

В.К.ПОЗДЕЕВ, Н.В.ПОЗДЕЕВ

**МЕТОДЫ
НЕЙРОХИМИЧЕСКИХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
В КЛИНИКЕ**

УДК 543.544+577.112.3+616.853+616.832.9+616.15+616.36-002.14 П47

Поздеев, В. К.

П47 Методы нейрохимических исследований в клинике / В. К. Поздеев, Н. В. Поздеев. — СПб. : Реноме, 2013. — 312 с.: ил.

ISBN 978-5-91918-320-4

В книге описаны модифицированные авторами методы: ВЭЖХ-определение аминотиолов (глутатиона, гомоцистеина, цистеина), нейроактивных аминокислот (глутамата, аспартата, ГАМК, таурина); нингидриновый метод определения глутаматдекарбоксилазы и свободных аминокислот в цереброспинальной жидкости и ткани мозга на сульфокатионитах; определение общих количеств глобулинов, альбуминов, пептидов, аминокислот на Сефадекс; триоксииндоловый метод определения катехоламинов; флуориметрический способ детекции гистамина, серотонина, 5-оксииндолилуксусной кислоты, гомованилиновой кислоты; кинураминовый метод определения моноамин-оксидазы; а также методология клинико-биохимических исследований.

Для нейрохимиков, биохимиков, неврологов, для специалистов, работающих в смежных областях. 29 рис., 41 табл., 413 библиогр.

УДК 543.544+577.112.3+616.853+616.832.9+616.15+616.36-002.14

ISBN 978-5-91918-320-4

© Поздеев В. К., 2013

© Поздеев Н. В., 2013

© Оформление. ООО «Реноме», 2013

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие.....	13
Preface.....	16
Принятые сокращения.....	19
Глава I	
Методология изучения кругооборота медиаторов.....	23
Глава II	
ВЭЖХ-определение в плазме крови аминокислот (глутамата, аспартата, таурина, ГАМК) и	
аминотиолов (глутатиона, гомоцистеина, цистеина)— способ интегральной диагностики	
метаболических нарушений.....	46
Резюме.....	46
Abstract.....	47
Введение.....	48
Методы исследования.....	50
Обсуждение методов исследования.....	53
Результаты исследования и их обсуждение.....	63
Глутатион.....	68
Гомоцистеин.....	69
Цистеин.....	71
Таурин.....	72
Глутамат.....	73
Печеночная энцефалопатия.....	79
Метаболическая терапия гипергомоцистеинемии.....	79
Заключение.....	80
Глава III	
Определение свободных аминокислот в цереброспинальной жидкости	
и ткани головного мозга.....	82
Введение.....	82
Реактивы.....	86
Метод.....	87
Подготовка ионообменников.....	87
Подготовка цереброспинальной жидкости.....	87
Подготовка ткани мозга.....	89
Хроматография аминокислот.....	90
Хроматография сложного пика.....	92
Нингидриновая реакция.....	93
Обсуждение метода.....	93
Результаты исследований и их обсуждение.....	94
Исследование ЦСЖ.....	98
Глутаматная эксайтотоксичность.....	103
Компенсаторные механизмы, ограничивающие эпилептогенез.....	105
ГАМК-ергическая компенсация.....	105
Глицин.....	106
Таурин.....	107
Метаболическая терапия — способ коррекции функционирования	
медиаторных систем.....	107
Антиоксидантная терапия.....	108
Экспериментальные модели эпилепсии.....	109
Электрическая киндлинг-модель эпилепсии.....	109
Дифенилгидантоиновая модель эпилепсии.....	112
<i>Резюме.....</i>	<i>112</i>
<i>Abstract.....</i>	<i>113</i>

<i>Введение</i>	113
<i>Материал и методы исследования</i>	114
<i>Поведенческие эффекты ДФГ</i>	115
<i>Биохимические эффекты ДФГ</i>	116
Обсуждение ДФГ-модели эпилепсии.....	121
Глава IV	
Определение активности L-глутаматдекарбоксилазы	127
Обзор литературы.....	127
Сущность усовершенствования метода.....	132
Реактивы.....	134
Метод.....	135
Обсуждение метода.....	137
Результаты исследований активности ГДК и ГАМК-Т.....	142
Глава V	
Флуориметрический метод определения активности моноаминоксидазы	147
Введение.....	147
Реактивы и описание метода.....	149
Обсуждение метода.....	151
Результаты исследований и их обсуждение.....	152
Глава VI	
Способы выделения и концентрации биогенных моноаминов и получения их флуорофоров	155
Введение.....	155
Выделение и концентрация катехоламинов на окиси алюминия.....	156
Жидкостная экстракция катехоламинов.....	157
Способы получения флуорофоров катехоламинов.....	163
Глава VII	
Флуориметрический триоксииндоловый метод определения катехоламинов и 3,4-диоксифенилаланина в моче и тканях	168
Введение.....	168
Реактивы и описание метода.....	169
Подготовка ткани.....	170
Подготовка мочи.....	171
Адсорбция катехоламинов ткани на окиси алюминия.....	171
Адсорбция катехоламинов мочи на окиси алюминия.....	172
Элюция катехоламинов.....	172
Образование лютинов и измерение их флуоресценции.....	172
Калибрование.....	173
Обсуждение метода.....	177
Результаты исследования и их обсуждение.....	180
Суточная экскреция КА, ДОФА и 5-ОИУК.....	180
Содержания НА, ДА и ГВК в головном мозге крыс.....	182
Глава VIII	
Определение гомованилиновой кислоты в ткани головного мозга и ЦСЖ	185
Введение.....	185
Реактивы и описание метода.....	185
Подготовка Sephadex G-10, адсорбция и элюция ГВК.....	186
Получение флуорофора ГВК.....	187
Обсуждение метода.....	187
Глава IX	
Флуориметрический метод определения серотонина, гистамина и 5-ОИУК	

в ткани головного мозга и ЦСЖ.....	189
Введение.....	189
Реактивы и описание метода.....	190
Приготовление Amberlite CG-50.....	191
Чтение флуоресценции серотонина.....	192
Чтение флуоресценции гистамина.....	192
Подготовка Dowex 50Wx4.....	193
Обсуждение метода.....	194
Содержание серотонина и 5-ОИУК в головном мозге крыс.....	196
Содержание 5-ОИУК в ЦСЖ больных эпилепсией.....	197
Соотношение уровней моноаминов в ЦСЖ с уровнями их экскреции с мочой.....	200
Глава X	
Определение глобулинов, альбуминов, пептидов и аминокислот	
в ЦСЖ с помощью Sephadex G-100.....	204
Обзор литературы.....	204
Реактивы и описание метода.....	211
Реактивы.....	213
Подготовка Sephadex, ЦСЖ, сыворотки крови, техника работы на колонках.....	214
Колориметрия.....	216
Выбор элюирующего буферного раствора и размера колонки.....	217
Расчет общих количеств глобулинов, альбуминов, пептидов и аминокислот.....	220
Обсуждение метода и результатов исследования.....	227
Приложение	
Общие сведения о реактивах и способах их очистки.....	235
Вода.....	235
Иод.....	237
Калий йодистый.....	238
Натрий йодистый.....	238
Калий двуххромовокислый.....	239
Калий железосинеродистый.....	239
Калий углекислый.....	240
Калий фосфорнокислый однозамещенный.....	240
Калий фосфорнокислый двузамещенный.....	240
Калий хлористый.....	241
Кальций хлористый.....	241
Натрий азотистокислый.....	242
Натрий сернистокислый.....	242
Натрий углекислый.....	243
Натрий уксуснокислый.....	243
Натрий фосфорнокислый однозамещенный.....	244
Натрий фосфорнокислый двузамещенный.....	244
Натрий хлористый.....	245
Олово хлористое.....	245
ЭДТА.....	246
Окись алюминия.....	246
Очистка растворителей.....	247
Бензол.....	248
Хлороформ.....	248
Четыреххлористый углерод.....	248
Диэтиловый эфир.....	249

N,N-диметилформаид.....	249
Метиловый спирт.....	249
Этиловый спирт.....	249
«-Пропиловый спирт.....	250
Изопропиловый спирт.....	250
Бутиловые спирты.....	251
Высшие алифатические спирты.....	251
Гликоли.....	252
Бензиловый спирт.....	252
Пиридин.....	252
Кислоты.....	253
Серная кислота.....	253
Азотная кислота.....	254
Соляная (хлористоводородная) кислота.....	254
Фосфорная кислота.....	255
Метафосфорная кислота.....	255
Пирофосфорная кислота.....	255
Трифторуксусная кислота.....	256
Хлорная кислота.....	256
Растворы щелочей и аммиака.....	257
Едкий натр.....	258
Едкое кали.....	258
Гидроокись кальция.....	259
Кальция окись.....	259
Аммиак водный.....	260
Натронная известь.....	260
Плотность водных растворов этанола, щелочей и кислот.....	261
Этанол.....	261
Едкий натр.....	262
Едкое кали.....	263
Аммиак водный.....	264
Серная кислота.....	264
Соляная кислота.....	266
Азотная кислота.....	267
Фосфорная кислота.....	268
Хлорная кислота.....	269
Уксусная кислота.....	271
Основные единицы СИ и их соотношение с единицами других систем.....	272
Основные единицы СИ и рекомендуемые их производные.....	273
Производные единиц СИ.....	273
Единицы концентрации в СИ.....	274
Соотношение с единицами длины.....	274
Соотношение с единицами массы.....	274
Соотношение с единицами времени.....	274
Соотношение с единицами энергии, работы и теплоты.....	275
Соотношение с единицами давления.....	275
Соотношение с единицами объема.....	276
Соотношение с единицами температуры.....	276
Различные способы выражения концентраций.....	277
Атомные веса элементов.....	278
Определение величины относительной центробежной силы.....	279

Номограмма для перевода числа оборотов ротора центрифуги в величину относительной центробежной силы.....	279
Номограмма для расчета величины g по радиусу и скорости (об/мин) вращения ротора.....	281
Единицы ферментативной активности.....	282
Список литературы.....	283
Contents.....	308
Об авторах.....	310
Information about the Authors.....	311

Посвящается молодым исследователям,
способным творчески войти в достижения современной науки

ПРЕДИСЛОВИЕ

Аналитические возможности современной биомедицинской химии феноменальны. Клинико-диагностические лаборатории оснащены проточными цитофлуориметрами, автоматическими иммунохимическими, гематологическими, биохимическими анализаторами и готовыми тест-наборами реактивов с жестко привязанной к этой технике адаптацией. Совершенствование уже известных и предложение новых методов процесс постоянный и бесконечный. Детально описать, опробовать, оценить достоинство и недостатки всех существующих (на данный период развития науки) нейрохимических методов трудно преодоливая задача даже для больших коллективов профессионалов. В то же время, подготовка биологических объектов для исследования в значительной степени универсальна, лежит в основе самых совершенных способов детекции, определяет успех решения научно-практических проблем, осваивается исследователем благодаря, не лишенному ошибок, личному опыту и опыту коллег в этой области. В настоящей работе мы поставили перед собой задачу поделиться многолетним опытом нейрохимических исследований, познакомить читателя с модификациями ряда методов, щадящими способами подготовки биологических объектов, поразмышлять над методологией этих исследований, также крайне необходимой для успешных решений.

Некоторые научно-исследовательские и клинико-диагностические лаборатории имеют системы высокоэффективной жидкостной хроматографии с хорошим набором детекторов (даже масс-спектрометры). Это ускоряет, унифицирует, обеспечивает максимальную чувствительность и воспроизводимость результатов исследований, предопределяет работу по известным технологиям, предельно упрощает деятельность сотрудника, стоящего у клавиатуры автомата.

Все вышеперечисленные достоинства имеют обратную сторону — нужда в творческой самостоятельности сотрудников утрачивает свою актуальность. Методический и методологический поиск решений подвергается унификации, утрачивается необходимость изготавливать реактивы, совершенствовать и интересоваться физико-химическим смыслом методики, выполняемой автоматом. Однако в случае оригинальных исследований, поиска новых решений эти качества научных сотрудников становятся востребованными. —

Кроме того, даже при самых совершенных способах детекции и хроматографии сложных смесей биологических субстратов, сохранение их нативности — первостепенная и сложнейшая задача. Так , тандемы ВЭЖХ-МС, МС-МС, газовая хроматография - М С идеально разделяют сложные

смеси субстратов, но в отношении легко окисляемых субстратов — разрушительны. Мягкие условия высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрической и спектрофотометрической детекцией позволяют определять содержание, например, легко окисляемых тиолов (глутатиона, гомоцистеина, цистеина) в биологических средах, но при использовании электрохимической детекции нативность этих метаболитов утрачивается.

В настоящем издании авторы предлагают ряд методических и методологических решений, описывают щадящие манипуляции с биологическим материалом исследований, в приложении приводят физикохимические характеристики наиболее употребляемых реагентов.

Современная биохимия располагает большим объемом данных о механизмах патогенеза многих заболеваний, что делает актуальной (и реальной) постановку наряду с клиническим — биохимического диагноза. На основе биохимического (в отношении заболеваний нервной системы — нейрохимического) диагноза становится состоятельной патогенетически обоснованная медикаментозная терапия. В отношении тех заболеваний, патохимия которых гетерогенна, постановка нейрохимического диагноза дает возможность осуществлять индивидуализированную медикаментозную терапию.

Большая часть представленных в настоящей работе результатов исследований касается изучения патогенеза пароксизмальных (эпи-лептиформных) состояний. Пароксизмальность позволяет, с одной стороны, наблюдать динамику функционирования медиаторных систем головного мозга, выявлять патогенные и компенсаторные механизмы; с другой стороны, выявляет универсальность клинических проявлений по отношению к метаболическим нарушениям (метаболические нарушения многообразны, но ответная реакция мозга, как правило — генерализованная судорожная активность). Эти клинко-био-химические исследования позволили нам сформулировать концепцию гетерогенности патохимии эпилепсии в 1980-е годы и необходимость постановки нейрохимического диагноза (исключающего метод проб и ошибок при подборе противосудорожных препаратов).

Постановка биохимического диагноза может состояться лишь при выполнении широкого спектра биохимических исследований. При заболеваниях центральной нервной системы (ЦНС) наиболее информативным является прижизненное изучение состава цереброспинальной жидкости (ЦСЖ), так как биологически активные вещества (медиаторы, модуляторы), высвободившиеся из нейронов, в той или иной мере, поступают в ЦСЖ. Предшественники и продукты инактивации биологически активных веществ также присутствуют в ЦСЖ, что позволяет сделать определенные выводы о их кругообороте.

В настоящей работе представлены модифицированные авторами методы определения активности глутаматдекарбоксилазы и моно-аминоксидазы, жидкостной хроматографии аминотолов, моноаминов, аминокислот в ЦСЖ, крови, моче, ткани головного мозга; описаны способы подготовки реагентов и сред организма. Консервация, концентрация, предварительная очистка и выделение белков, пептидов, моноаминов, аминокислот из биологических сред не утратит актуальность и при самых совершенных способах хроматографии и детекции, так как обеспечивает воспроизводимость, достоверность результатов исследований.

Для удобства работы с методами в приложении приведены общие сведения о реактивах и способах их очистки, таблицы плотностей водных растворов оснований и кислот, основные единицы СИ и их соотношение с единицами других систем, различные способы выражения концентраций, атомные веса элементов.

В отношении белков, аминотиолов, моноаминов, аминокислот, олигопептидов внедряются новые

и новые физико-химические методы исследования, позволяющие получать информацию по широкому спектру метаболитов одновременно. Создание высокоэффективных систем жидкостной и газовой хроматографии, тандемов ВЭЖХ-МС, ГХ-МС, их автоматизация принципиально ускоряет эффективность биохимических исследований. Несомненно, в недалеком будущем клинические биохимические лаборатории будут оснащены такими системами, при этом сохранение нативности определяемых метаболитов (максимально приближающей к реальным событиям на уровне организма) всегда будет актуальной.

В. К. Поздеев

Об авторах

Поздеев Владимир Константинович (р. 1938) , к. м.н. по специальности «нервные болезни», д. м. н., профессор по специальности «биохимия». Закончил Иркутский медицинский институт, затем ординатуру и аспирантуру на кафедре нервных болезней этого института. С 1969 по 1986 г. возглавлял биохимическое подразделение Отдела нейрофизиологии НИИЭМ АМН СССР Санкт-Петербурга. С 2000 г. по настоящее время является ведущим научным сотрудником Отделения экспериментально-клинических исследований, заведующим Клинико-диагностической лаборатории НИИ гриппа Санкт-Петербурга. Основное направление научных исследований: клиничко-биохимический способ изучения патогенеза заболеваний ЦНС, в последние годы — гепатита С; и на этой основе индивидуализация метаболической терапии. В частности, сформулировал и обосновал концепцию биохимической гетерогенности эпилепсии, выявил патогенный и компенсаторный механизмы пароксизмальных состояний.

Для контактов: ФГБУ НИИ гриппа Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. проф. Попова, 15/17, Санкт-Петербург, 197376, Россия;

Тел.: +7 (812) 499-15-52, +7 (911) 984-17-52, факс: +7 (812) 499-15-38.

E-mail: vkpozdeev@mail.ru

Поздеев Никита Владимирович (р. 1974), врач, к.б. н. по специальности «биохимия». Закончил Санкт-Петербургский медицинский университет им. академика И. П. Павлова в 1996 г., работал в лаборатории молекулярных основ сенсорной рецепции Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН в Санкт-Петербурге, проводил исследования в Университете Эмори в Атланте, США , закончил резидентуру по специальности внутренние болезни в Харбор Хоспитал в Балтиморе, США. В настоящее время работает в отделе эндокринологии, метаболизма и диабета Университета штата Колорадо в Денвере, США. Клинические и научные интересы лежат в области лечения заболеваний щитовидной железы и биологии циркадианных ритмов, ВЭЖХ-МС хроматографии.

Для контактов e-mail: nikitapozdeyev@gmail.com

Научное издание

**Владимир Константинович Поздеев,
Никита Владимирович Поздеев**

**МЕТОДЫ
НЕЙРОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ В КЛИНИКЕ**

Технический редактор *А. Б. Левкина*
Дизайн обложки *А. В. Самойлова*
Оригинал-макет *Л. А. Харитонов*

Подписано в печать 15.07.2013. Формат 60x88 1/16
Уел. печ. л. 19,07. Тираж 300 экз. Печать офсетная. Заказ № 121 Р.

Отпечатано в типографии издательско-полиграфической фирмы «Реноме»,
192007, Санкт-Петербург, наб. Обводного канала, д. 40.
Тел./факс (812) 766-05-66. E-mail: renome@cornlink.spb.ru
www.renomespb.ru