

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель министра здравоохранения,
Главный государственный санитарный врач



М.И. Римжа

25 апреля 2005 г.

Регистрационный № 29–0205

**ИНСТРУКЦИЯ
ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ВЕЩЕСТВ СРЕДНЕЙ
МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ И ПРОДУКТОВ
ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ БЕЛКОВ
В ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

Инструкция по применению

Учреждение-разработчик: Республиканский научно-практический
центр гигиены

Авторы: Л.В. Половинкин, С.В. Ткачев, Т.И. Половинкина, С.Н. Еже-
лева, Л.И. Сорока

ВВЕДЕНИЕ

На современном этапе весьма интенсивно проводятся исследования, направленные на разработку методов индикации экзо- и эндогенной интоксикаций. Так, для оценки выраженности пред- и патологических процессов в организме в клинической практике в качестве общепризнанного критерия получили значительное распространение методы определения веществ средней молекулярной массы (ВСММ) при различных заболеваниях (нефриты, дерматозы, злокачественные новообразования, перитонит и пр.). Это обусловлено тем, что в состав ВСММ входят продукты катаболизма белков, олигосахара, производные глюкозуриновых кислот, нуклеотиды, биологически активные вещества, которые сами по себе могут оказывать повреждающее и токсическое воздействие на мембраны клеток, увеличивать проницаемость сосудов, вызывать тканевую гипоксию. Вместе с тем в научной литературе отсутствуют сведения об использовании метода определения ВСММ в профилактической токсикологии для оценки опасности и гигиенической стандартизации веществ в объектах окружающей среды.

Исследования процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и состояния антиоксидантной системы стали традиционными и рутинными способами оценки резистентности организма в условиях эндо- и экзогенной интоксикации в клинической и экспериментальной практике. ПОЛ рассматривается в качестве универсального первичного механизма, обуславливающего возникновение и развитие различных патологических состояний, в том числе через повреждение других биомолекул и инициацию свободнорадикальных процессов. Однако ряд авторов указывают на существование альтернативного механизма формирования патологических состояний, связанных с инициацией активных форм кислорода и окислением клеточных протеинов как первичных субстратов реакций. Это подтверждается экспериментальными данными, полученными на культурах клеток эритроцитов, фибробластов, ретикулоцитов, а также на изолированных субклеточных мембранах (микросомы), хлоропластах. На фоне значительного количества работ о биологической роли продуктов перекисного окисления белков (ПОБ) практически отсутствует информация об их использовании в качестве лимитирующих показателей при токсикологической оценке ксено-

биотиков и их гигиенической стандартизации в объектах окружающей среды.

Таким образом, экспериментальная разработка и апробация методов определения ВСММ и продуктов ПОБ для их последующего использования при токсикологической оценке и гигиеническом регламентировании ксенобиотиков в объектах окружающей среды является весьма актуальной проблемой.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

В настоящей инструкции изложены методы определения ВСММ и продуктов ПОБ (карбонилпроизводные аминокислот (КПА), триптофан и битирозин) в биологических средах (плазма крови, эритроциты, моча) экспериментальных животных.

Инструкция предназначена для специалистов токсикологических подразделений практической санитарной службы (областных ЦГЭиОЗ, РЦГЭиОЗ), гигиенических кафедр медицинских университетов и других учреждений, занимающихся токсикологической оценкой и гигиенической регламентацией химических веществ в объектах окружающей среды.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЕЩЕСТВ СРЕДНЕЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ И ПРОДУКТОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ БЕЛКОВ В ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Метод определения веществ средней молекулярной массы

Принцип метода заключается в осаждении крупномолекулярных частиц плазмы крови и эритроцитов 15% раствором трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и регистрации спектральной характеристики водного раствора супернатанта при длинах волн 242, 246, 254, 258, 266, 274, 282, 298 нм.

Аппаратура, реактивы

Аппаратура:

- центрифуга лабораторная (ОПН-3, ОПН-8);
- пробирки центрифужные по ГОСТ 1770-74;
- дозаторы (объем 0,1–1,0 мл, 1–5 мл);
- спектрофотометр (СФ-26, СФ-46).

Реактивы:

- цитрат натрия (натрий лимоннокислый 3-замещенный);

- натрий хлористый по ГОСТ 4233-77;
- ТХУ по ТУ 472К-С14/499-007-92.

Растворы:

- 15% раствор ТХУ;
- 3,9% раствор цитрата натрия;
- 0,9% раствор хлористого натрия.

Отбор и подготовка проб

Забор крови производится в центрифужные пробирки. Кровь заготавливают на 3,9% растворе цитрата натрия в соотношении 1:9. Для исследования достаточно 3 мл крови. Центрифугируют в течение 5 мин при 1500 об./мин. Плазму отделяют. Для получения пробы с эритроцитами эритроцитарную массу доводят до исходного объема крови изотоническим раствором натрия хлорида, перемешивают.

Для приготовления пробы с мочой 0,1 мл мочи разводят 0,9 мл изотонического раствора натрия хлорида (соотношение 1:9).

Ход определения

Для определения находящихся в и на эритроцитах ВСММ отбирают 1 мл пробы с эритроцитами и производят осаждение 0,5 мл 15% раствора ТХУ, как и при исследовании плазмы крови. Пробы тщательно перемешивают стеклянными палочками, инкубируют при комнатной температуре 5–7 мин, центрифугируют при 3000 об./мин в течение 30 мин.

Для удобства можно сократить время центрифугирования при увеличении скорости вращения ротора центрифуги: при 4000 об./мин — 20 мин, при 5000 об./мин — 15 мин, при 6000 об./мин — 10 мин.

После центрифугирования отбирают 0,5 мл супернатанта и разводят 4,5 мл дистиллированной воды. Пробы фотометрируют против контрольного раствора, приготовленного аналогично исследуемым пробам (вместо биоматериала добавляется равноценное количество дистиллированной воды), с подстройкой прибора на новую длину волны. Полученные значения экстинкций выражают в условных единицах.

Общий уровень ВСММ, регистрируемых на испытуемых длинах волн, вычисляется по следующей формуле:

$$\text{ВСММ}_{\text{сумм.}} = (E_{242} + E_{246} + E_{254} + E_{258} + E_{266} + E_{274} + E_{282} + E_{298}) \text{ усл. ед.}$$

Спектрограмма плазмы крови белых крыс при длине волны 242 нм в норме ниже порога чувствительности метода. Начиная с 246 нм в норме спектрограмма имеет равномерно восходящие значения экстинкций с максимальными значениями при длине волны 282 нм.

Профиль спектрограммы при анализе супернатанта после осаждения эритроцитарной массы ТХУ имеет вид гиперболы с максимумом экстинкции при длине волны 258 нм. Высота стояния максимума в норме между $E = 0,5 \dots 0,6$ усл. ед.

Спектрограмма мочи имеет два максимума: первый — при длине волны 240–244 нм, соответствующий пику содержания мочевины, мочевой кислоты, креатинина, и второй — при 282 нм, соответствующий основному максимуму веществ (оротидин-5-фосфат, фосфорные производные инозина, цитидин-3-фосфат, триптамин, изогуанин, цитидинхолин) плазмы крови.

Определение ВСММ в плазме и эритроцитах позволяет оценить интоксикацию в цельной крови, установить степень интоксикации, а также выбрать метод детоксикационной терапии.

Методы определения интенсивности процессов перекисного окисления белков

Свободнорадикальное окисление белков приводит к образованию различных производных аминокислот, таких как карбонил, дериваты аминокислот, битирозин, дериваты триптофана, уровень содержания которых может использоваться при оценке степени окислительной модификации белков при различных патологических состояниях.

Метод определения карбонилпроизводных аминокислот

Метод определения КПА основан на реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ), приводящей к образованию динитрофенилгидразонов.

Аппаратура, реактивы

Аппаратура:

- центрифуга лабораторная (ОПН-3);
- пробирки центрифужные по ГОСТ 1770-74;
- дозаторы (объем 0,1–1,0 мл, 1–5 мл);

– спектрофотометр (СФ-46).

Реактивы:

- 2,4-ДНФГ;
- ТХУ по ТУ 472К-С14/499-007-92;
- соляная кислота (HCl);
- этиловый спирт 96% раствор;
- этилацетат;
- мочевины.

Растворы:

- 10 мМ 2,4-ДНФГ, приготовленный на 2 М растворе HCl;
- 20% ТХУ;
- смесь этилового спирта с этилацетатом (1:1);
- 8 М мочевины.

Отбор и подготовка проб

Забор крови производится в центрифужные пробирки. Кровь заготавливают на 3,9% растворе цитрата натрия в соотношении 1:9. Центрифугируют в течение 5 мин при 1500 об./мин. Плазму отделяют.

Ход определения

Для определения уровня КПА к 0,1 мл плазмы крови добавляют 1 мл 10 мМ раствора 2,4-ДНФГ, приготовленного на 2 М HCl, инкубируют при комнатной температуре в течение 1 ч. Инкубационную смесь интенсивно встряхивают каждые 10–15 мин. После инкубации белок осаждают добавлением 1 мл 20% ТХУ. Пробу центрифугируют при 3000 об./мин в течение 15–20 мин.

Осадок 3 раза промывают смесью этанола с этилацетатом, затем просушивают для устранения данной смеси. Просушенный осадок растворяют в 3 мл 8 М мочевины и выдерживают в кипящей водяной бане 5 мин.

Нерастворимый осадок удаляют центрифугированием в течение 5 мин при 3000 об./мин.

Оптическую плотность образовавшихся динитрофенилгидразонов регистрируют на СФ-46 при длине волны 370 нм.

Обработка результатов

Для расчета количества карбонильных групп используют коэффициент молярной экстинкции для динитрофенилгидразо-

нов, который равен 21000 M^{-1} . Полученный результат выражают в мкмоль КПА/мл плазмы.

Метод определения флуоресценции битирозина

В ходе одноэлектронного окисления тирозина образуется долгоживущий тирозил-радикал, который при взаимодействии с таким же радикалом образует битирозиновые сшивки.

Аппаратура, реактивы

Аппаратура:

- центрифуга лабораторная (ОПН-3);
- пробирки центрифужные по ГОСТ 1770-74;
- дозаторы (объем 0,1–1,0 мл, 1–5 мл);
- спектрофлуориметр SFM 25 Kontron.

Реактивы:

- калий фосфорнокислый 1-замещенный;
- натрий фосфорнокислый 2-замещенный 2-водный.

Раствор: 1/15 М фосфатный буфер (рН 7,4), содержащий раствор калия фосфорнокислого 1-замещенного (9,078 г/л) и раствор натрия фосфорнокислого 2-замещенного 2-водного (11,876 г/л).

Отбор и подготовка проб

Забор крови производится в центрифужные пробирки. Кровь заготавливают на 3,9% растворе цитрата натрия в соотношении 1:9. Центрифугируют в течение 5 мин при 1500 об./мин. Плазму отделяют.

Ход определения

Для определения флуоресценции битирозина готовят 2% раствор плазмы крови на 1/15 М фосфатном буфере (рН 7,4). Для этого 0,1 мл плазмы доводят до 5 мл 1/15 М раствором фосфатного буфера (рН 7,4).

Битирозиновую флуоресценцию измеряют при длине волны возбуждения — 325 нм и при длине волны испускания — 416 нм. Интенсивность флуоресценции выражают в условных единицах.

Метод определения флуоресценции триптофана

Свободнорадикальное окисление аминокислотных остатков триптофана приводит к его деградации, проявляющейся в снижении интенсивности флуоресценции в области 336 нм.

Аппаратура, реактивы

Аппаратура:

- центрифуга лабораторная (ОПН-3);
- пробирки центрифужные по ГОСТ 1770-74;
- дозаторы (объем 0,1–1,0 мл, 1–5 мл);
- спектрофлуориметр SFM 25.

Реактивы:

- калий фосфорнокислый 1-замещенный;
- натрий фосфорнокислый 2-замещенный 2-водный.

Раствор: 1/15 М фосфатный буфер (рН 7,4), содержащий раствор калия фосфорнокислого 1-замещенного (9,078 г/л) и раствор натрия фосфорнокислого 2-замещенного 2-водного (11,876 г/л).

Отбор и подготовка проб

Забор крови производится в центрифужные пробирки. Кровь заготавливают на 3,9% растворе цитрата натрия в соотношении 1:9. Центрифугируют в течение 5 мин при 1500 об./мин. Плазму отделяют.

Ход определения

Для определения флуоресценции триптофана готовят 0,4% раствор плазмы крови на 1/15 М фосфатном буфере (рН 7,4). Для этого 20 мкл плазмы доводят до 5 мл 1/15 М раствором фосфатного буфера (рН 7,4).

Триптофановую флуоресценцию регистрируют при длине волны возбуждения — 297 нм и при длине волны испускания — 336 нм. Интенсивность флуоресценции выражают в условных единицах.

Рекомендуемые методы оценки перекисного окисления липидов и показателей антирадикальной защиты организма

Для комплексной оценки интоксикации организма параллельно с определением ВСММ и продуктов ПОБ (КПА, триптофан и битизин) рекомендуется использовать следующие методы:

1. Определение активности глутатионредуктазы, глутатион-трансферазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, супероксиддисмутазы в гемолизатах крови.
2. Определение содержания глутатиона восстановленного, общих SH-групп в гемолизатах крови, малонового диальдегида, диеновых конъюгатов — в плазме крови.

Приложение 1

**Значение экстинкций водных супернатантов плазмы крови
и эритроцитов белых крыс в норме**

Длина волны, нм	Плазма крови n = 50	Эритроциты n = 50
242	0	$0,15 \pm 0,006$
246	$0,06 \pm 0,003$	$0,30 \pm 0,007$
254	$0,07 \pm 0,003$	$0,51 \pm 0,009$
258	$0,08 \pm 0,002$	$0,50 \pm 0,010$
266	$0,10 \pm 0,002$	$0,52 \pm 0,009$
274	$0,12 \pm 0,003$	$0,37 \pm 0,007$
282	$0,11 \pm 0,003$	$0,23 \pm 0,006$
298	$0,04 \pm 0,001$	$0,08 \pm 0,003$

Приложение 2

**Максимальная оптическая плотность некоторых продуктов
метаболизма белков у белых крыс**

Длина волны, нм	Вещество
241	2,6-аминопурин
243	Пиримидин
247	Тиамин 2,6-диаминопурин
251	1-метилгуанин Инозин
255	N ₂ -диметилгуанин 2-дезоксигуаниловая кислота Гуанид Дезоксирибозид
258	1-гуанозин 6-тиогуанин 2-дезоксаденозин Адениндезоксирибозид
266	п-аминобензойная кислота Тиамин Тиаминмонофосфат Тиаминдифосфат Тиамин-5-фосфат
268	7-метилксантин 1,7-диметилксантин
276	Цитозин Витамин А
282	Оротидин-5-фосфат Фосфорные производные инозина Цитидин-3-фосфат Триптамин Изогуанин Цитидинхолин
290	Пиридоксамин Пиридоксин
300	Ретинол

Приложение 3

**Содержание в норме продуктов перекисного окисления белков
в плазме крови белых крыс (n = 35)**

Флуоресценция триптофана, усл. ед.	Флуоресценция битирозина, усл. ед.	Карбонилпроизводные аминокислот, мкмоль/мл
72,8 ± 2,58	14,3 ± 0,62	26,9 ± 1,66