 15 минут измерить оптическую плотность на ФЭКе, светофильтр 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:

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

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% трихлоруксусной кислоты. Далее анализ выполняется по вышеописанному методу.

Формула для расчета:

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

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:

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

Обозначения в формуле те же.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ В ЭРИТРОЦИТАХ (С. Хесгрин, 1949)

### РЕАКТИВЫ:

1. 1/15M фосфатный буферный раствор. рН 7.8.
2. 0.35% раствор ацетилхолина хлористого
3. 2 M гидроксилламин хлористый.
4. 50% трихлоруксусная кислота.
5. 3,5 н. гидроокись натрия.
6. Смесь 2 M гидроксилламина и 3,5 н. гидроокиси натрия в соотношении 1:1. Готовить перед использованием
7. 12% соляная кислота.

- 0,37 М хлорное железо.
- 0,2% раствор титрона X-100.
- 0,9% раствор хлористого натрия (изотонический).

#### МЕТОДИКА:

1. 1 мл крови, собранной в стакан с 0,1 мл 5% 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% титрона 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 °C).

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 гидроксилamina и гидроокиси натрия, перемешать.

7. Через 2 минуты прилить 0,5 мл 12% 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 титрона X-100.

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

3. Опыт.

Расчет производят по формуле:

$$x = (E_{st} - E_{ot}) \cdot 23,46.$$

где X - определяемая активность АХЭ, мкмоль/мл.мин.

$E_{st}$  - оптическая плотность стандартной пробы (против контроля),

$E_{ot}$  - 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.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ (Т.В.Правдич-Неминская, 1949)

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

### 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. pH=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 pH. Объем довести дистиллированной водой до 200 мл.
4. 0,05 % водный раствор прозерина.

### Ход анализа

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.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЦЕТИЛХОЛИНПОДОБНЫХ ВЕЩЕСТВ В КРОВИ (С. Хестрин, 1949)

### РЕАКТИВЫ:

1. 10 % 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% раствор соляной кислоты.
6. 0,37 М раствор хлорного железа.

### Ход анализа

1. К 1 мл крови прилить 2 мл 10% 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 % 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.

**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 ацетилхолинподобных веществ вычисляют по калибровочной кривой.

### Тема 2

## ТИРЕОИДНЫЕ ГОРМОНЫ

Синтез тиреоидных гормонов протекает в щитовидной железе путем йодирования тирозиновых остатков тиреоглобулина — белка с молекулярной массой 660 тысяч, построенного из пяти тысяч аминокислот, содержащего около 120 тирозилов и 300 углеводов. В начале в составе тиреоглобулина образуются моноид- и диодтирозины, после чего происходит внутримолекулярная перегруппировка — «сшивка» двух йодированных тирозилов, с образованием трийодтиронина и тироксина. При последующей протеолизе одной молекулы тиреоглобулина образуются лишь 2-5 молекул тироксина (Т<sub>4</sub>) и трийодтиронина (Т<sub>3</sub>). Синтез и секреция тиреоидных гормонов нахо-

дятся под контролем гипоталамо-гипофизарной системы.  $T_3$  и  $T_4$  секретируются путем пиноцитоза в молекулярных соотношениях, равных 4 : 1.

Тиреоидные гормоны могут циркулировать в крови в неизменном виде в течение нескольких дней в комплексе с тироксинсвязывающим глобулином и преальбуминами плазмы крови.

В настоящее время в реализации гормонального эффекта  $T_3$  и  $T_4$  на молекулярном уровне признается несколько путей. Один из них - дейодирование  $T_3$  и  $T_4$  с образованием высокоактивных радикалов йода, второй - через активирование аденилциклазной системы, третий - дерепрессия генов путем активации ядерных рецепторов тиреоидными гормонами. Рецепторы, избирательно связывающие  $T_3$  и  $T_4$ , локализованы в ядре, в котором обнаруживают до 60-80% йода этих гормонов. Ядерные рецепторы обладают более высоким сродством к  $T_3$ , чем к  $T_4$ . Это указывает на то, что именно  $T_3$  является внутриклеточной формой гормона щитовидной железы. Внутриклеточный  $T_3$  в значительной степени является продуктом дейодирования  $T_4$  и, по-видимому, реакция дейодирования тироксина является необходимой ступенью в механизме действия тиреоидных гормонов.

При введении тироксина в организме животных повышается активность около 100 различных ферментов, оказывающих влияние на множество физиологических функций, регулирующих скорость обмена белков, углеводов, липидов, воды, электролитов, рост и дифференцировку тканей, ускоряя транспорт электронов в митохондриях и другие процессы. Поэтому и гипо- и гиперфункция щитовидной железы вызывает глубокие расстройства физиологического статуса организма.

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

Для оценки функции щитовидной железы необходимо определение концентрации тироксина в крови. Количественное определение белковосвязанного йода 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 йод перешел в ионы  $I^-$ . На втором этапе количественного определения используется свойство ионов йода ускорять реакцию разложения роданида железа в присутствии нитратов и нитритов в кислой среде. Величина, характеризующая ускорение названной реакции, пропорциональна концентрации йода. Количество роданида железа, имеющего оранжевую окраску, измеряется колориметрически.

## Индивидуальные задания

1. Определить содержание белковосвязанного иода в сыворотке крови крысы.
2. Определить содержание белковосвязанного иода в сыворотке крови человека.

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВОСВЯЗАННОГО ИОДА ( Ю.И. Еремин и соавт., 1980 )

#### РЕАКТИВЫ:

1. 10% раствора сульфата цинка.
2. 1 н. раствор гидроокиси натрия. 40 г реактива растворить в воде, довести до 1 л. Оттитровать.
3. 20% раствора нитрата калия.
4. 0,006 М раствор роданида калия (0,6 г/л).
5. 2% раствор нитрата натрия .
6. 10% раствор железозамонийных квасцов в 2 н. азотной кислоте. Азотную кислоту готовить из фиксаля. 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 анализа

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% 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:

$$x = 25 \frac{E_x - E_{оп}}{E_s - E_{оп}}$$

где  $x$  - концентрация белковосвязанного иода в сыворотке, мкг

$E_x$  - оптическая плотность контроля.

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

$E_s$  - оптическая плотность стандарта.

## 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 орто - фталевым альдегидом в щелочной среде с образованием флуоресцирующего соединения. Продукт реакции неустоек 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 аналогичен предыдущему и 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.

#### Индивидуальные задания (на 2 занятия)

1. Исследовать спектр флуоресценции гистамина.
2. Исследовать спектр флуоресценции серотонина.
3. Определить концентрацию гистамина и серотонина в крови крысы методом ионообменной хроматографии.
4. Определить концентрацию гистамина и серотонина в головном мозге крысы методом экстракции.

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГИСТАМИНА И СЕРОТОНИНА МЕТОДОМ ЭКСТРАКЦИИ (В.Г. Подковкин, 1995)

#### РЕАКТИВЫ:

1. 10% раствор трихлоруксусной кислоты
2. 7% 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% этиловый спирт, дважды перегнанный.
9. 0,1% раствор орто-фталевого 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% раствора трихлоруксусной кислоты (концентрация 1 мкг/мл).

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

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

### Сбор и хранение материала

В центрифужные пробирки с 4 мл 10% 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% растворе трихлоруксусной кислоты (10 мл на 1 г ткани). Также 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 анализа

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 орто-фталевого альдегида, тщательно перемешивают. Через 4 минуты приливают 0,5 мл 1,5 М раствора орто-

фосфорной кислоты, перемешивают. Величину флуоресценции измеряют при длине волны 470 нм, используя для возбуждения светофильтр с максимум 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 помешают 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% раствора трихлоруксусной кислоты выполняют все вышеописанные процедуры.

Расчет концентрации гистамина и серотонина производят по формуле:

$$x = K \frac{E_{xy} - E_x}{E_y - E_x}, \text{ где}$$

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.

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГИСТАМИНА И СЕРОТОНИНА МЕТОДОМ ИОНООБМЕННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ (В.Г. Подковкин, 1990)

#### РЕАКТИВЫ:

1. 57% раствор хлорной кислоты.
2. 10% 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 % этиловый спирт.

14. 0,1% раствор орто-фталевого 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% трихлоруксусной кислоты вносят 0,5 мл крови, перемешивают, оставляют на 30 минут для экстракции. Ткани и органы быстро извлекают, взвешивают и гомогенизируют в 10% трихлоруксусной кислоте (10 мл на 1 г. ткани). Также, 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. Если экстракт остается при этом мутным, его фильтруют через мелкопористый фильтр. Материал может храниться несколько дней в холодильнике.

### Ход анализа

К 2 мл экстракта добавляют 0,1 мл 57 % 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.

### О п р е д е л е н и е г и с т а м и н а

К элюату добавляют 0,15 мл 5 н. раствора гидроксида натрия, 0,1 мл раствора орто-фталевого 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 максимум пропускания 365 нм на флуориметре БИАН-130. Интенсивность свечения стабильна в течение 30 минут.

### О п р е д е л е н и е с е р о т о н и н а

К экстракту добавляют 0,33 М раствор фосфата натрия для проведения 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.

#### С т а н д а р т

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

#### К о н т р о л ь

С 2 мл 10% трихлоруксусной кислоты выполняют описанную методику.

Р а с ч е т концентрации гистамина или серотонина производят по формуле:

$$x = \frac{E_{0x} - E_k}{E_{0x} - E_{0y}} \cdot \text{где}$$

X - концентрация гистамина (серотонина) в мкмоль/л;

$E_{0y}$  - флуоресценция исследуемой пробы.

$E_{0x}$  - флуоресценция стандартной пробы.

$E_k$  - флуоресценция контрольной пробы.

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГИСТАМИНА  
КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ**  
(Н.В.Климкина, С.И.Плутман, 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.

**РЕАКТИВЫ:**

1. 10% раствор трихлоруксусной кислоты.
  2. 7% раствор аскорбиновой кислоты. Готовится перед использованием.
  3. 5 н. раствор гидроксида натрия.
  3. 1 н. раствор гидроксида натрия.
  4. Карбонат натрия безводный.
  4. 20% раствор карбоната натрия.
  6. Смесь бутанола и хлороформа 3:2.
  7. Концентрированная соляная кислота (36% 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 1н. гидроксида натрия.
  4. 11. 4% раствор нитрита натрия.
  12. 0,1% 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% раствора трихлоруксусной кислоты (концентрация 1 мкг/мл).

**Сбор и хранение материала**

В центрифужные пробирки с 4 мл 10% 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% растворе трихлоруксусной кислоты (10 мл на 1 г ткани). Также как и кровь, гомогенат оставляют для экстракции на 30 минут: при необ-

ходимости 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 анализа

К 4 мл экстракта добавляют 0,2 мл раствора аскорбиновой кислоты и 1 каплю тимолового синего, перемешивают. После этого приливают по каплям 5н. раствор гидроксида натрия до появления светло-красной окраски. Перемешивают после каждой капли. Затем приливают 1н. раствор гидроксида натрия до светло-желтой окраски. Если раствор окрасится в синий цвет (щелочная реакция), немедленно добавляют каплю 1н. 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.

#### С т а н д а р т

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

#### К о н т р о л ь

С 4 мл 10% трихлоруксусной кислоты выполняют описанную методику.

Расчет концентрации гистамина и серотонина производят по калибровочной кривой.

## 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

<b>Тема 1. Система ацетилхолин - ацетилхолинэстераза</b>	3
Определение активности ацетилхолинэстеразы в плазме крови.....	5
Определение активности ацетилхолинэстеразы в эритроцитах .....	6
Определение активности ацетилхолинэстеразы.....	8
Определение ацетилхолиноподобных веществ в крови	9
<b>Тема 2. Тиреоидные гормоны</b> .....	9
Определение белковосвязанного пода.....	11
<b>Тема 3. Гистамин и серотонин</b> .....	13
Определение гистамина и серотонина методом экстракции .....	14
Определение гистамина и серотонина методом ионообменной хроматографии.....	16
Определение гистамина колориметрическим методом	19
Рекомендуемая литература .....	21
Содержание .....	22