

плотностей (D) производят на спектрофотометре. Каждая фаза оценивается против соответствующего контроля при длинах волн 220 нм (поглощение изолированных двойных связей), 232 нм (поглощение ДК), 278 нм (поглощение ТК) и 400 нм (поглощение ОШ). Содержание ДК, ТК и ОШ оценивают по относительным величинам D_{232} / D_{220} , D_{278} / D_{220} , D_{400} / D_{220} и выражают в относительных единицах.

При анализе с использованием ВЭЖХ, установлено, что ДК, образующиеся в организме человека, в основном представлены изомерами линолевой кислоты, октодека-9 (цис), 11(транс)-диеновой кислоты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fricke, H. Chemical dosimeter ch 12 in Radiation dosimetry / H.Fricke, E. J. Hart. — Instrumentation. — Academic Press. — 1966 — Vol. 2. — P. 167–239.
2. Чеснокова, Н. П. Типовые патологические процессы / Н. П.Чеснокова. — Саратов: Саратовский медицинский университет, 2004. — С. 132–136.
3. Состояние перекисного окисления липидов, антиоксидантной защиты крови у больных инфарктом миокарда, отягощенным недостаточностью кровообращения / Н. И. Тарасов [и др.] // Тер. архив. — 2002. — № 12. — С. 12–15.
4. Курашвили, Л. В. Современное представление о перекисном окислении липидов и антиоксидантной системе при патологических состояниях: метод. пособие / Л. В. Курашвили, Г. А. Косой, И. Р. Захарова. — Пенза: Инс-т усоверш. врачей МЗ РФ, 2003. — 32 с.
5. Эллиот, В. Биохимия и молекулярная биология / В. Эллиот, Д. Эллиот. — М.: Наука, 2002. — 446 с.
6. Методы изучения стрессовых и адаптационных реакций организма по показателям системы крови / А. В. Дерюгина [и др.] // Н.-Новгород: Нижегородский государственный университет, 2010. — 25 с.

УДК: 61:577.3

КОМПЛЕКСНЫЕ ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ПРОДУКТОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ СО СВОБОДНЫМИ РАДИКАЛАМИ КИСЛОРОДА (МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА. ЧАСТЬ 3 — МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МАЛОНОВОГО АЛЬДЕГИДА И ТИОЛОВЫХ ГРУПП МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ)

Игнатенко В. А., Калинин А. Л., Евтухова Л. А.

Учреждение образования

«Гомельский государственный медицинский университет»

г. Гомель, Республика Беларусь

Малоновый диальдегид (МДА) — вторичные продукты ПОЛ. Как известно, МДА образуется только из жирных кислот с 3-мя и более двойными связями. МДА принадлежит важная роль в синтезе простагландинов, прогестерона и других стероидов [1]. Отрицательная роль МДА заключается в том, что он сшивает молекулы липидов и понижает текучесть мембраны. Вследствие этого мембрана становится более хрупкой. Нарушаются процессы связанные с изменением поверхности мембраны: фагоцитоз, пиноцитоз, клеточная миграция и др. [1].

Гидроперекиси, ненасыщенные альдегиды, являются мутагенами и обладают выраженной цитотоксичностью. Они подавляют активность гликолиза и окислительного фосфорилирования, ингибируют синтез белка и нуклеиновых кислот, нарушают секрецию триглицеридов гепатоцитами, ингибируют различные мембранносвязанные ферменты [2].

Определение количества образующегося МДА с помощью тиобарбитуровой кислоты (ТБК) может быть одним из методов оценки интенсивности процессов перекисного окисления липидов [3, 4].

Принцип метода. В основе метода лежит реакция между МДА и ТБК, которая при температуре 90–100 °С и кислом значении рН протекает с образованием окрашенного триметинового комплекса, содержащего одну молекулу МДА и две молекулы тиобарбитуровой кислоты. Максимум поглощения комплекса приходится на 532 нм (зеленый светофильтр) [5, 6].

Для определения МДА используют следующие реактивы: раствор гемолитика 0,15 М калия хлорид в 1 мМ ЭДТА, рН = 7,4, 30 % раствор трихлоруксусная кислота (ТХУК), 0,75 % раствор тиобарбитуровой кислоты (ТБК), 0,85 % раствор натрия хлорид, антикоагулянт (цитрат натрия: 3,8 % раствор), взвесь отмытых эритроцитов (исследуемые растворы или взвеси): цельную кровь собирают в центрифужную пробирку, куда предварительно вносят 1–1,5 мл антикоагулянта и центрифугируют 10 мин при 1500 об./мин. Надосадочную жидкость сливают, а эритроциты дважды отмывают тройным объемом 0,85 % раствора натрия хлорида, каждый раз центрифугируя при указанных выше условиях и сливая надосадочную жидкость.

Ход определения

1. В центрифужную пробирку вносят 0,1 мл взвеси эритроцитов (исследуемого раствора или взвеси), 1,9 мл раствора гемолитика и тщательно перемешивают; затем приливают 2 мл 30 % ТХУК и 2 мл 0,75 % ТБК, вновь перемешивают. Пробирку помещают на кипящую водяную баню (15 мин). После охлаждения до комнатной температуры центрифугируют (10 мин, 3000 об./мин.). Центрифугат колориметрируют в кювете с рабочей длиной 10 мм при зеленом светофильтре (530–540 нм) против контроля.

Расчет концентрации МДА (С) проводят по формуле:

$$C = D \cdot 50 / 1,56 \text{ нМоль/мл эритроцитов,}$$

где D — оптическая плотность; 50 — разведение; 1,56 нМоль/мл эритроцитов — молярный коэффициент экстинкции МДА.

2. Для количественного нахождения ТБК активных продуктов в сыворотке или плазме крови, в растворах белка, используют метод основанный на определении экстрагируемого бутанолом окрашенного комплекса продукта ПОЛ с ТБК. Для определения МДА используют следующие реактивы: ТБК (150 мг на 31 мл дистиллированной воды), ортофосфорная кислота (1,4 %), n-бутанол — около 120 мл.

ТБК растворяют в воде при температуре 60 °С 10–15 мин. При охлаждении раствора выпадает осадок, который не влияет на качество анализа. Раствор используют при комнатной температуре, хранят при температуре + 2–8 °С 2 месяца.

Проведение анализа. В пробирки вносят реактивы в следующей последовательности.

1. *Опытная проба:* ортофосфорная кислота — 3,0 мл, сыворотка (плазма) крови — 0,25 мл, раствор ТБК — 1,0 мл, пробирку накрывают конденсирующим колпачком и помещают в водяную баню на 45 мин при 100 °С. После кипения пробирки охлаждают в холодной воде 3–5 мин. Добавить в пробирку n-бутанол — 4,00 мл.

2. *Контрольная (холостая) проба.* Ортофосфорная кислота — 3,0 мл, дистиллированная вода — 0,25 мл, раствор ТБК — 1,0 мл, пробирку накрывают конденсирующим колпачком и помещают в водяную баню на 45 мин при 100 °С. После кипения пробирки охлаждают в холодной воде 3–5 мин. Добавить в пробирку n-бутанол — 4,00 мл.

Растворы находящиеся в пробирках интенсивно встряхивают до образования однородной белой суспензии имеющей розовый оттенок. Затем пробирки центрифугируют 10 мин при 3000 об/мин (1800 g).

Если после центрифугирования верхний слой бутанола не прозрачный, то необходимо перемешать верхний слой, а затем повторить центрифугирование. Сразу после центрифугирования отбирают 3 мл бутанола супернатанта в чистую пробирку и измеряют оптическую плотность опытной пробы против контрольной на 2-х длинах волн: 535 и 570 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Измерения проводят не позднее 1,5 ч после центрифугирования.

Расчет ТБК активных продуктов производят по формуле:

$$C = 16(D_{535} - D_{570}) / 0,156,$$

где: С — ТБК активные продукты в опытной пробе мкмоль/л;

D_{535} — оптическая плотность пробы при 535 нм;
 D_{570} — оптическая плотность пробы при 570 нм;
0,156 — коэффициент молярной экстинкции комплекса МДА-ТБК в л/мкмоль/см;
16 — коэффициент разведения растворов.

Определения МДА можно производить и флуориметрическим методом. Например, определение МДА-ТБК комплекса при длине волны возбуждения — λ возб. = 515 нм и длине волны испускания — $\lambda_{\text{исп}} = 554$ нм. Для образования флуоресцентных комплексов с МДА можно использовать 4,4-сульфонилданилин, этил- р-аминобензоат, р-аминобензойную кислоту, 4-аминоацетофенон.

Окисление тиоловых групп мембранных белков

Этот процесс может приводить в результате к неферментативной реакции SH-групп белков, пептидов и аминокислот (Pr) со свободными радикалами липидов. При этом образуются сульфгидрильные радикалы, которые затем взаимодействуют с образованием дисульфидов либо окисляются кислородом с образованием производных сульфоновой кислоты:

$\text{Pr-SH} + \text{L}\cdot \rightarrow \text{LH} + \text{Pr-S}\cdot$ $\text{Pr}_1\text{-S}\cdot + \text{Pr}_2\text{-S}\cdot \rightarrow \text{Pr}_1\text{-SS-Pr}_2$ $\text{Pr-S}\cdot + \text{O}_2 \rightarrow \text{Pr-SO}_2\cdot \rightarrow$
производные сульфоновой кислоты

Большую роль в патологии клетки играет инактивация ион-транспортных ферментов, в активный центр которых входят тиоловые группы, в первую очередь Ca^{2+} -АТФазы. Инактивация этого фермента приводит к замедлению «откачивания» ионов кальция из клетки и, наоборот, к входу кальция в клетку, увеличению внутриклеточной концентрации ионов кальция и повреждению клетки. Наконец, окисление тиоловых групп мембранных белков приводит к появлению дефектов в липидном слое мембран клеток и митохондрий. Под действием разности электрических потенциалов на мембранах через такие поры в клетки входят ионы натрия, а в митохондрий — ионы калия. В результате происходит увеличение осмотического давления внутри клеток и митохондрий и их набухание. Это приводит к еще большему повреждению мембран.

Определение концентрации глутатиона

Принцип метода. Об уровне свободных SH-групп глутатиона (G-SH) судят по количеству пошедшего на титрование раствора йодноватистокислого калия. Окисленный глутатион переводят в восстановленную форму с помощью цинковой пыли и вновь оттитровывают SH-группы; получают общий глутатион (G-SH + G-S-S-G). Окисленный глутатион определяют по разнице (общий глутатион - G-SH). Для этой цели используют следующие реактивы: 25 % раствор ССК, 22 % раствор ССК, 4 % раствор сульфосалициловая кислота (ССК), 5 % раствор йодистого калия, цинковая пыль, 1 % раствор (готовится в день определения) крахмала, 0,005 N раствор йодноватистокислого калия (KJO_3): 0,1783 г в 1 л воды — Основной раствор, 0,001 N раствор KJO_3 : в мерную колбу на 250 мл вносят 50 мл основного раствора и 22,8 мл 22 % раствора ССК, перемешивают и доводят дистиллированной водой до метки — рабочий раствор для титрования.

Ход определения

В колбу емкостью 50 мл наливают 24 мл воды, вносят 3 мл цельной крови. Через 5 мин осаждают белки: по каплям при постоянном взбалтывании приливают 3 мл 25 % раствора ССК, оставляют при комнатной температуре на 10 мин, после чего фильтруют через беззольный фильтр в сухую колбу. Фильтрат делят на 2 части:

а) определение восстановленного глутатиона: 10 мл фильтрата переносят в сухую колбу (колба 1);

б) определение общего глутатиона: в оставшийся фильтрат вносят небольшое количество цинковой пыли и оставляют на 30 мин, взбалтывая время от времени. Затем жидкость фильтруют через беззольный фильтр и 10 мл фильтрата переносят в сухую колбу (колба 2).

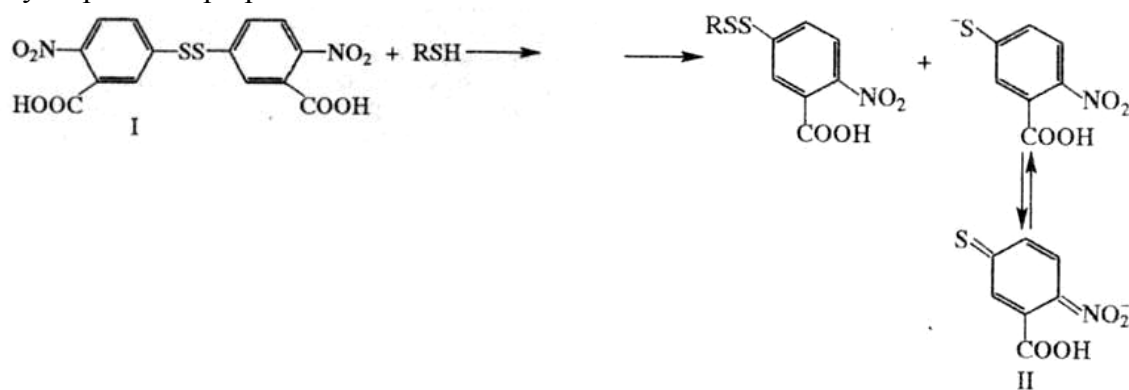
В обе колбы приливают по 2,5 мл 4 % раствора ССК, по 2,5 мл 5 % раствора йодистого калия, по 2–3 капли 1 % раствора крахмала и титруют 0,001 N раствором йодноватистого калия до появления слабо-голубого окрашивания.

Концентрацию глутатиона (С) в колбах 1 и 2 определяют по формуле:

$$C = I \times 100 / 3,26 \text{ мг \%},$$

где I — количество 0,001N раствора йодноватистого калия (мл), израсходованного на титрование пробы; 3,26 — число, соответствующее объему йодноватистого калия (мл), идущего на титрование 1 мг глутатиона; 100 — коэффициент пересчета на 100 мл крови. Окисленный глутатион определяют по разнице между общим и восстановленным.

Определение концентрации восстановленного глутатиона при помощи ЭЛЛИМАНА РЕАКТИВА (ЭР) [5,5'-дитио-бис-(2-нитробензойная к-та), 3,3'-дикарбокси-4,4'-динитродифенилдисульфид; ф-ла I], ЭР — аналитический реагент для определения свободных групп SH, в т. ч. в белках и пептидах (R→SH). Метод основан на взаимодействии ЭР с субстратами при pH 8 по схеме:



Хиноидную форму (II) [2-нитро-5-меркаптобензойной кислоты] с молярным коэффициентом экстинкции ($\epsilon_{\lambda=412} = 1,3 \cdot 10^4$ л/Ммм), определяют спектрофотометрически на $\lambda = 412$ нм.

В контрольную пробу объемом 3 мл с исследуемым веществом (глутатионом) добавляют 0,5 мл раствора NaBH₄ концентрации в 10–100 раз большей, чем концентрация вещества в исследуемой пробе. Пробирку встряхивают, инкубируют 10 мин затем проводят гельфильтрацию на сефадексе G-25. При взаимодействии с NaBH₄ происходит восстановление -S-S- связей до -SH групп. Исследуемое вещество после гельфильтрации в колонке с сефадексом G-25 собирали в пробирки по 3,5 мл. Затем в эти пробирки добавляют по 0,5 мл раствора ЭР концентрации в 10–40 раз большей, чем концентрация вещества в исследуемой пробе. При добавлении реактива ЭР pH раствора должно быть 8–8,4. На спектрофотометре при $\lambda = 412$ нм определяют оптическую плотность D_B — восстановленных -SH групп. Концентрацию (С)-SH групп определяют по формуле: $C = D_B / \epsilon_{\lambda=412}$. Эта концентрация определяет общее количество -SH групп. При использовании гельфильтрации количество исходной концентрации вещества определяют из соотношения:

$$C_{исх} V_{исх} = \sum_{I=1}^N C_I V_I$$

где $C_{исх}$ — исходная концентрация -SH групп, $V_{исх}$ — исходный объем, I — номер пробирки в которую элюировалась проба при гельфильтрации, N — количество пробирок содержащих элюат с исследуемым веществом; C_I — концентрация -SH групп в пробирке и V_I — объем пробирки.

Из исследуемых растворов, которые подверглись действию свободных радикалов, берут 2 одинаковых объемом по 3 мл и помещают в две пробирки (1 и 2). С пробиркой 1 проводят все действия как и с контрольной пробой. Полученная концентрация определяет количество оставшихся -SH групп. С пробиркой 2 проводят все действия как и с контрольной пробой, кроме внесения NaBH_4 . Вместо NaBH_4 вносят 0,5 мл буфера. Полученная концентрация определяет количество образовавшихся -SH групп под действие свободных радикалов. Окисленный глутатион определяют по разнице между общим и восстановленным.

ЛИТЕРАТУРА

1. Состояние перекисного окисления липидов, антиоксидантной защиты крови у больных инфарктом миокарда, отягощенным недостаточностью кровообращения / Н. И. Тарасов [и др.] // Тер. архив. — 2002. — № 12. — С. 12–15.
2. *Курашвили, Л. В.* Современное представление о перекисном окислении липидов и антиоксидантной системе при патологических состояниях: метод. пособие / Л. В. Курашвили, Г. А. Косой, И. Р. Захарова. — Пенза: Инс-т усоверш. врачей МЗ РФ, 2003. — 32 с.
3. *Стальная, И. Д.* Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И. Д. Стальная, Т. Д. Горшвили. // Современные методы в биохимии. — М.: Медицина, 1977. — С. 66–68.
4. *Тюкавкина, Н. А.* Биоорганическая химия / Н. А. Тюкавкина, Ю. И. Бауков. — М.: Дрофа, 2005. — С. 444–469.
5. *Рогожин, В. В.* Повышение чувствительности метода определения концентрации малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / В. В. Рогожин, Т. Т. Курилюк // Аналитика Сибири и Дальнего Востока: тез. VII конф. — Новосибирск, 2004. — С. 90.
6. Методы изучения стрессовых и адаптационных реакций организма по показателям системы крови / А. В. Дерюгина [и др.] — Н.-Новгород: Нижегородский государственный университет, 2010. — 25 с.

УДК 613.2-052.63

ЭНЕРГЕТИЧЕСКАЯ АДЕКВАТНОСТЬ ФАКТИЧЕСКОГО ПИТАНИЯ СТУДЕНТОВ-МЕДИКОВ

Исютина-Федоткова Т. С.

Учреждение образования

«Белорусский государственный медицинский университет»

г. Минск, Республика Беларусь

Введение

Одним из главных условий, определяющих состояние здоровья, устойчивость организма к воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды, работоспособность, является адекватное и сбалансированное питание, соответствующее физиологическим потребностям организма [1]. Особое значение питание имеет при формировании, сохранении и укреплении здоровья в молодом возрасте. В соответствии с Санитарными нормами, правилами и гигиеническим нормативам «Требования к потреблению пищевых веществ и энергии для различных групп населения Республики Беларусь» (далее – Санитарные нормы), по энергетическим затратам студенты относятся к первой группе интенсивности труда с коэффициентом физической активности 1,4 [3].

Однако следует учитывать такие особенности в обучении студентов-медиков как интенсификация учебного процесса и разобщенность учебно-клинических баз. Последнее предполагает значительные временные затраты на переезд, что приводит к увеличению продолжительности учебного дня. В таблице 1 представлены литературные данные о результатах изучения энергетических затрат студентов медицинских вузов.

Необходимость дальнейшего определения энергетических затрат студентов медицинских вузов определяется следующими изменениями, произошедшими в характере деятельности студентов: развитием научно-технического прогресса, интенсивным внедрением в учебный процесс компьютерной техники, ухудшением экологической обстановки, снижением уровня физического труда студентов и т. д.

Цель — установить величину энергетических затрат студентов-медиков и определить энергетическую адекватность их фактического питания.