



МИНИСТЕРСТВО РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО ДЕЛАМ
ГРАЖДАНСКОЙ ОБОРОНЫ, ЧРЕЗВЫЧАЙНЫМ СИТУАЦИЯМ
И ЛИКВИДАЦИИ ПОСЛЕДСТВИЙ СТИХИЙНЫХ БЕДСТВИЙ



Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины
имени А.М. Никифорова»

ФОРМИРОВАНИЕ СТАНДАРТА ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА ПРИ ОБСЛЕДОВАНИИ СОТРУДНИКОВ ГПС МЧС РОССИИ



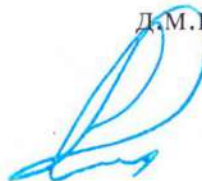
МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Санкт-Петербург
2019

МИНИСТЕРСТВО РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО ДЕЛАМ
ГРАЖДАНСКОЙ ОБОРОНЫ, ЧРЕЗВЫЧАЙНЫМ СИТУАЦИЯМ
И ЛИКВИДАЦИИ ПОСЛЕДСТВИЙ СТИХИЙНЫХ БЕДСТВИЙ

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины
имени А.М. Никифорова»

УТВЕРЖДАЮ
Главный врач МЧС России
Заслуженный врач РФ
д.м.н. профессор



С.С. Алексанин

**ФОРМИРОВАНИЕ СТАНДАРТА ЛАБОРАТОРНОЙ
ДИАГНОСТИКИ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА
ПРИ ОБСЛЕДОВАНИИ СОТРУДНИКОВ
ГПС МЧС РОССИИ**

Методические рекомендации

Санкт-Петербург
2019

Формирование стандарта диагностики оксидативного стресса при обследовании сотрудников ГПС МЧС России /под ред. профессора С.С. Алексанина – СПб.: ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС России, 2019. – 40 с.

Авторы: д.м.н. проф. И.И. Шантырь, д.м.н. Г.Г. Родионов, к.м.н. М.В. Санников, к.б.н. Е.Г. Неронова, к.б.н. М.В. Яковлева, к.б.н. И.Э. Ушал, к.х.н. Е.А. Колобова, к.б.н. М.А. Власенко, Е.В. Светкина.

Настоящие методические рекомендации подготовлены в рамках НИР «Оценка значимости биоэлементов, полиненасыщенных жирных кислот и микробиоты кишечника в развитии оксидативного стресса у сотрудников ГПС МЧС России» (п. 64 раздела III Плана научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ МЧС России на 2018 год, утвержденного приказом МЧС России от 17.01.2018 № 15).

В рекомендациях представлены разработанные валидированные хромато-масс-спектрометрические методы оценки следующих показателей оксидативного стресса: малонового диальдегида (МДА), жирорастворимых витаминов А и Е, полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), микробных маркеров, биоэлементов, а так же проведена оценка нестабильных хромосомных aberrаций, отражающих мутагенные воздействия на организм сотрудников ГПС. Комплексное применение разработанных методик анализа показателей оксидативного стресса в совокупности с традиционными биохимическими методами позволяет своевременно выявить нарушения в антиоксидантной защите организма, а так же провести целенаправленную коррекцию и оценить ее эффективность.

Методические рекомендации предназначены для медицинских учреждений и врачей-специалистов МЧС России, проводящих диспансеризацию и оказывающих специализированную помощь спасателям и сотрудникам ФПС ГПС МЧС России.

Они также могут быть использованы в образовательном процессе при реализации образовательных программ высшего (аспирантура, ординатура) и дополнительного профессионального образования для повышения квалификации врачей - клинической лабораторной диагностики, терапевтов, кардиологов.

Рецензенты:

Зыбина Н.Н. – заведующий отделом лабораторной диагностики главный научный сотрудник ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС России, д.б.н., профессор.

Эммануэль В.Л. - заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины, директор Научно-образовательного Центра «Институт лабораторной медицины» СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова, Вице-президент Российской Ассоциации медицинской лабораторной диагностики, Главный специалист-эксперт по клинической лабораторной диагностике Росздравнадзора по Северо-Западному Федеральному округу, академик Метрологической академии, д.м.н., профессор.

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
ВВЕДЕНИЕ	5
1 Понятие метода масс-спектрометрии и его применение в лабораторной диагностике	7
2 Хроматографические и масс-спектрометрические методы оценки показателей оксидативного стресса	10
2.1. Определение малонового диальдегида в плазме крови человека для оценки оксидативного стресса	10
2.2. Определение микробных маркеров в плазме крови человека для оценки оксидативного стресса	16
2.3. Определение полиненасыщенных жирных кислот в плазме крови человека для оценки оксидативного стресса	22
2.4. Определение жирорастворимых витаминов А и Е в плазме крови человека для оценки оксидативного стресса	25
2.5. Определения концентрации химических элементов методом масс-спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-МС) в пробах волос	29
2.6. Требования безопасности при выполнении измерений	32
3 Методика обследования с целью выявления хромосомных aberrаций, индуцированных мутагенными воздействиями на организм человека	32
3.1. Культивирование лимфоцитов периферической крови	33
3.2. Приготовление препаратов метафазных хромосом лимфоцитов периферической крови	33
3.3. Микроскопирование	34
3.4. Метод СХО	34
ВЫВОДЫ	38
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	38

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БДУ	5-бромдезоксисуридин
ВЭЖХ-МС/МС	Высокоэффективная жидкостная хроматография с tandemным масс-спектрометрическим детектированием
ГПС	Государственная пожарная служба
ИСП-МС	Масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой
ГХ-МС	Газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием
МДА	Малоновый диальдегид
ПНЖК	Полиненасыщенные жирные кислоты
СХО	Сестринские хроматидные обмены
ФГА	Фитогемагглютинин

ХИМИЧЕСКИЕ ЭЛЕМЕНТЫ И ИХ СИМВОЛЫ

Символ	Элемент	Символ	Элемент	Символ	Элемент
Ag	серебро	Ga	галлий	Rb	рубидий
Al	алюминий	Gd	гадолиний	Sb	сурьма
As	мышьяк	Hg	ртуть	Sc	скандий
B	бор	Ho	гольмий	Se	селен
Ba	барий	I	йод	Si	кремний
Be	бериллий	In	индий	Sm	самарий
Bi	висмут	K	калий	Sn	олово
Ca	кальций	La	лантан	Sr	стронций
Cd	кадмий	Li	литий	Tb	тербий
Ce	церий	Lu	лютеций	Th	торий
Co	кобальт	Mg	магний	Ti	титан
Cr	хром	Mn	марганец	Tl	таллий
Cs	цезий	Mo	молибден	Tm	тулий
Cu	медь	Na	натрий	U	уран
Ge	германий	Ni	никель	V	ванадий
Dy	диспрозий	Nd	неодим	Y	иттрий
Er	эрбий	P	фосфор	Yb	иттербий
Eu	европий	Pb	свинец	Zn	цинк
Fe	железо	Pr	празеодим		

ВВЕДЕНИЕ

Ликвидация последствий аварий и тушение пожаров и осуществляются в сложных условиях, представляющих угрозу для жизни и здоровья спасателей и пожарных аврийно-спасательных подразделений МЧС России [3, 4, 14]. Особую опасность для пожарных представляют химические соединения, которые содержатся в продуктах горения, которые обладают мембраноповреждающим эффектом, в результате которого усиливаются процессы свободнорадикального окисления белков, жиров и углеводов, что приводит к развитию «оксидативного» стресса [1, 18, 19, 24].

Многочисленные научные публикации подтверждают, что окислительный стресс ведет к развитию таких самых опасных и социально значимых заболеваний, как сердечно-сосудистые, онкологические, сахарный диабет, нарушения мозгового кровообращения, воспалительные, ревматоидные, нейродегенеративные (болезни Паркинсона, Альцгеймера) и некоторых других [5, 10, 11, 16]. Важно диагностировать начало развития окислительного стресса, когда он не привел к серьезным изменениям в организме. Его ранняя диагностика – основа профилактической медицины. Определение маркеров окислительного стресса современными высокотехнологическими методами - высокоэффективной жидкостной хроматографии и индуктивно-связанной плазмой с масс-спектрометрией. Использование в них детекторов высокой чувствительности и селективности помогает определять многие маркеры в сложных матрицах без концентрирования и дериватизации [6, 7, 12, 13, 23, 25, 29].

Нами разработаны валидированные хромато-масс-спектрометрические методы оценки следующих показателей оксидативного стресса: малонового диальдегида (МДА), жирорастворимых витаминов А и Е, полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), микробных маркеров, биоэлементов, а так же проведена оценка нестабильных хромосомных aberrаций, отражающих мутагенные воздействия на организм сотрудников ГПС.

Малоновый диальдегида является конечным продуктом окислительного стресса, его повышение свидетельствуют о наличии дисбаланса между уровнем образования кислородных радикалов и потенциалом антиоксидантной системы организма и может служить объяснением причин развития различных патологических состояний [26].

Жирорастворимые антиоксиданты (альфа-токоферол и каротиноиды) играют главную роль в защите основных структурных компонентов биомембран клеток, таких, как фосфолипиды и погруженные в липидный слой белки. Витамин Е способен гасить активные формы кислорода, взаимодействовать с гидроксильным радикалом и восстанавливать липидные радикалы структуры R• и ROO•. Наиболее активно в липидном бислое α -токоферол восстанавливает пероксильные радикалы. Для успешной работы антиоксидантной системы организма необходимо адекватное обеспечение организма витаминами А и Е [8, 15, 22, 27, 28].

Полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) являются наиболее важными питательными веществами человеческого рациона и имеют особое значение для

структур клеточной оболочки (формируют клеточную мембрану), ее функционирования и для местной «гормональной» передачи сигналов. ПНЖК являются особо важными компонентами оболочек нервных клеток и рецепторов, так как обеспечивают правильную внутриклеточную передачу сигналов в центральной нервной системе. Незаменимые жирные кислоты, полученные только из пищи, преобразуются в местные гормональные медиаторы, которые принимают участие в регуляции работы сердечно-сосудистой системы, процессе свертывания крови, всех стадий воспаления и др [30].

Типичной реакцией организма на различные по своей природе воздействия является стрессовый адаптационный синдром, при котором стереотипно формируются изменения микробиоценоза. Стресс вызывает нарушение трофики различных видов эндогенной микрофлоры. Одновременно нарушаются трофические и регуляторные связи кишечной микрофлоры. В конечном итоге формируются количественные и качественные изменения состава микрофлоры. Учитывая, что стрессовый адаптационный синдром представляет собой универсальную реакцию организма на многие факторы окружающей среды, следует полагать, что изменения нормальной микрофлоры будут являться закономерным следствием стрессового воздействия любого характера. Оксидативный стресс нарушает качественный и количественный состав микробиоценоза кишечника вследствие размножения условно-патогенных бактерий в количестве, превышающем норму, что играет значительную роль в патогенезе неалкогольной жировой болезни печени, гиперхолестеринемии, запоров и наблюдается у пациентов с метаболическим синдромом. Таким образом, нормальная микрофлора является мишенью негативного влияния разных по своей природе факторов [2, 9, 20].

Ряд жизненно необходимых элементов задействован в антиоксидантной системе. Значительную роль играют цинк и селен. Цинк как биоэлемент обладает сильным антиоксидантным действием. Цинк защищает сульфгидрильные группы белков и ферментов от «атак» свободных радикалов и противодействует окислительно-восстановительным реакциям с участием переходных металлов. В активном центре глутатионпероксидазы находится остаток аминокислоты селеноцистеина, т.о. антиоксидантные защитные системы самой глутатионпероксидазы сильно зависят от наличия селена [15, 17].

В свою очередь, накопление токсичных микроэлементов способствует возникновению оксидативного стресса. Серебро в организме соединяясь с белками может блокировать тиоловые группы ферментов, угнетать тканевое дыхание. Кадмий усиленно накапливается при недостатке цинка и/или селена. Способность этого химического элемента связываться с карбоксильными, аминно- и сульфгидрильными группами белковых молекул, приводя к угнетению активности ферментных систем, обуславливает его токсичность. Свинец усиленно накапливается при недостатке кальция и цинка Токсическое действие свинца во многом обусловлено способностью образовывать связи с большим количеством анион-лигандов. Связывание ангидридов со свинцом приводит к угнетению активности ферментов, таким образом, свинец является ядом политропного действия [21]

Наиболее рациональным является оценка содержания биоэлементов в пробах волос, так как в крови содержание витальных биоэлементов является жесткой константой, а накопление токсичных происходит во внутренних органах при поступлении микродоз, выявить которые в крови можно только в короткий период непосредственно после попадания в организм.

Своевременная направленная коррекция биоэлементного статуса, безусловно, способствует увеличению антиоксидантных возможностей организма.

В основе методов оценки МДА, уровня витаминов А и Е, уровня ПНЖК, содержания биоэлементов и микробных маркеров кишечника лежит масс-спектрометрия в сочетании с газовой и жидкостной хроматографией, а так же масс-спектрометрия с использованием индуктивно связанной плазмы для ионизации химических элементов в биообразцах.

Несомненным достоинством масс-спектрометрических методов является их высокая точность, чувствительность и специфичность. Данные методы анализа являются прямыми, т.е. исключают все неспецифические взаимодействия, мешающие анализу целевого показателя.

Оценка мутагенных воздействий на организм сотрудников ГПС проводилась на основе анализа нестабильных хромосомных aberrаций в соматических клетках, а именно лимфоцитах периферической крови. Комплексное применение разработанных методик анализа показателей оксидативного стресса в совокупности с традиционными биохимическими методами позволяет своевременно выявить нарушения в антиоксидантной защите организма, а так же провести направленную коррекцию и оценить ее эффективность.

1. ПОНЯТИЕ МЕТОДА МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ В ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ

В настоящее время в клинической лабораторной диагностике существует ограниченное количество методов анализа на основе масс-спектрометрии. В то же время за последние годы применение масс-спектрометрии (МС) в клинической лабораторной диагностике значительно расширилось за счет определенных его преимуществ перед рутинными лабораторными методами. Например, сочетание жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ЖХ-МС/МС) по сравнению с иммуноанализом, особенно для анализа стероидов, имеет ряд преимуществ: точность, прецизионность, прямая идентификация аналита и возможность проведения количественного анализа.

Масс-спектрометрия – метод исследования вещества путем определения отношения массы к заряду (m/z) и количества заряженных частиц, образующихся при том или ином процессе воздействия на вещество. Этот аналитический метод позволяет определять молекулярную массу соединения и получать информацию о его структуре.

Масс-спектрометр состоит из трех частей: источника ионов, масс-фильтра и масс-детектора. В источнике ионов частицы образца превращаются в ионы. В массовом фильтре ионы распределяются в зависимости от их отношения m/z . Детектор измеряет количество заряженных частиц (рис. 1).

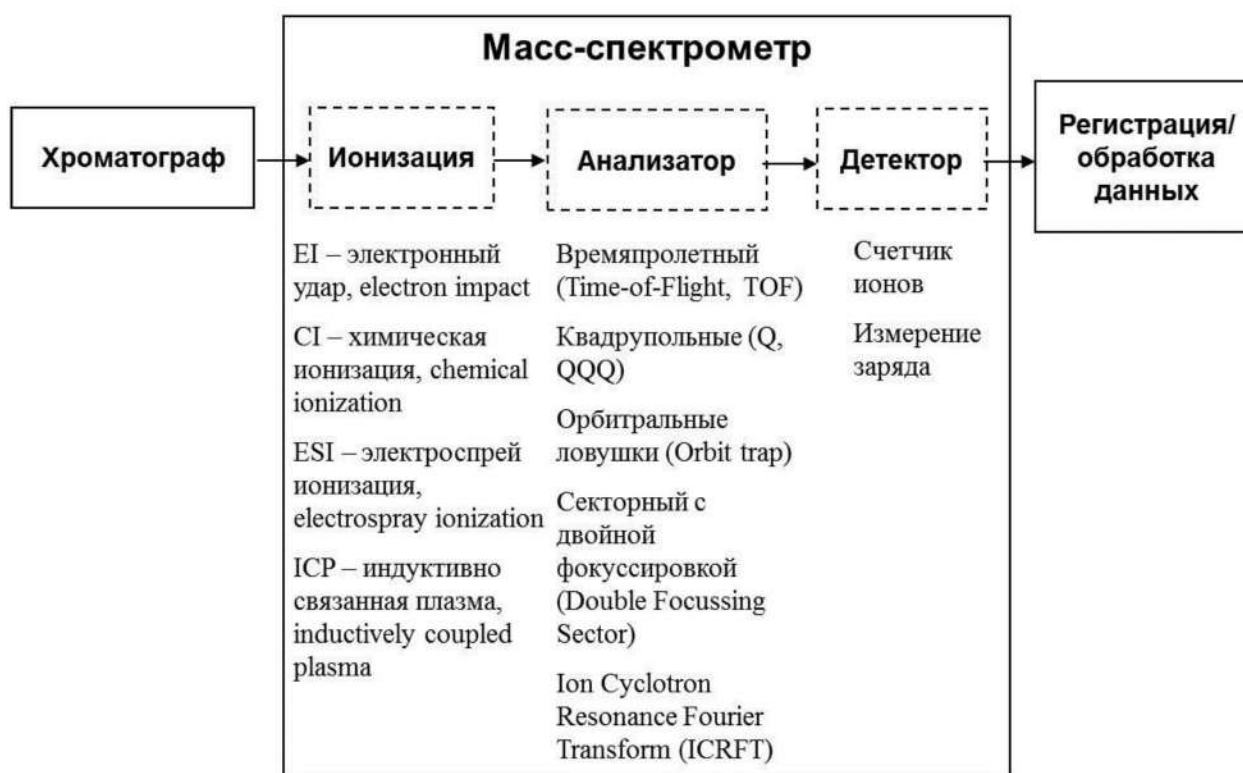


Рис. 1. Блок-схема хромато-масс-спектрометра.

За последние два десятилетия были предложены различные способы ионизации для анализа как летучих, так и нелетучих соединений: ионизация электронным ударом, химическая ионизация, ионизация электрораспылением, матричная лазерная десорбция (MALDI) и химическая ионизация при атмосферном давлении.

Метод тандемной масс-спектрометрии (MS/MS) обеспечивает структурный анализ химических соединений, обнаружение их в низких концентрациях или просто наличие в образце. Такой метод часто используется для количественного определения огромного количества потенциальных биомаркеров в образце.

Различные типы масс-фильтров такие как квадруполь (Q), время пролетные (TOF), ионная ловушка (IT) широко применяют в клинических лабораториях.

Предварительное хроматографическое или электрофоретическое разделение используется для уменьшения подавления ионов и снижения уровня шума, для того чтобы повысить чувствительность при обнаружении целевого компонента образца. Наибольшее распространение получили два метода хроматографического разделения с масс-спектрометрией: газовая хроматография (ГХ) и жидкостная хроматография (ЖХ).

ГХ-МС является подходящим методом для анализа летучих и нелетучих химических соединений после дериватизации. Газообразная подвижная фаза

(например, гелий) перемещает частицы вдоль колонки (обычно это капилляр, внутренняя поверхность которого покрыта неподвижной фазой), где происходит их разделение. Современные капиллярные колонки обеспечивают при анализе многокомпонентных образцов хорошее разрешение и воспроизводимость. Ограничения этого метода - определяемые аналиты должны быть летучи и термически стабильны.

ЖХ-МС стал популярным методом, потому что его можно использовать в широком диапазоне классов аналитов и их метаболитов. Подвижная фаза, состоящая из различных композиций органических/неорганических растворителей, позволяет разделять соединения. ЖХ-МС часто используется в метаболическом профилировании при правильном выборе полярности и состава подвижной фазы.

Капиллярный электрофорез (КЭ) является еще одним методом, который разделяет соединения в зависимости от размера и заряда. Как правило, этот метод применим для анализа высокополярных и ионных метаболитов. Преимущества КЭ в том, что он быстрый, довольно низкий по себестоимости и обладает высокой разрешительной способностью за счет высокой эффективности. Разделение нейтральных веществ может быть достигнуто в режиме мицеллярной электрокинетической хроматографии. В этом случае в состав фонового электролита вводят заряженные поверхностно-активные вещества, такие как додецилсульфат натрия, образующие мицеллы. Аналиты разделяются за счет различного взаимодействия с полостью мицеллы.

В лабораторной практике используются различные методы для подготовки образцов. Выбор процедуры, подходящей для пробоподготовки биообразца, основан на химических свойствах анализируемых веществ. Как правило, для подготовки образца требуется один или более методов, таких как твердофазная экстракция, разбавление, иммуноаффинная очистка, жидкостная экстракция или осаждение белков. Подготовка образца должна быть максимально простой и не вызывать значительную потерю аналита.

Помимо высокой специфичности и чувствительности для МС характерны и другие преимущества:

- не требуются дорогостоящие аналит-специфические реагенты,
- возможность количественно определять несколько аналитов в одной пробе.

К сожалению, как и любого метода, у МС есть и некоторые недостатки:

- не существует полностью автоматизированных масс-спектрометрических приборов;

- является сложной технологией, которая требует больших практических навыков и высококвалифицированных опытных специалистов;

- высокая стоимость оборудования ограничивает его применение в клинической лабораторной диагностике;

- отсутствие стандартизации методик является еще одним ограничением использования масс-спектрометрии в рутинном анализе.

Поэтому большинство методов ЖХ-МС и ГХ-МС используются в клинических лабораториях в основном в научных целях.

В настоящее время основными направлениями применения МС в клинической лабораторной практике являются:

- неонатальный скрининг;
- выявление дефицита витамина Д;
- лекарственный мониторинг;
- диагностика нарушений эндокринной системы;
- метаболомика;
- протеомика;
- микробиология;
- токсикология.

Применение полностью автоматизированных и коммерчески доступных клинических МС анализаторов значительно расширит возможности использования МС в рутинной лабораторной диагностике. Только при этих условиях вклад МС в клиническую лабораторную диагностику будет более значительным.

В то же время необходимо уже сейчас разрабатывать методики лабораторной диагностики на основе хроматографических аналитических комплексов МС для последующего перехода от науки к практике, чему и посвящены материалы данных Методических рекомендаций.

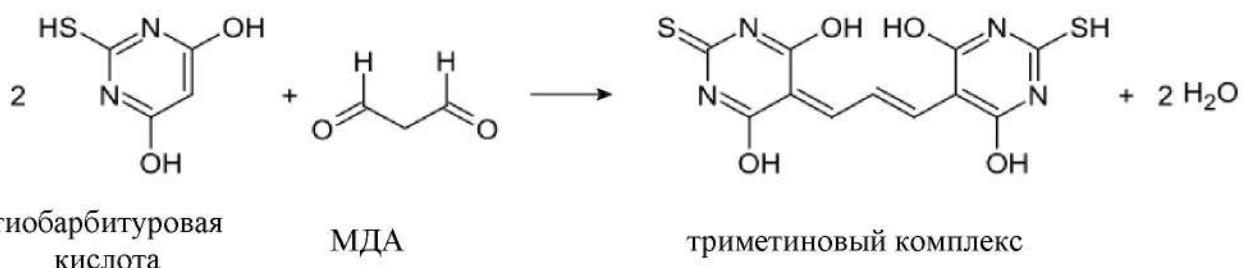
2. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ И МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА

2.1. Определение малонового диальдегида в плазме крови человека для оценки оксидативного стресса

Измерение концентрации МДА в пробах плазмы крови может проводиться методом высокоэффективной жидкостной хроматографии или капиллярного электрофореза в сочетании со спектрофотометрическим детектированием.

Идентификацию аналита осуществляют по времени удерживания и спектру, регистрируемому с помощью диодно-матричного детектора в диапазоне длин волн 400-600 нм.

Для обнаружения аналита проводят дериватизацию с использованием тиобарбитуровой кислоты. В основе лежит следующая реакция:



Продуктом реакции является триметиновый комплекс, имеющий характерную розовую окраску с $\lambda_{\text{макс.}} = 532 \text{ нм}$ (рис. 2).

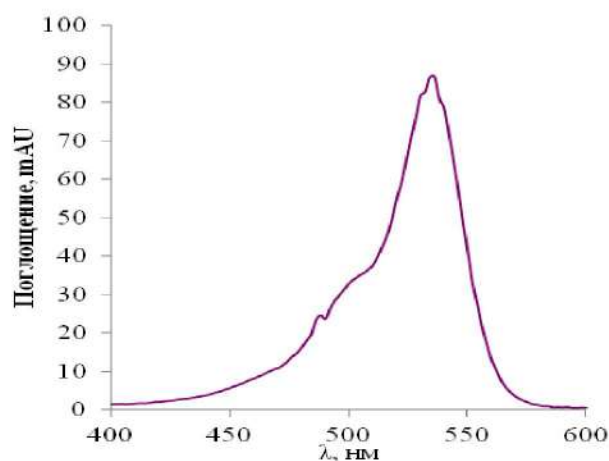


Рис. 2. Спектр триметинового комплекса в видимой области спектра.
Условия съемки: система капиллярного электрофореза «CE - 7100» с диодно-матричным детектором, дейтериевая лампа, диапазон измерения 400-600 нм с шагом 2 нм.

Оборудование

Определение МДА в плазме крови человека проводят с использованием системы капиллярного электрофореза «CE 7100» фирмы «Agilent Technologies» с диодно-матричным детектированием (рис. 3) или жидкостного хроматографа типа «1200 Series» фирмы «Agilent Technologies» с диодной матрицей (рис.4), или аналогичного оборудования.

Весы лабораторные «Sartorius» с измерением массы до 250 г. С точностью 0,0001-0,00001 г. или аналогичные.

Центрифуга Allegra 25R (BECKMAN COULTER, США) или аналогичная.

pH-метр с автоматической термокомпенсацией, SevenEasy pH S20-k⁺ (pH-метр с универсальным комбинированным электродом InLab 413, микроэлектродом InLab 423 с кабелем и раствором для чистки электродов, набором стандарт-титров).



Рис. 3. Система капиллярного электрофореза «CE 7100» (Agilent Technologies, США) с диодно-матричным детектированием.



Рис. 4. Высокоэффективный жидкостный хроматограф «1200» (Agilent Technologies, США) с диодно-матричным детектором.

Реактивы и материалы

1,1,3,3 — тетраметоксипропан, тиобарбитуровая кислота (ТБК), ацетонитрил, муравьиная кислота, метанол, соляная кислота, деионизованная вода, борная кислота, додецилсульфат натрия, гидроксид натрия.

Матрицей для приготовления калибровочных образцов служит альбумин человека (10 %-ный раствор для инфузий).

Приготовление исходного и рабочих растворов МДА

Исходный концентрированный раствор малонового диальдегида (МДА) с концентрацией 1 М готовят следующим образом: навеску 1,1,3,3-тетраметоксипропана (164.2 ± 0.1 г) вносят в мерную колбу вместимостью 1 л и доводят раствор до метки ацетонитрилом.

Рабочие растворы готовят разбавлением исходного раствора в необходимое количество раз ацетонитрилом.

Полученный исходный раствор был аликвотирован и хранился в морозильной камере при -20°C , а рабочие и калибровочные растворы – в холодильнике при $+4-6^{\circ}\text{C}$.

Приготовление раствора тиобарбитуровой кислоты для дериватизации МДА

В мерную колбу вместимостью 50 мл вносят точную навеску тиобарбитуровой кислоты (ТБК) (250.0 ± 0.1 мг), добавляют 40 мл метанола, содержащего 0,5 М соляную кислоту, тщательно перемешивают до полного растворения ТБК и доводят раствор до метки метанолом, содержащим 0,5 М соляную кислоту.

Приготовление калибровочных образцов

Для приготовления калибровочных растворов используют рабочие растворы МДА в диапазоне 2.5-100 мкМ (2.5, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0, 100.0 мкМ).

В качестве матрицы служит 10%-ный раствор для инфузий человеческого альбумина.

К каждой пробе объемом 100 мкл добавляют 10 мкл соответствующего рабочего раствора и для осаждения белков 90 мкл ацетонитрила, перемешивают с помощью устройства типа Vortex в течение 5 мин, после чего центрифугируют 10 мин со скоростью 3000 об/мин. 125 мкл надосадочного слоя переносят в виалы с плотной крышкой и добавляют 125 мкл раствора тиобарбитуровой кислоты для дериватизации, закрывают и помещают в термостат на 30 мин при 80⁰С. Для прекращения реакции пробы охлаждают в морозильной камере при -18⁰С в течение 10 мин. Затем 150 мкл полученного окрашенного в розовый цвет раствора переносят в чистые виалы и анализируют. Градуировочный диапазон составляет 0.25-10 мкМ.

Пробоподготовка образцов плазмы крови

Непосредственно перед анализом пробы размораживают при комнатной температуре. К каждой пробе объемом 100 мкл добавляют 100 мкл ацетонитрила для осаждения белков, перемешивают с помощью устройства типа Vortex в течение 5 мин, после чего центрифугируют 10 мин со скоростью 3000 об/мин. 125 мкл надосадочного слоя переносят в виалы с плотной крышкой и добавляют 125 мкл раствора тиобарбитуровой кислоты для дериватизации, закрывают и помещают в термостат на 30 мин при 80⁰С. Для прекращения реакции пробы охлаждают в морозильной камере при -18⁰С в течение 10 мин. Затем 150 мкл полученного окрашенного в розовый цвет раствора переносят в чистые виалы и анализируют.

Хроматографические условия определения МДА

Подвижная фаза: ацетонитрил-вода, градиентный режим элюирования; диодно-матричный детектор. Колонка «Zorbax SB C18» фирмы «Agilent» (2.1*150 мм, 3.5 мкм) с соответствующей предколонкой. Температура колонки и детектора: 30 °С. $\lambda=532$ нм. Скорость потока – 0.5 мл/мин, ввод пробы – 20 мкл, время анализа – 6 мин. Более подробно градиентный режим разделения представлен в таблице 1.

Таблица 1

Градиент режим элюирования МДА

Время	% В
0	20
1.0	20
1.5	90
2.5	90
3	20

Электрофоретические условия определения МДА

Кварцевый капилляр: 64,5 см*56 см, 50 мкм.

Фоновый электролит: 12,5 мМ боратный буфер (pH = 9.3), содержащий 25 мМ додецилсульфата натрия (ДДСН).

Напряжение: +20 кВ, температура капилляра и детектора: 30 °С. $\lambda=532$

Ввод пробы: гидродинамический 10 с* 50мбар.

Типичные хроматограмма и электрофореграмма образца плазмы крови представлены на рис. 5.

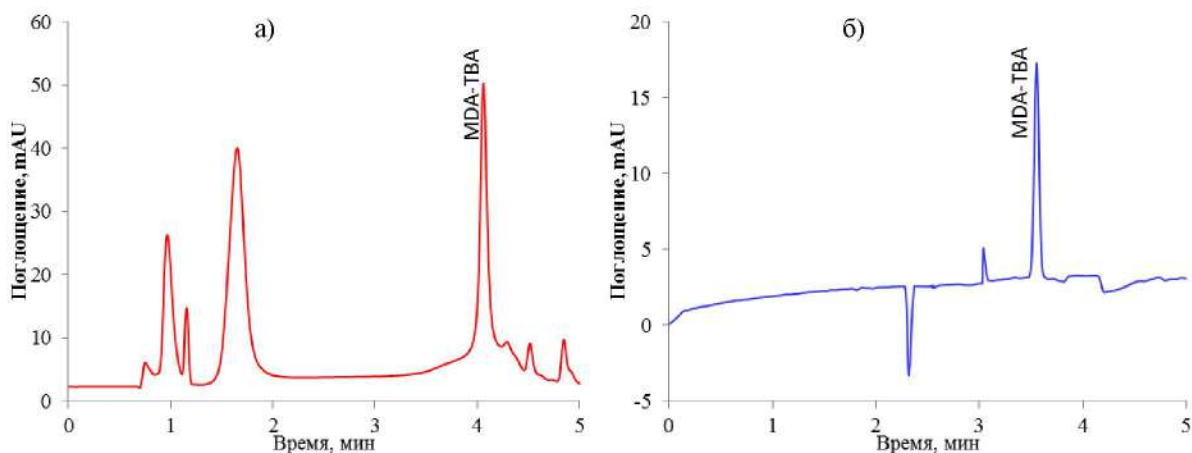


Рис. 5. Типичные хроматограмма (а) и электрофореграмма (б) образца плазмы крови при определении малонового диальдегида. МДА-ТВА – триметиновый комплекс малонового альдегида и тиобарбитуровой кислоты.

Количественный анализ содержания малонового диальдегида можно проводить тремя способами:

- методом абсолютной градуировки;
- методом стандартной добавки;
- методом внутреннего стандарта.

Поскольку в плазме крови содержатся указанные аналиты, метод абсолютной градуировки в классическом варианте не может быть применен для количественной оценки. Поэтому построение калибровочной зависимости требуется проводить на сывороточном альбумине, который максимально близко отражает состав плазмы крови.

В методе абсолютной градуировки (внешнего стандарта) экспериментально определяют зависимость высоты или площади пика от концентрации вещества и строят градуировочный график (рис. 6), который аппроксимируют прямой, описывающейся уравнением:

$$y = bx + a, (1)$$

где y – площадь или высота пика аналита;

x - концентрация аналита в образце;

b – наклон прямой;

a – отсекаемый участок на оси абсцисс.

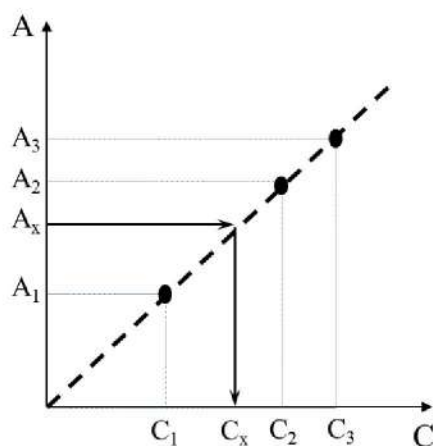


Рис. 6. Пример градуировочного графика.

Далее определяют те же параметры пиков в анализируемой смеси и находят концентрацию анализируемого вещества по формуле:

$$x = (y - a) / b, \quad (2)$$

Этот простой и точный метод является основным способом количественного определения биологически активных соединений. Кроме того, метод не требует разделения всех компонентов смеси, а ограничивается лишь теми, определение которых необходимо в данном конкретном случае.

В методе стандартной добавки сначала измеряют площадь пика A_x аналита в исследуемой пробе с неизвестной концентрацией C_x , а затем измеряют площадь сигнала A_{x+s} аналита в той же пробе с добавкой некоторого известного количества определяемого вещества C_s . Таким образом, во втором растворе концентрация определяемого вещества равна $C_x + C_s$, а сигнал пика складывается из A_x и сигнала добавки. Тогда неизвестную концентрацию C_x находят по формуле:

$$C_x = C_s \cdot \frac{A_x}{A_{x+s} - A_x} \quad (3).$$

Метод добавок можно использовать в графическом варианте (рис. 7) Тогда добавку стандартного раствора анализируемого вещества целесообразно делать два раза, измеряя соответствующие оптические плотности A_{x+s1} и A_{x+s2} .

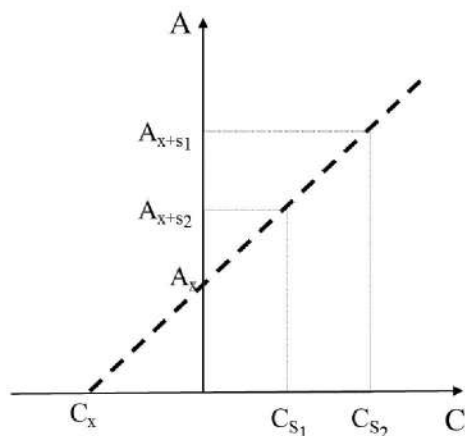


Рис. 7. Определение концентрации аналита методом стандартной добавки.

В этом случае значение A_x , при котором добавка равна 0, откладывают по оси ординат. По оси концентраций откладывают добавленные концентрации стандартного раствора C_{s1} и C_{s2} и находят точки с соответствующими значениями A_{x+s1} и A_{x+s2} . Полученные точки соединяют, прямую продолжают до пересечения с осью абсцисс. Отсекаемый на оси концентраций отрезок и является определяемой концентрацией C_x .

Метод внутреннего стандарта предусматривает введение в анализируемую пробу известного количества эталонного соединения и расчет по формуле:

$$C_x = k \cdot C_{IS} \cdot \frac{A_x}{A_{IS}} \quad (4),$$

где C_{IS} – концентрация внутреннего стандарта, A_{IS} — высота или площадь пика внутреннего стандарта; k - коэффициент пропорциональности, который определяется из хроматографического эксперимента с модельной смесью, содержащей известные концентрации аналита и внутреннего стандарта:

$$k = \frac{C'_x \cdot A'_{IS}}{C'_{IS} \cdot A'_x} \quad (5),$$

где C'_x и C'_{IS} – известные концентрации аналита и внутреннего стандарта в модельной смеси; A'_x и A'_{IS} – высоты или площади хроматографических пиков аналита и ВС модельной смеси.

2.2. Определение микробных маркеров в плазме крови человека для оценки оксидативного стресса

Измерение количества микробных маркеров в пробах крови проводят методом хромато-масс-спектрометрии с помощью газового хроматографа «Agilent 7890» с масс-селективным детектором («AgilentTechnologies», США) (рис. 8).



Рис. 8. Газовый хроматограф «Agilent 7890» с масс-селективным детектором («AgilentTechnologies», США).

Идентификацию микробных маркеров осуществляют по времени удерживания и характеристическим ионам, в режиме регистрации индивидуальных ионов (SIM), установленным при предварительной градуировке прибора.

Количественное определение проводят методом внутреннего стандарта.

Оборудование

Газовый хроматограф «Agilent 7890» (Agilent Technologies, США) с масс-селективным детектором.

Весы «Sartorius» (Германия) с измерением массы до 250 г. С точностью 0,0001-0,00001 г. или аналогичные.

Центрифуга «Allegra 25R» (BECKMAN COULTER, США) или аналогичная.

pH-метр с автоматической термокомпенсацией, SSUenEasy pH S20-k+ (pH-метр с универсальным комбинированным электродом InLab 413, микроэлектродом InLab 423 с кабелем и раствором для чистки электродов, набором стандарт-титров).

Шкаф лабораторный в комплекте «Koettermann» (Германия) 1800x900x2250.

Смеситель лабораторный Vortex V-3.

Реактивы и материалы

Метанол для ВЭЖХ, 99,8%, Merck, Германия.

Гексан, Химмед, Россия.

Соляная кислота, Химмед, Россия.

N,O-бис(триметил-силил)-трифторацетамид, AppliChem GmbH, Германия.

Дейтерометилловый эфир тридекановой кислоты.

Допускается применение реактивов, изготовленных по другой нормативно-технической документации, с квалификацией чистоты не ниже указанной выше.

Средства измерения и вспомогательная посуда

Колбы мерные вместимостью 10 и 100 мл, 1 класса точности, с погрешностью $\pm 0,025$ мл и $\pm 0,1$ мл соответственно по ГОСТ 1770.

Автоматические дозаторы фирмы Biohit с дозируемым объемом от 0.5 до 5000 мкл.

Полипропиленовые флаконы для анализируемых и градуировочных растворов вместимостью 250 мкл и 1,5 мл с завинчивающимися крышками фирмы Agilent или аналогичные.

Хроматографические условия измерения

Настройка хроматографа и масс-спектрометрического детектора проводится в соответствии с руководством по эксплуатации. После запуска прибора производится проверка технических характеристик, выполняется тест эквивалентной фоновой концентрации, тест на воспроизводимость и предел обнаружения.

Хроматографическое разделение пробы осуществляют на капиллярной колонке с метилсиликоновой привитой фазой HP-5 ms (Agilent Technologies, США) длиной 25 м и внутренним диаметром 0,25 мм, газ-носитель - гелий. Режим анализа - программированный, скорость нагрева термостата колонки 7°C/мин в диапазоне 135 - 320°C. Выдержка при начальной температуре 1,5 мин. Температура испарителя – 250°C, интерфейса – 250 - 300°C. Масс-спектрометр -

квадрупольный, с ионизацией электронами (70 эВ) используют в режиме селективных ионов, или масс-фрагментографии (МФ), при периодическом сканировании до тридцати ионов в пяти интервалах времени. Интервалы и ионы выбирают таким образом, чтобы селективно детектировать маркеры определяемых видов микроорганизмов. В том числе используют сильный ион $m/z = 87$ в спектрах жирных кислот для детектирования малых количеств микробных кислот C12-C15, C17, C19.

Ион 175 включают в каждый интервал, кроме пятого для детектирования β -оксикислот, для которых он специфичен и интенсивен в спектре.

Ионы 301, 315 и далее через 14 единиц массы включают в программу для подтверждения молекулярного иона оксикислот тридекановой, тетрадекановой и следующих в гомологическом ряду.

Ион 312, как молекулярный, используют для выявления изомеров нонадекановой кислоты, важной для диагностики стафилококка и энтерококков. Анализ биологических жидкостей человека проводят в основном методом МФ по селективным ионам, а полное сканирование используют эпизодически для идентификации компонентов в новых пробах или для разметки программы временных интервалов МФ. В таблице 2 показано распределение ионов по временным интервалам в программе ГХ-МС для анализа микробных маркеров в пробах биологических жидкостей и тканей человека с указанием детектируемых маркеров и соответствующих им микроорганизмов.

Для количественного определения концентрации определяемого вещества используется автоматическое интегрирование хроматограмм с помощью программного обеспечения фирмы Agilent Technologies, США, MSD Chem Station.

Для обсчета данных на персональном компьютере разработан алгоритм (Осипов Г.А. Способ определения родового (видового) состава ассоциации микроорганизмов./Патент РФ № 2086642. С12N 1/00, 1/20, С12Q 1 /4, 24.12.1993.), который используют на РС класса не ниже Pentium 1.

Таблица 2

Группы сканируемых ионов, маркеров и соответствующих микроорганизмов

Группа	Начало, мин	Ионы	Вещества	Микроорганизмы
1	3,0 перед C10	87,1	Общий ЖК от C10- до C16: $\Delta 11$	pp. <i>Clostridium</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , <i>Ruminococcus</i> , в. <i>Nocardia asteroides</i>
		175,2	3h (общий)	pp. <i>Neisseria</i> , <i>Acinetobacter</i>
		259,2	h10 (M-15)	p. <i>Pseudomonas</i>
		287,3	h12 (M-15)	pp. <i>Pseudomonas</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Moraxella</i>
		243,3	2h12	в. <i>P. aeruginosa</i> , p. <i>Acinetobacter</i>
		241,2	i,a15a	p. <i>Butyrivibrio</i>
		270,3	i16	p. <i>Streptomyces</i>
		301,2	hi13, H13	pp. <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Selenomonas</i>
		75,1	Жирные альдегиды	pp. <i>Propionibacterium</i> , <i>Eubacterium</i>
		90,1	C13CD ₃	Дейтеротридекановая кислота, внутренний стандарт
		103,1	Жирные спирты	Компоненты кожного сала
		186,2	10:0	p. <i>Streptococcus</i> (опальные)

2	12,3 после C16:1	271,2 175,2 315,3 103,1 75,1 253,2	2h14 3h, общий h14 M Жирные альдегиды i16a	p. <i>Alcaligenes</i> p. <i>Fusobacterium</i> , сем. <i>Enterobacteriaceae</i> pp. <i>Fusobacterium</i> , <i>Haemophilus</i> , сем. <i>Enterobacteriaceae</i> Компоненты кожного сала в. <i>Eubacterium lentum</i> в. <i>Eubacterium lentum</i>
3	12,8 После 3h14	87,1 285,2 250,2 298,3 175,2 75,1	i,a,n17:0; 10Me16; 18:1 Δ11 2h (общий), 2hi15 17cyc, i17:1 и 17:1 i18 3h общий Жирные альдегиды	Коринеформы <i>CDC. Propionibacterium</i> , pp. <i>Rhodococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> p. <i>Flavobacterium</i> , сем. <i>Enterobacteriaceae</i> , pp. <i>Candida</i> , <i>Campylobacter</i> в. <i>Clostridium difficile</i> p. <i>Prevotella</i> p. <i>Eubacterium</i> , в. <i>P. freudenreichii</i>
4	15,0 после 18:1Δ11	273,3 87,1 75,1 281,3 399,3 427,3 175,1 312,3 278,2 199,2 383,3 117	10h18, 10h16 ЖК (общий) Жирные альдегиды Δ9, Δ11-18:1a hi20, h20 h22 3h16, 3h18 i,a,n19:0 19cyc, 19:1; 11Me18:1 10Me18 2h22 2h20alk	в. <i>C. perfringens</i> , p. <i>Malassesia</i> pp. <i>Staphylococcus</i> , <i>Actinomyces</i> , <i>Streptococcus mutans</i> pp. <i>Bifidobacterium</i> , <i>Enterococcus</i> pp. <i>Eubacterium</i> , <i>Bifidobacterium</i> в. <i>Chlamidia trachomatis</i> в. <i>Chlamidia trachomatis</i> pp. <i>Prevotella</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Burkholderia</i> , в. <i>Helicobacter pylori</i> , pp. <i>Staphylococcus</i> , <i>Mycobacteria</i> pp. <i>Enterococcus</i> , <i>Afpia</i> , в. <i>Helicobacter mustelae</i> pp. <i>Mycobacteria</i> , <i>Corinebacterium</i> Микроскопические грибы в. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
5	23,0 после h22	411,3 370,3 456,3 382,3 363,3 343,3 472,3 396,3	2h24 Копростанол Холестендиол Холестадиенон Эргостерол Кампестерол Метилхолестанол β-ситостерол	Микроскопические грибы p. <i>Eubacterium</i> Вирус герпеса Цитомегаловирус Микроскопические грибы Микроскопические грибы Вирус герпеса Микроскопические грибы

Подготовка проб к измерениям

Кровь из пальца или из вены в количестве не менее 100 мкл отбирают в пробирку с гепарином или ЭДТА (цитрат не рекомендуется) и помещают в холодильник. Для анализа цельную кровь в количестве 40 мкл пипеткой переносят в виал, емкостью 1,5 мл, с завинчивающейся крышкой с тефлонированной прокладкой, подсушивают (при снятой крышке) в термостате при 80°C с добавлением 40 мкл метанола для ускорения сушки. К загустевшей пробе приливают 400 мкл 1М соляной кислоты в метаноле, завинчивают плотно крышкой и подвергают кислотному метанолизу при 80°C в течение 1 часа. К охлажденной реакционной среде добавляют 300 нг стандарта (дейтерометиловый эфир тридекановой кислоты), растворенного в гексане. Затем проводят экстракцию двумя порциями по 200 мкл гексана, встряхнув смесь на вортексе и позволяя ей отстояться в течение 5 мин при комнатной температуре. Объединенный экстракт переносят в чистый виал, высушивают 5-7 мин при 80°C

и сухой остаток обрабатывают 20 мкл N,O-бис(триметилсилил)-трифторацетамида, в течение 15 мин при 80°C при закрытой крышке. К реакционной смеси добавляют 80 мкл гексана и, при анализе с использованием автосемплера, переносят смесь в коническую вставку, которую помещают в тот же виал, в котором проводили силилирование, и завинчивают его плотно крышкой. В таком виде проба пригодна для анализа в течение недели, если она герметично закрыта, и не происходит ее испарения. При ручном вводе пробы коническая вставка не нужна.

Выполнение измерений и обработка результатов измерений

Измерения проводят в тех же условиях, в которых проведена градуировка прибора.

Сбор данных состоит в измерении площадей пиков ионов определенной массы на селективной хроматограмме (МФ) специфических веществ - маркеров микроорганизмов (рис. 9). Для этого набирают или вводят готовую программу формата Method в соответствии с принятыми в программном обеспечении ГХ-МС-системы способом и формой. Полученные хроматограммы обрабатывают автоматически, пользуясь соответствующей опцией штатной программы обработки данных. В приборах Agilent Technologies - это опция "Calculate" в меню "Quantitate" программы Enhanced Data Analysis.

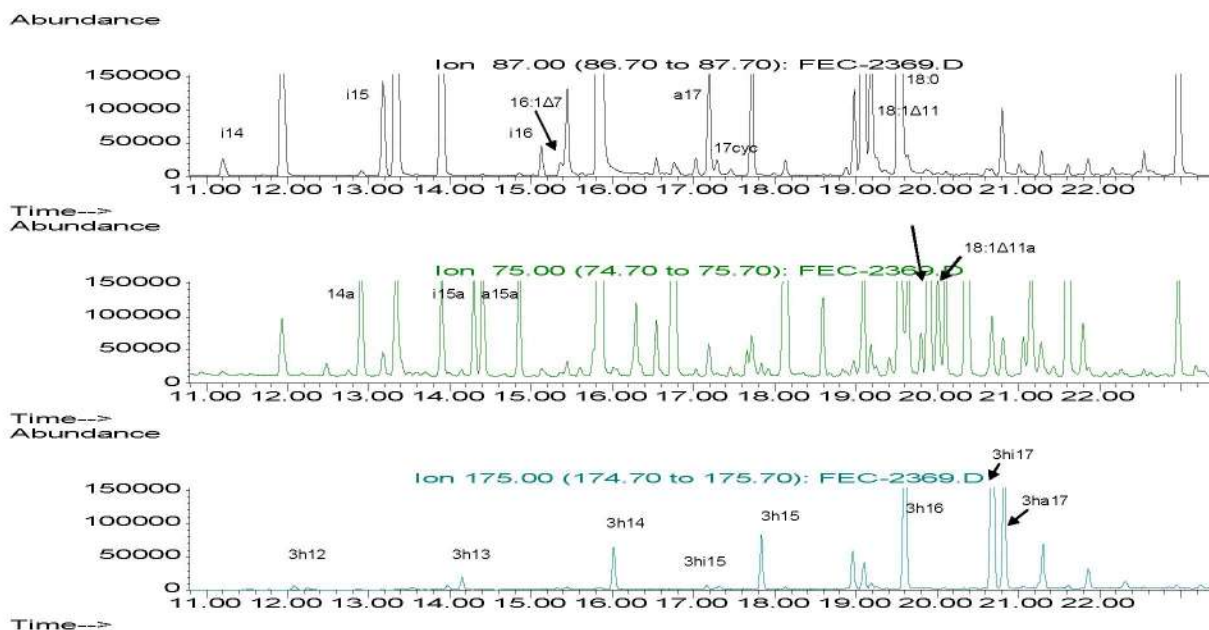


Рис. 9. Селективные хроматограммы жирных кислот (ион 87, верхний рисунок), жирных альдегидов (ион 75, рисунок в середине) и гидроксикислот (ион 175, нижний рисунок), экстрагированных из клинического материала, содержащего микроорганизмы и/или их маркеры. Обозначения веществ: 17:1 - 17- число атомов углерода, цифра после двоеточия - число двойных связей; h - оксикислота; a,i - в начале означает разветвление; alc - в конце символов - спирт, cyc - циклопропановая кислота. Например, ha17 - 3-оксиантеизогептадекановая кислота, 2h24alc - 2-окситетракозиловый спирт.

Частично, данные автоматической обработки требуют ручной проверки измерения пиков. Это относится к неп полностью разделенным на хроматограмме

пикам или малым пикам, находящимся в соседстве с более интенсивными. Эти пики находят руководствуясь закономерностями их появления на хроматограмме - т.е. абсолютными и относительными временами удерживания, подтверждением дополнительными ионами и соотношением площадей ионов. Для облегчения поиска нужного иона используют шаблоны.

Существуют некоторые общие закономерности расположения пиков жирных кислот и альдегидов при анализе на применяемом типе колонок и режиме анализа:

Нормальные прямоцепочечные ЖК образуют сетку маркерных пиков, которые выходят через равные промежутки времени. Их место при необходимости можно находить, измеряя промежутки линейкой на хроматограмме.

Антеизо- кислоты выходят раньше нормальных на 0,35 мин, изо-кислоты на 0,5 мин, мононенасыщенные расположены между антеизо-кислотами и соответствующими им нормальными кислотами по оси времени

Оксикислоты появляются сразу после нормальной кислоты, которая на два атома углерода больше, чем сама оксикислота. Причем 2h изомер сдвинут относительно 3h варианта на +0,05 мин). Оксилауриновые кислоты (h12) выходят спустя 0,3 мин после C14:0, у следующих кислот в ряду эта задержка уменьшается до нуля для оксиоктадекановых кислот. 10-оксистеариновая (m=273) и 3-оксистеариновая (m=175 под ней) кислоты совпадают по времени выхода с C20:0.

Общим для простых ЖК является ион 87, для оксикислот - ион 175, жирных альдегидов – ион 75.

В таблице 3 приведены характеристики некоторых маркеров для проведения измерений площадей пиков вручную.

Таблица 3

Основные характеристики некоторых маркеров

Время удерживания	Маркер	Химическая формула	Мол.масса (Ме-ТМС произв.)	Основной ион	Доп. ион
8,75	3h10	$C_7H_{15}-\underset{\substack{ \\ OH}}{CH}-CH_2-C \begin{matrix} \nearrow O \\ \searrow OH \end{matrix}$	188 (274)	175	259
9,91	C13CD3	$C_{12}H_{25}-C \begin{matrix} \nearrow O \\ \searrow O-CD_3 \end{matrix}$	231 (357)	90	-
12,25	3h12	$C_9H_{19}-\underset{\substack{ \\ OH}}{CH}-CH_2-C \begin{matrix} \nearrow O \\ \searrow OH \end{matrix}$	216 (302)	175	287
12,30	2h12	$C_{10}H_{21}-\underset{\substack{ \\ OH}}{CH}-C \begin{matrix} \nearrow O \\ \searrow OH \end{matrix}$	216 (302)	243	287
15,36	16:1d7	$C_8H_{17}-CH=CH-(CH_2)_5-C \begin{matrix} \nearrow O \\ \searrow OH \end{matrix}$	255 (341)	87	-

16,03	3h14	$\text{C}_{11}\text{H}_{23} \begin{array}{c} \text{CH} \\ \\ \text{OH} \end{array} \text{CH}_2 \text{C} \begin{array}{l} \text{=O} \\ \text{OH} \end{array}$	244 (330)	175	315
16,08	2h14	$\text{C}_{12}\text{H}_{25} \begin{array}{c} \text{CH} \\ \\ \text{OH} \end{array} \text{C} \begin{array}{l} \text{=O} \\ \text{OH} \end{array}$	244 (330)	271	315
17,29	3hi15	$\text{iso-C}_{12}\text{H}_{25} \begin{array}{c} \text{CH} \\ \\ \text{OH} \end{array} \text{CH}_2 \text{C} \begin{array}{l} \text{=O} \\ \text{OH} \end{array}$	258 (344)	175	329
19,64	3h16	$\text{C}_{13}\text{H}_{27} \begin{array}{c} \text{CH} \\ \\ \text{OH} \end{array} \text{CH}_2 \text{C} \begin{array}{l} \text{=O} \\ \text{OH} \end{array}$	272 (358)	175	-
20,56	3hi17	$\text{C}_{14}\text{H}_{29} \begin{array}{c} \text{CH} \\ \\ \text{OH} \end{array} \text{CH}_2 \text{C} \begin{array}{l} \text{=O} \\ \text{OH} \end{array}$	286 (372)	175	357
20,85	a19	$\text{C}_2\text{H}_5 \begin{array}{c} \text{CH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} (\text{CH}_2)_{14} \text{C} \begin{array}{l} \text{=O} \\ \text{OH} \end{array}$	274 (360)	87	312
22,95	3h18	$\text{C}_{15}\text{H}_{31} \begin{array}{c} \text{CH} \\ \\ \text{OH} \end{array} \text{CH}_2 \text{C} \begin{array}{l} \text{=O} \\ \text{OH} \end{array}$	300 (386)	175	371
22,91	10h18	$\text{C}_8\text{H}_{17} \begin{array}{c} \text{CH} \\ \\ \text{OH} \end{array} (\text{CH}_2)_8 \text{C} \begin{array}{l} \text{=O} \\ \text{OH} \end{array}$	300 (384)	273	-
25,46	3hi20	$\text{iso-C}_{17}\text{H}_{35} \begin{array}{c} \text{CH} \\ \\ \text{OH} \end{array} \text{CH}_2 \text{C} \begin{array}{l} \text{=O} \\ \text{OH} \end{array}$	328 (414)	399	175
11,22	i14	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array} \text{CH} (\text{CH}_2)_{10} \text{C} \begin{array}{l} \text{=O} \\ \text{OH} \end{array}$	228	87	-
13,21	i15	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array} \text{CH} (\text{CH}_2)_{11} \text{C} \begin{array}{l} \text{=O} \\ \text{OH} \end{array}$	242	87	-
17,08	i17	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array} \text{CH} (\text{CH}_2)_{13} \text{C} \begin{array}{l} \text{=O} \\ \text{OH} \end{array}$	270	87	-
17,78	17:0	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{15} \text{C} \begin{array}{l} \text{=O} \\ \text{OH} \end{array}$	270	87	-
18,93	i18	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array} \text{CH} (\text{CH}_2)_{14} \text{C} \begin{array}{l} \text{=O} \\ \text{OH} \end{array}$	284	298	-

2.3. Определение полиненасыщенных жирных кислот в плазме крови человека для оценки оксидативного стресса

Измерение массовой концентрации ненасыщенных жирных кислот (омега-3, омега-6, омега-9) в пробах плазмы крови проводят методом хромато-масс-спектрометрии с помощью газового хроматографа «Agilent 7890» с масс-селективным детектором («AgilentTechnologies», США) или аналогичным (рис. 7).

Идентификацию концентрации ненасыщенных жирных кислот осуществляют по времени удерживания и характеристическим ионам, в режиме регистрации индивидуальных ионов (SIM), установленным при предварительной градуировке прибора.

Количественное определение проводят методом градуировочного графика.

Оборудование

Газовый хроматограф «Agilent 7890» (Agilent Technologies, США) с масс-селективным детектором.

Весы «Sartorius» (Германия) с измерением массы до 250 г. С точностью 0,0001-0,00001 г. или аналогичные.

Центрифуга «Allegra 25R» (BECKMAN COULTER, США) или аналогичная.

pH-метр с автоматической термокомпенсацией, SSUenEasy pH S20-k+ (pH-метр с универсальным комбинированным электродом InLab 413, микроэлектродом InLab 423 с кабелем и раствором для чистки электродов, набором стандарт-титров).

Шкаф лабораторный в комплекте «Koettermann» (Германия) 1800x900x2250.

Смеситель лабораторный Vortex V-3.

Реактивы и материалы

Субстанции метилового эфира:

- арахидоновой кислоты (>99%, жидкое вещество);
- линолевой кислоты (>99%, жидкое вещество);
- альфа-линоленовой кислоты (>99%, жидкое вещество);
- докозагексаеновой кислоты (>99%, жидкое вещество);
- эйкозапентаеновой кислоты (>99%, жидкое вещество);
- эруковой кислоты (>99%, жидкое вещество);
- нервоновой кислоты (>98%, жидкое вещество);
- цис-вакценовой кислоты (>99%, жидкое вещество);
- эйкозеновой кислоты (>99%, жидкое вещество);

Метанол для ВЭЖХ, 99,8%, Merck, Германия.

Гексан, Химмед, Россия.

Соляная кислота, Химмед, Россия.

Допускается применение реактивов, изготовленных по другой нормативно-технической документации, с квалификацией чистоты не ниже вышеуказанной.

Биологическая матрица

Матрицей для приготовления калибровочных образцов служит альбумин человека (10 %-ный раствор для инфузий).

Средства измерения и вспомогательная посуда

Колбы мерные вместимостью 10 и 100 мл, 1 класса точности, с погрешностью $\pm 0,025$ мл и $\pm 0,1$ мл соответственно по ГОСТ 1770.

Автоматические дозаторы фирмы Biohit с дозируемым объемом от 0.5 до 5000 мкл.

Полипропиленовые вials для анализируемых и градуировочных растворов вместимостью 250 мкл и 1,5 мл с завинчивающимися крышками фирмы Agilent или аналогичные.

Приготовление растворов

Для приготовления стандартных растворов ненасыщенных жирных кислот (омега-3, омега-6, омега-9) с концентрацией 1 мг/мл взвешивают по 1 мг стандартного образца каждой ненасыщенной жирной кислоты (точная навеска), помещают в вial из темного стекла вместимостью 1,5 мл и доводят до метки 1

мл гексаном. Соответственно конечная концентрация каждой ненасыщенной жирной кислоты составляет 1 мг/мл.

Рабочие стандартные растворы готовят разбавлением стандартных опорных растворов. Для приготовления калибраторов используются метиловые эфиры арахидоновой кислоты (>99%, жидкое вещество), линолевой кислоты (>99%, жидкое вещество), альфа-линоленовой кислоты (>99%, жидкое вещество), докозагексаеновой кислоты (>99%, жидкое вещество), эйкозапентаеновой кислоты (>99%, жидкое вещество), эруковой кислоты (>99%, жидкое вещество), нервоновой кислоты (>98%, жидкое вещество), цис-вакценовой кислоты (>99%, жидкое вещество), эйкозеновой кислоты (>99%, жидкое вещество).

Концентрации эфиров жирных кислот в калибровочных растворах подбираются таким образом, чтобы калибровочная кривая охватывала весь диапазон концентраций, возможный в реальных образцах (Арахидоновая кислота 30÷250 мкг/мл, Линолевая кислота 250÷800 мкг/мл, Альфа-линоленовая кислота 1÷50 мкг/мл, Докозагексаеновая кислота 5÷50 мкг/мл, Эйкозапентаеновая кислота 1÷150 мкг/мл, Эруковая кислота 1÷100 мкг/мл, Нервоновая кислота 5÷50 мкг/мл, Цис-вакценовая кислота 5÷50 мкг/мл, Эйкозеновая кислота 1÷75 мкг/мл).

Хроматографические условия измерения

Настройка газового хроматографа и масс-спектрометрического детектора проводилась в соответствии с руководством по эксплуатации. После запуска прибора производится проверка технических характеристик, выполняется тест эквивалентной фоновой концентрации, тест на воспроизводимость и предел обнаружения.

Хроматографическое разделение пробы осуществляют на капиллярной колонке Select FAME (Agilent Technologies, США) длиной 100 м и внутренним диаметром 0,25 мм, газ-носитель - гелий. Режим анализа - программированный, скорость нагрева термостата колонки 20°C/мин в диапазоне 80 - 160°C. Выдержка при начальной температуре 1 мин. Скорость нагрева термостата колонки 1 °C/мин в диапазоне 160 - 198°C. Скорость нагрева термостата колонки 5°C/мин в диапазоне 198 - 250°C, выдержка при конечной температуре 15 мин. Температура испарителя – 220°C, интерфейса – 250°C.

Для количественного определения концентрации определяемого вещества используется автоматическое интегрирование хроматограмм с помощью программного обеспечения фирмы Agilent Technologies, США, MSD Chem Station.

Подготовка проб к измерениям

Непосредственно перед проведением измерений пробы размораживают при комнатной температуре. К каждой пробе объемом 100 мкл для осаждения белков и получения метиловых эфиров ненасыщенных жирных кислот добавляют 500 мкл 1М соляной кислоты в метаноле, инкубируют в термостате в течение 60 минут при 80 °C. Смесь встряхивается на вортексе в течение 5 мин. Экстракция эфиров жирных кислот проводится двумя порциями гексана по 500 мкл. Содержимое пробирок тщательно перемешивают с помощью устройства типа Vortex в течение 5 мин, после чего центрифугируют 5 мин со скоростью 4000 об./мин. 1 мл надосадочного слоя переносят в чистый эппендорф, высушивают

под током азота. К осадку добавляют 100 мкл гексана, переносят в чистую виалу и анализируют методом ГХ/МС путем ввода 1 мкл образца.

Выполнение измерений и обработка результатов измерений

Измерения проводили в тех же условиях, в которых проведена градуировка прибора.

Регистрируют масс-хроматограммы, соответствующие индивидуальным ионам для каждой из ненасыщенных жирных кислот.

В условиях автоматической регистрации и обработки данных определяют (в усл. ед.) площадь пиков ненасыщенных жирных кислот (омега-3, омега-6, омега-9).

Массовую концентрацию ненасыщенных жирных кислот (омега-3, омега-6, омега-9) вычисляют по установленной ранее градуировочной зависимости.

Типичная хроматограмма ПНЖК в образце плазмы крови представлена на рисунке 10.

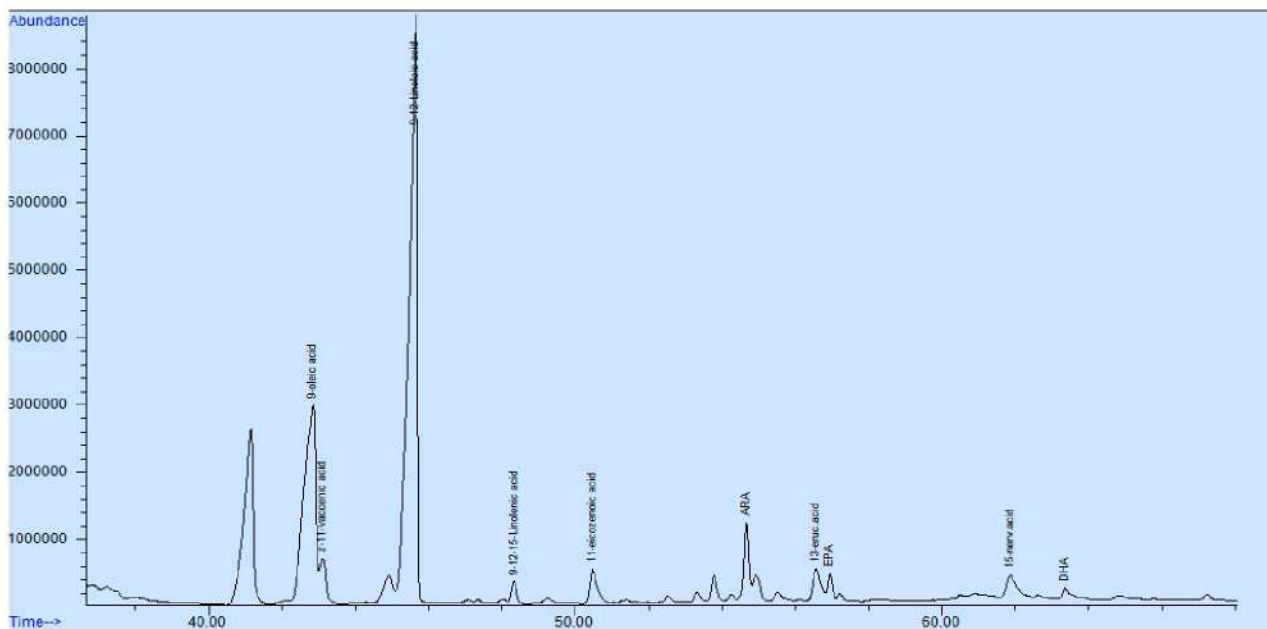


Рис.10. Типичная хроматограмм ПНЖК в образце плазмы крови.

2.4. Определение жирорастворимых витаминов А и Е в плазме крови человека для оценки оксидативного стресса

Измерение массовой концентрации жирорастворимых витаминов А и Е в пробах плазмы крови проводится методом ВЭЖХ в сочетании со спектрофотометрическим детектированием с помощью высокоэффективного жидкостного хроматографа «1200» (Agilent Technologies, США) с диодно-матричным детектором или аналогичным (рис. 3).

Идентификацию жирорастворимых витаминов (А, Е) осуществляют по времени удерживания и спектру, регистрируемому с помощью диодно-матричного детектора в диапазоне длин волн 200-400 нм.

Количественное определение проводят методом градуировочного графика.

Оборудование

Высокоэффективный жидкостный хроматограф «1200» (Agilent Technologies, США) с диодно- матричным детектором.

Весы «Sartorius» (Германия) с измерением массы до 250 г. С точностью 0,0001-0,00001 г. или аналогичные.

Центрифуга «Allegra 25R» (BECKMAN COULTER, США) или аналогичная.

pH-метр с автоматической термокомпенсацией, SSUenEasy pH S20-k+ (pH-метр с универсальным комбинированным электродом InLab 413, микроэлектродом InLab 423 с кабелем и раствором для чистки электродов, набором стандарт-титров).

Шкаф лабораторный в комплекте «Koeffermann» (Германия) 1800x900x2250.

Смеситель лабораторный Vortex V-3.

Реактивы и материалы

Субстанция Ретинола ацетата (>98%, сухое вещество).

Субстанция Альфа-токоферола ацетата (>98%, жидкое вещество).

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Кислота муравьиная фирмы AgiSUt, номер по каталогу G 2453-85060.

Метанол для ВЭЖХ, 99,8%, Merck, Германия.

Этанол, Химмед, Россия.

Гексан, Химмед, Россия.

КОН, Химмед, Россия.

Допускается применение реактивов, изготовленных по другой нормативно-технической документации, с квалификацией чистоты не ниже, указанной в п. 2.2.

Биологическая матрица

Матрицей для приготовления калибровочных образцов служит альбумин человека (10 %-ный раствор для инфузий).

Средства измерения и вспомогательная посуда

Колбы мерные вместимостью 10 и 100 мл, 1 класса точности, с погрешностью $\pm 0,025$ мл и $\pm 0,1$ мл соответственно по ГОСТ 1770.

Автоматические дозаторы фирмы Biohit с дозируемым объемом от 0.5 до 5000 мкл.

Полипропиленовые вials для анализируемых и градуировочных растворов вместимостью 250 мкл и 1,5 мл с завинчивающимися крышками фирмы Agilent или аналогичные.

Приготовление стандартных растворов жирорастворимых витаминов (А, Е)

Для приготовления стандартных растворов жирорастворимых витаминов (А, Е) с концентрацией 1 мг/мл взвешивают по 1 мг стандартного образца каждого витамина (точная навеска), помещают в вial из темного стекла вместимостью 1,5 мл и доводят до метки 1 мл метанолом. Соответственно конечная концентрация каждого из жирорастворимых витаминов составляет 1 мг/мл.

Приготовление градуировочных образцов жирорастворимых витаминов (А, Е)

Рабочие стандартные растворы готовят разбавлением стандартных опорных растворов. Для приготовления калибраторов используется ретинола ацетат (>98%, сухое вещество), альфа-токоферола ацетат (>98%, жидкое вещество). Концентрации жирорастворимых витаминов в калибровочных растворах подбираются таким образом, чтобы калибровочная кривая охватывала весь диапазон концентраций, возможный в реальных образцах (ретинола ацетат 100÷1500 нг/мл (в пересчете на ретинол), альфа-токоферола ацетат 1÷50 мкг/мл).

Подготовка хроматографа к выполнению измерений

Настройка хроматографа проводится в соответствии с руководством по эксплуатации. Хроматографические условия определения витаминов А, Е представлены в таблице 4.

Таблица 4

Хроматографические условия измерения

Колонка	Zorbax Eclips Plus C18 100 мм x 4.6 мм x 3.5 мкм с предколонкой Zorbax Eclips Plus C18 12.5 мм x 4.6 мм x 5 мкм
Скорость элюирования	0.4 мл/мин
Подвижная фаза А	вода + 0.1 % муравьиной кислоты
Подвижная фаза Б	метанол
Режим элюирования	градиентный

Подробно градиентный режим разделения витаминов А и Е представлен в таблице 5.

Таблица 5

Градиентный режим элюирования жирорастворимых витаминов А и Е

Время	% В
0	5
4.0	5
10.0	98
30.0	98
35.0	5
40.0	5

Для количественного определения концентрации определяемого вещества используется автоматическое интегрирование хроматограмм с помощью программного обеспечения фирмы Agilent Technologies, США, Mass Hunter.

Подготовка проб к измерениям

Непосредственно перед проведением измерений пробы размораживают при комнатной температуре. К каждой пробе объемом 500 мкл для осаждения белков добавляют 2500 мкл 1М КОН в этаноле, инкубируют в термостате в течение 30 минут при 60°C. К охлажденной реакционной смеси добавляют 5 мл гексана и 5 мл деионизированной воды. Содержимое пробирок тщательно перемешивают с помощью устройства типа Vortex в течение 5 мин, после чего центрифугируют 5

мин со скоростью 4000 об./мин. 5 мл надосадочного слоя переносят в чистый эппендорф, высушивают под током азота. К осадку добавляют 50 мкл метанола, переносят в чистую виалу и анализируют методом ВЭЖХ с диодно-матричным детектором путем ввода 20 мкл образца.

Выполнение измерений и обработка результатов измерений

Измерения проводят в тех же условиях, в которых проведена градуировка прибора.

Регистрируют хроматограммы по длинам волн, соответствующим максимальному поглощению для каждого из жирорастворимых витаминов (Витамин А 318 нм, витамин Е 292 нм)

В условиях автоматической регистрации и обработки данных определяют (в усл. ед.) площадь пиков жирорастворимых витаминов (А, Е).

Массовую концентрацию жирорастворимых витаминов (А, Е) вычисляют по установленной ранее градуировочной зависимости.

Типичные хроматограммы образцов плазмы крови при определении жирорастворимых витаминов А и Е представлены на рисунка 11 и 12.

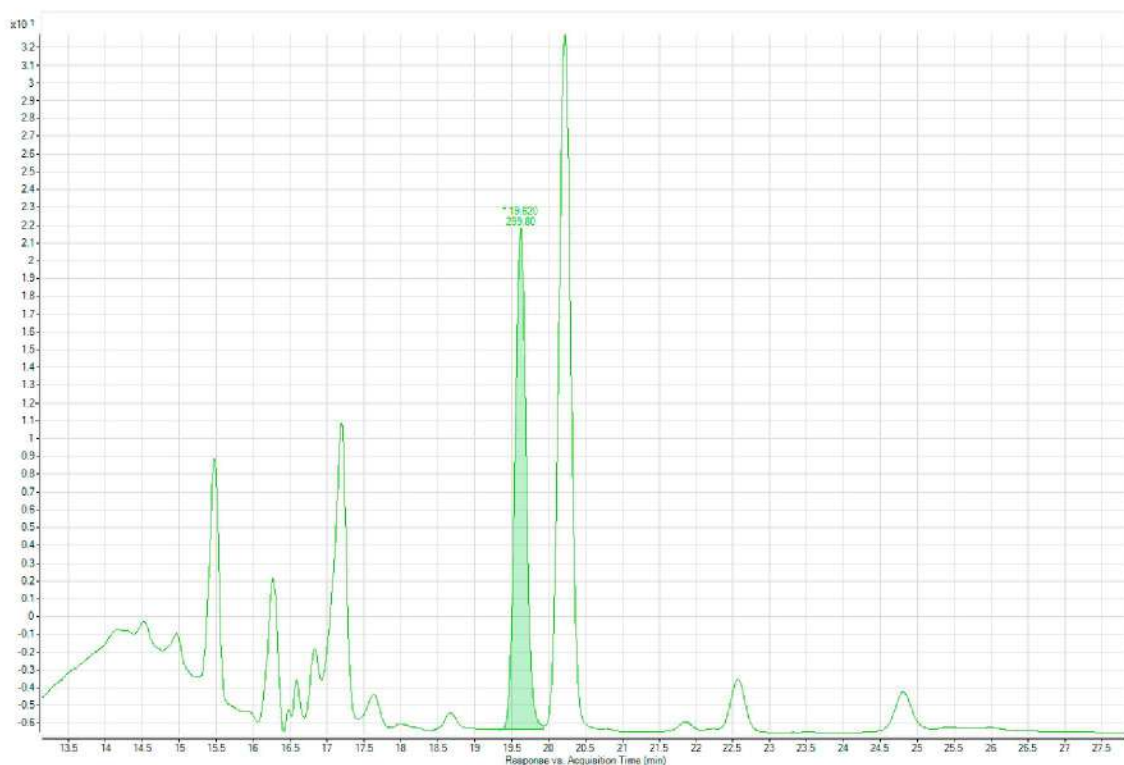


Рис. 11. Типичная хроматограмма образца плазмы крови при определении витамина А, длина волны 318 нм.

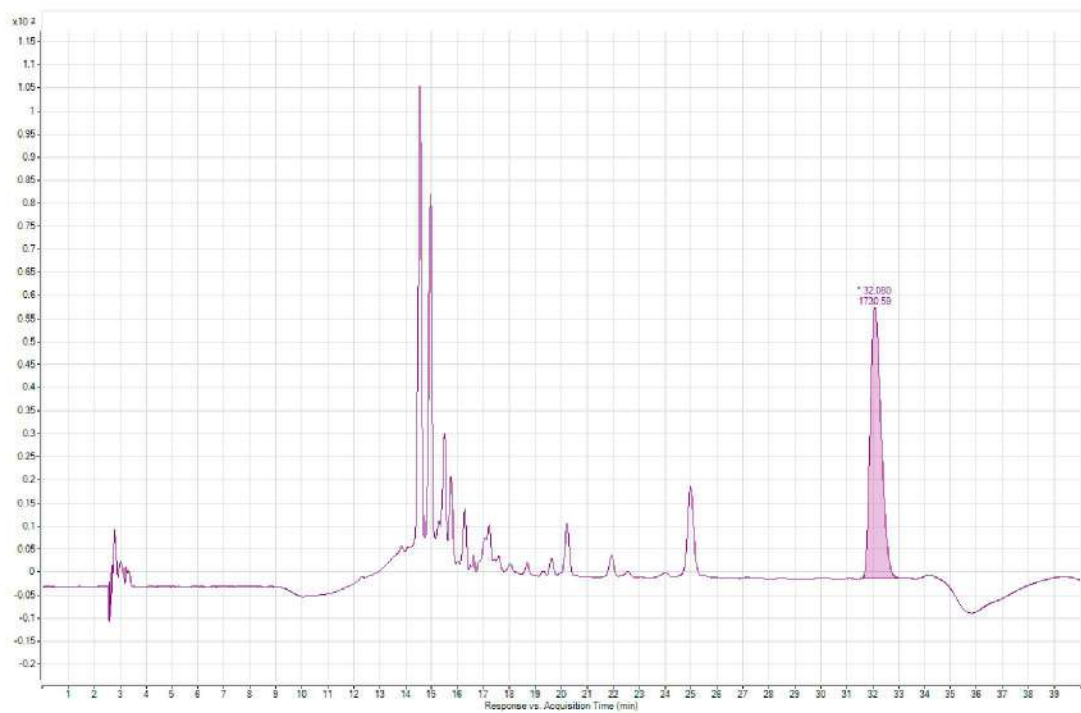


Рис. 12. Типичная хроматограмма образца плазмы крови при определении витамина Е, длина волны 292 нм.

2.5. Определения концентрации химических элементов методом масс-спектрологии с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-МС) в пробах волос

Количественное определение содержания химических элементов в пробах волос проводят методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой.

Метод ИСП-МС комбинирует использование индуктивно связанной плазмы в качестве источника ионов с квадрупольным масс-спектрометром – масс-анализатором. Для регистрации ионов и их потоков используется дискретно-диодный детектор. Из атомов вводимого образца индуктивно связанной плазмой происходит возбуждение однозарядных ионов, которые фокусируются ионно-оптической системой и разделяются анализатором масс-спектрометра по отношению масс к заряду. В каждый момент времени через масс-спектрометр пропускается ионы со строго определенным соотношением массы и заряда, которые детектируются для количественной регистрации.

Регистрация сигналов происходит в импульсном и аналоговом режимах, что необходимо для подсчета отдельных ионов и ионных токов. Двойной режим регистрации позволяет определять концентрации элементов на уровне от сотых долей нанограммов до сотен миллиграммов на литр в одном образце при разовом вводе пробы. В результате использованной технологии анализа, метод ИСП-МС обладает высокой чувствительностью и избирательностью, что является его несомненным достоинством и уникальностью.

Определение содержания химических биоэлементов в биосубстратах осуществляют в соответствии с Методическими указаниями, утвержденными Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г.Г. Онищенко (2003 год). Оно включает следующие этапы: пробоподготовку,

подготовку к измерениям, непосредственно проведение измерений и обработку полученных результатов.

В качестве биосубстратов используют пробы волос. Образцы проб получают путем состригания волос с 3-5 участков затылочной части головы на всю длину в количестве не менее 0,1 г. Пробы помещают в бумажные конверты с идентификационными записями. Для элементного анализа волос используют проксимальные части прядей.

Пробы волос перед микроволновым разложением обрабатывают особо чистым ацетоном для обезжиривания и удаления посторонних включений в течение 10-15 минут, затем трижды промывают дистиллированной водой. Волосы высушивают при комнатной температуре. На аналитических весах отбирают навеску волос массой 0,1 г. Полученную навеску помещают во фторопластовый вкладыш автоклава и добавляют 5 мл концентрированной азотной кислоты. Автоклав с пробой во вкладыше помещают в микроволновую печь (MARS 5- рис. 13) и разлагают пробу, используя программу и методику, рекомендованную производителем MARS 5.

Режим работы микроволновой печи: нагрев до температуры 200°C в течение 5 мин, выдерживание в течение 5 мин при 200°C и охлаждение до 45°C при давлении воздуха в печи 2 атм. Охлажденные автоклавы с биопробами извлекают из микроволновой печи, встряхивают для перемешивания содержимого. Качественно разложенная проба после отгона окислов азота представляется бесцветным или желтоватым прозрачным раствором без нерастворившихся частиц на дне и на стенках вкладыша. Растворенную и подготовленную биопробу разбавляют 2% раствором азотной кислоты в 1000 раз.



Рис. 13. Рабочая зона для пробоподготовки с помощью MARS 5 образцов волос для анализа микроэлементного состава.

Раствор холостой пробы готовят с выполнением всех указанных выше операций, за исключением операции взятия навески. Подготовка масс-

спектрометра (Agilent Technologies 7900- рис.14) к измерениям проводится в соответствии с руководством пользователя по эксплуатации.

После запуска прибора проводят проверку технических характеристик, выполняя тест эквивалентной фоновой концентрации, тест на воспроизводимость, тест на предел обнаружения. Затем с помощью стандартных градуировочных растворов выполняют градуировку прибора.



Рис. 14. Рабочая зона для микроэлементного анализа готовых биопроб с помощью масс-спектрометра с индуктивно связанной плазмой Agilent Technologies 7900.

Концентрации элементов в стандартных растворах подбирают таким образом, чтобы после разбавления в 20 - 50 раз получались концентрации одного порядка с верхними границами диапазона содержаний элементов в волосах, разложенных по стандартной методике.

Для приготовления градуировочных растворов используют многоэлементный раствор IV-ICPMS-71A, производство «Inorganic ventures», содержащий следующие элементы: Ag, Al, As, B, Ba, Be, Ca, Cd, Ce, Cr, Co, Cs, Cu, Dy, Er, Eu, Fe, Ga, Gd, Ho, K, La, Lu, Mg, Mn, Na, Nd, Ni, P, Pr, Rb, S, Se, Sm, Sr, Th, Tl, Tm, U, V, Yb, Zn в концентрации 10 мкг/мл (10 ppm).

В качестве внутреннего стандарта используют раствор IV-ICPMS-71D, производство «Inorganic ventures», содержащий Bi, In, Li6, Sc, Tb, Y в концентрации 10 мкг/мл (10 ppm).

Дополнительно используют моноэлементные растворы производства «Центра стандартных образцов и высокочистых веществ».

Измерение содержания биоэлементов в образцах выполняют с учетом требований руководства по эксплуатации спектрометра. Обработка результатов измерений должна соответствовать ГОСТ 8.207. Результаты измерений выводятся на дисплей, сохраняют в файле на жестком диске. Распечатанные результаты оформляются протоколом.

2.6. Требования безопасности при выполнении измерений

При выполнении измерений должны соблюдаться следующие требования безопасности:

Работы в химической лаборатории, изложенные в «Основных правилах безопасной работы в химических лабораториях»;

Техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007-76;

Электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019-79;

При работе с газами в баллонах под давлением должны соблюдаться «Правила устройств и безопасной эксплуатации сосудов под давлением», утвержденные Госгортехнадзором;

Помещение должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004-91.

Содержание вредных веществ в воздухе не должно превышать допустимых значений по ГОСТ 12.1.005-88;

Организацию обучения работников безопасности труда осуществлять по ГОСТ 12.0.004-90.

При выполнении измерений должны соблюдаться следующие условия: температура окружающего воздуха $20 \pm 5^\circ\text{C}$; атмосферное давление 84,0-106,7 кПа (630-800 мм рт. ст.); относительная влажность воздуха ниже 85 % при 25°C ; напряжение в сети питания переменного тока 220 ± 22 В; концентрации мешающих определению и агрессивных компонентов в воздухе не превышала ПДК для воздуха рабочей зоны.

Образцы крови обрабатывают сразу или замораживают и хранят при $-5/ -18^\circ\text{C}$ в случае, когда немедленный анализ невозможен. Допускается транспортировка проб при нормальной температуре в течение пяти часов. Допускается длительное хранение в высушенном виде при необходимости дальнейшей транспортировки или пересылки пробы по почте (высушивать при температуре $70-85^\circ\text{C}$).

Другие условия измерений должны соответствовать инструкции по эксплуатации прибора

3. МЕТОДИКА ОБСЛЕДОВАНИЯ С ЦЕЛЬЮ ВЫЯВЛЕНИЯ ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ, ИНДУЦИРОВАННЫХ МУТАГЕННЫМИ ВОЗДЕЙСТВИЯМИ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА

Оценка мутагенных воздействий на организм человека проводится на основе анализа нестабильных хромосомных aberrаций в соматических клетках, а именно лимфоцитах периферической крови у лиц, подвергшихся действию мутагенных факторов (внешней или внутренней среды) при профессиональных или

аварийных контактах или в связи с регионом проживания. Проведение цитогенетического исследования включает в себя несколько этапов:

3.1. Культивирование лимфоцитов периферической крови

Для проведения цитогенетического анализа проводится культивирование лимфоцитов периферической крови. Кровь берут из локтевой вены в вакуумную пробирку для забора крови с гепарином натрия. После получения образца крови содержимое пробирки необходимо несколько раз перемешать переворачиванием, во избежание образования сгустков крови. Постановка культур крови производится в стерильных условиях (в ламинарном боксе). Для этого готовится питательная среда путем смешивания в стерильных конических центрифужных пробирках (15 мл) в состав которой входят: культуральная среда RPMI 1640 (4 мл), 1 мл эмбриональной телячьей сыворотки, фитогемагглютинин (ФГА) в количестве 50 мкг на 5 мл культуральной среды, глютамин. В пробирку добавляют 0.5 мл крови. Содержимое пробирок перемешивают. Для каждого пациента ставятся как минимум 2 пробирки. Пробирки помещают в термостат или в CO₂ инкубатор при температуре 37⁰С. Через 46-48 часов от начала культивирования в пробирки добавляют колхицин в конечной концентрации 0.005 мкг/мл. Культивирование проводят в течение 50-52 часов.

3.2. Приготовление препаратов метафазных хромосом лимфоцитов периферической крови

Через 50-52 часа от начала культивирования образцов крови пробирки извлекают из термостата (инкубатора) и центрифугируют при 1000 оборотов в минуту в течение 10 минут. Удалив надосадочную жидкость, осадок ресуспендируют в теплом (37⁰С) свежеприготовленном гипотоническом растворе 0.075 М KCl₂ и инкубируют в течение 30 минут при 37⁰С. После проведения гипотонической обработки клетки осаждают центрифугированием при 1000 об/мин. в течение 10 минут, удаляют супернатант. Осадок перемешивают и к нему осторожно добавляют холодный свежеприготовленный метанол-уксусный фиксатор (3 части абсолютного метанола и 1 часть ледяной уксусной кислоты). При отсутствии метанола может быть использован 95-96% этиловый спирт. Фиксацию проводят в трех-четырёх сменах фиксатора до полного осветления осадка. После каждой смены фиксатора клетки осаждают центрифугированием (1000 об/мин. в течение 10 мин.) и перемешивают со следующей порцией фиксатора. Последний полученный осадок ресуспендируют в 0.5 мл фиксатора. Полученная суспензия раскапывается на влажные, холодные предметные стекла. Стекла подсушивают на воздухе и окрашивают. Окрашивание препаратов производят в растворе красителя Гимза – Романовского/фосфатный буфер в соотношении 1:50 в течение 10 минут.

3.3. Микроскопирование

Анализ препаратов проводят под микроскопом при увеличении объектива 100*. Препараты шифруют. Анализируют от 100 метафаз на каждый случай. При цитогенетическом анализе заполняют специальные формы стандартных протоколов. Учитывают все типы хромосомных aberrаций: одиночные фрагменты, хроматидные обмены, парные фрагменты, дицентрические и иные полицентрические хромосомы, кольца, атипичные хромосомы.

При цитогенетическом обследовании производится учет количества хромосомных aberrаций и рассчитывается частота выявленных нарушений. Полученный показатель частоты хромосомных aberrаций сравнивают с показателями контрольной группы.

3.4. Метод СХО

Принципиально важным при проведении цитогенетического исследования является анализ метафаз именно на стадии первого митотического деления, так как нестабильные хромосомные aberrации, индуцированные мутагенными факторами в лимфоцитах *in vivo*, могут элиминироваться при последующих делениях. Первая волна митозов, как правило, проходит в культуре лимфоцитов через двое суток от начала культивирования. Однако, этот показатель может варьировать под влиянием различных факторов. Поэтому необходим контроль за скоростью клеточного деления в культуре. Этот контроль осуществляется с помощью метода сестринских хроматидных обменов (СХО), который позволяет визуально дифференцировать клетки, находящиеся на стадии первого и второго митотических делений.

При постановке культур крови в культуральную среду добавляют 5-бромдезоксимуридин (БДУ) в концентрации 10 мкг/мл. Время введения БДУ в различных методиках варьирует: его добавляют или в момент постановки культуры или через 24 часа - он должен быть доступен клеткам на стадии синтеза ДНК. Культивирование клеток и приготовление препаратов проводят по стандартной схеме.

После приготовления препараты подвергают процедуре «старения», для чего их выдерживают не менее 3 суток на воздухе. По окончании периода «старения» препараты стекла обрабатывают 20 мин. в водном растворе акридинового оранжевого (0,01 мг/мл) с последующей отмывкой препаратов в проточной воде; затем следуют 1,5 часа УФ-облучения на расстоянии 40 см в 0,07 М растворе Na_2HPO_4 ; 5 мин. в насыщенном растворе $\text{Ba}(\text{OH})_2$ с последующей отмывкой препаратов в проточной воде; 15-20 мин в фосфатном буфере pH 6,8. Окрашивание препаратов производят в растворе красителя Гимза – Романовского/фосфатный буфер в соотношении 1:50 окраска в течение 5 мин.

У клеток, прошедших в присутствии БДУ одно клеточное деление, хромосомы окрашиваются полностью, тогда как хромосомы на стадии второго митотического деления будут иметь характерную «арлекиновую» окраску – чередование светлых и темных участков.

Под микроскопом просчитывается соотношение первых и вторых митозов в культуре, и если частота вторых митозов не превышает 5-7 %, препараты могут быть использованы для дальнейшего анализа. В том случае, если количество клеток на стадии второй метафазы в культуре превышает указанные величины, необходимо провести коррекцию протокола постановки и снятия культур клеток, например, уменьшить время культивирования образцов.

На рисунках 15-20 представлены общий вид препарата метафазных хромосом лимфоцитов периферической крови и их хроматидные и хромосомные нарушения.

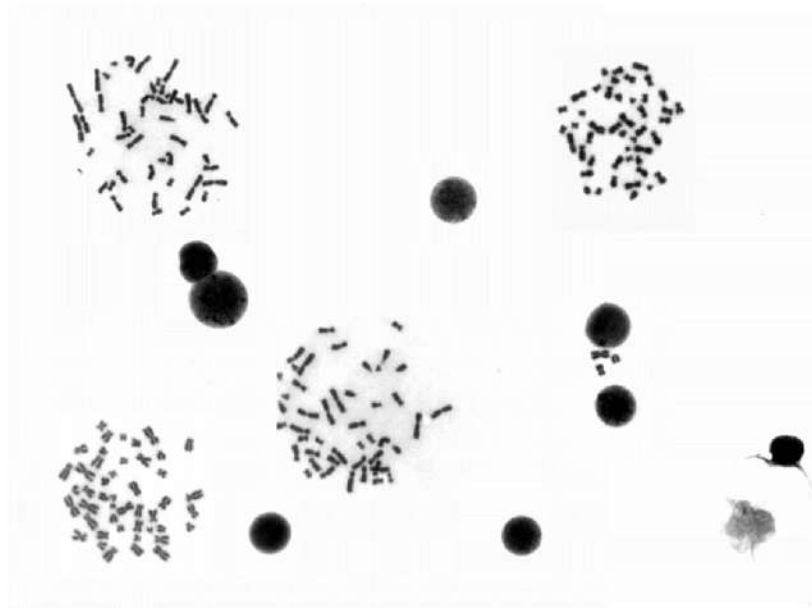


Рис. 15. Общий вид препарата метафазных хромосом лимфоцитов периферической крови. Окраска Гимзы-Романовского. Увеличение объектива 40X. В поле зрения 4 метафазных пластинки.

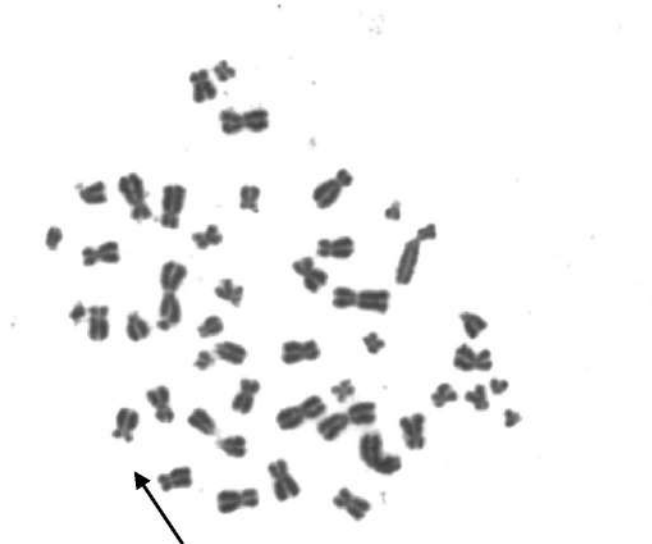


Рис. 16. Хроматидный тип нарушений – одиночный (хроматидный) фрагмент, отмечен стрелкой. Увеличение объектива 100X.

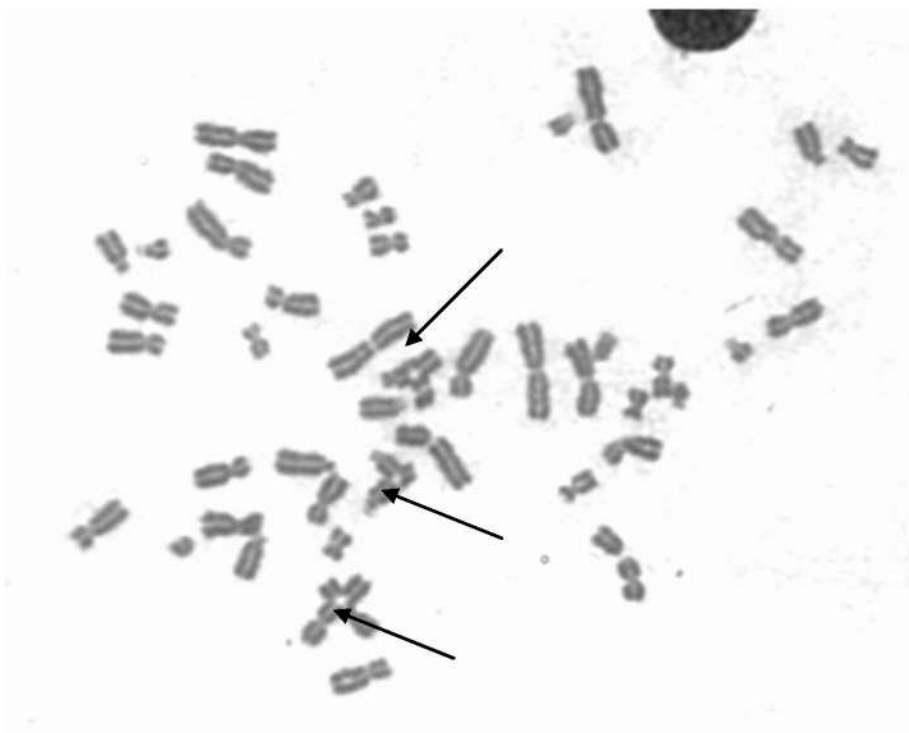


Рис. 17. Хроматидный тип aberrаций – хроматидные обмены (отмечены стрелкой). Увеличение объектива 100X.

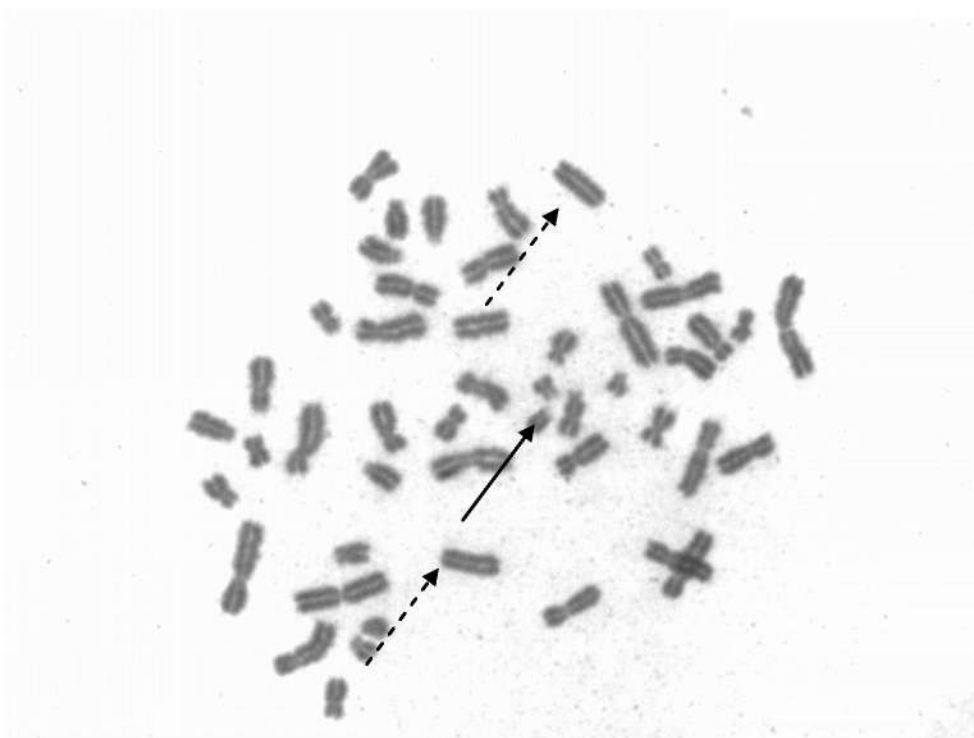


Рис. 18. Хромосомные типы нарушений – дицентрическая хромосома (отмечена стрелкой) и два парных (хромосомных фрагмента, отмечены пунктирной стрелкой). Увеличение объектива 100X.



Рис. 19. Хромосомные типы нарушений – дицентрическая хромосома (отмечена стрелкой) и два парных (хромосомных фрагмента, отмечены пунктирной стрелкой). Увеличение объектива 100X.

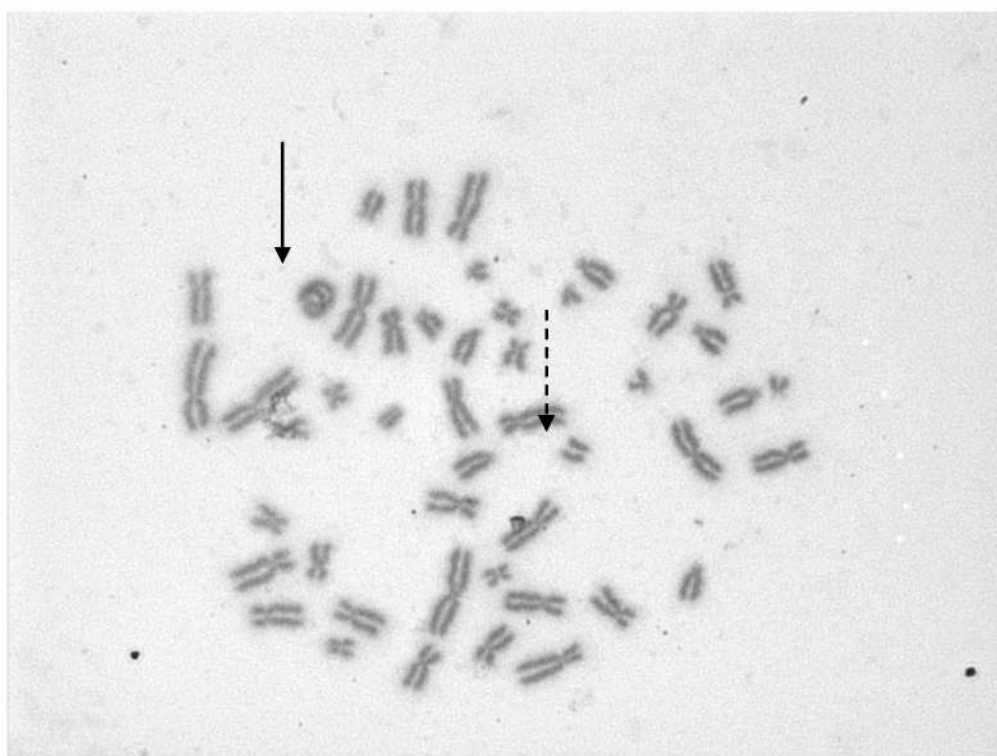


Рис. 20. Хромосомные типы нарушений – кольцевая хромосома (отмечена сплошной стрелкой) и парный (хромосомный) фрагмент (отмечен пунктирной стрелкой). Увеличение объектива 100X.

ВЫВОДЫ

Разработанные методы хромато-масс-спектрометрии и оценка нестабильных хромосомных aberrаций позволяют всесторонне оценивать параметры окислительного стресса у сотрудников ГПС МЧС России. Результаты комплексного обследования сотрудников ГПС МЧС России могут быть применены для увеличения резервных возможностей антиоксидантной системы их организма, путем направленной биоэлементной коррекции, применения пробиотических и витаминных комплексов, а так же препаратов с полиненасыщенными жирными кислотами. Индивидуальный подход к выбору профилактических и коррекционных мер позволит добиться более быстрых и значимых результатов.

Кроме того, путем контроля исследуемых показателей можно оценить эффективность лечебных мероприятий на ранних стадиях у сотрудников ГПС МЧС России.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Верзунов В.А. Оценка условий труда и профессионального риска у пожарных / В.А. Верзунов //Сб. "Науки о человеке": материалы VIII конгресса молодых ученых и специалистов / Под ред. Л.М. Огородовой, Л.В. Капилевича. – Томск: СибГМУ. – 2007. – 273 с.
2. Дисбиоз кишечника. Руководство по диагностике и лечению. – 2-е изд., испр. и доп. / под ред. Е.И. Ткаченко, А.Н. Суворова. – СПб.: ИнформМед, 2009. – 276 с.
3. Домрачев А.А. Психофизиологические аспекты состояния сотрудников оперативных подразделений ФПС в период боевых дежурств / А.А. Домрачев // Пожарная безопасность. – 2003. – №3. – С. 135-139.
4. Заболеваемость с трудовыми потерями у сотрудников государственной противопожарной службы МЧС России (1996–2015 гг.) / С.С. Алексанин [и др.] // Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. - 2018. - № 1. – С. 5-18
5. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. – М.: Фирма "Слово", 2006. – 556 с.
6. Методика масс-спектрометрии как способ оценки пристеночной микробиоты кишечника при заболеваниях органов пищеварения. Учебно-методическое пособие /Под ред. Г.А. Осипова, В.П. Новиковой. – Санкт-Петербург, 2013. – 96 с.
7. Методика определения микроэлементов в диагностируемых биосубстратах методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой. Методические рекомендации. Утверждены ФЦГСЭН МЗ РФ 26.03.2003 / Л.Г. Подунова [и др.]. – М.: ФЦГСЭН МЗ РФ. 2006. – 24 с.

8. Микронутриенты в питании здорового и больного человека : справ, рук. по витаминам и минеральным веществам / В. А. Тутельян [и др.]. – М. : Колос, 2002. – 424 с.
9. Немцов В.И. Нарушения состава кишечной микрофлоры и метаболический синдром // Клинико-лабораторный консилиум. – 2010. – №1. – С. 4–13.
10. Оксидативный стресс и воспаление: патогенетическое партнерство: Монография / Под ред. О.Г. Хурцилавы, Н.Н. Плужникова, Я.А. Накатиса. – СПб: Издательство. СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2012. – 340 с.
11. Оксидативный стресс: влияние на организм человека, методы оценки / Н.В. Нагорная Н.В. [и др.] // - Здоровье ребенка. – 2010. - № 2 (23). – С. 14-21
12. Определение химических элементов в биологических средах и препаратах методами атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой и масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой: Методические указания. – М. : Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2003. – 56 с.
13. Осипов Г.А. Хромато-масс-спектрометрический анализ микроорганизмов и их сообществ в клинических пробах при инфекциях и дисбиозах. В кн: Химический анализ в медицинской диагностике. – М.: Наука, 2010. – С. 293–368.
14. Оценка состояния здоровья сотрудников федеральной противопожарной службы Государственной противопожарной службы, спасателей МЧС России и работников военизированных горноспасательных частей МЧС России: отчет о НИР п. 1-1-5.2-5/Б2 Плана НИР и ОКР МЧС России на 2015г. / исп. М.В. Санников [и др.]; рук. О.М. Астафьев; ФГБУ ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС России. – СПб.; 2015. – 74 с.
15. Ребров В.Г. Витамины, макро- и микроэлементы / В.Г. Ребров, О.А. Громова. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 960 с.
16. Свободнорадикальное окисление и старение / В.Х. Хавинсон [и др.]. – СПб: Наука, 2003. – 327 с.
17. Скальный А.В. Химические элементы в физиологии и экологии человека. М.: Издательский дом «Оникс 21 век»: Мир, 2004. 216 с.
18. Токсико-химическое поражение на пожаре / С.Х. Сарманаев [и др.] - // Токсикология. – 2015. – Т.16. – С. 434-442.
19. Токсичные компоненты пожаров / Н.Ф. Маркизова [и др.]. – СПб: «ООО Издательство ФОЛИАНТ», 2008. – 208 с.
20. Федосына Е.А., Жаркова М.С., Маевская М.В. Бактериальная кишечная микрофлора и заболевания печени //Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии колопроктологии. – 2009. – Т. 19. №6. – С.73-81).
21. Эпидемиологическая генотоксикология тяжелых металлов и здоровье человека / Е.Н. Ильинских и [др.]. – Томск : Сиб. госмедуниверситет, 2003.–301 с.
22. Stephensen C. B. Vitamin A, infection and immune function // Annu. Rev. Nutr. — 2001. — Vol. 21. — P. 167–192.
23. Bartosińska E, Buszewska-Forajta M, Siluk D. GC-MS and LC-MS approaches for determination of tocopherols and tocotrienols in biological and food

matrices //Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2016. – Vol. 127. – P.156–169.

24. Caux C. Determination of firefighter exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and benzene during fire fighting using measurement of biological indicators / C. Caux, C. O'Brien, C. Viau // Appl Occup Environ Hyg. – 2002. – V. 17. – P. 379-386.

25. Lovric J., Mesic M., Macan M., Koprivic M., Kelava M., Bradamante V. Measurement of malondialdehyde (MDA) level in rat plasma after simvastatin treatment using two different analytical methods //Periodicum Biologorum. – 2008. – Vol. 110. N 1. – P. 63–67.

26. Nielsen F., Mikkelsen B.B., Nielsen J.B. et al. Plasma malondialdehyde as biomarker of oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. – Clinical Chemistry, 1997. – v.43(7). – p.1209–1214.

27. Palace V. P., Khaper N., Qin Q., Singal P. K. Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance for heart disease // Free Rad. Biol. Med. —1999. — Vol. 26 (5–6). — P. 746–761.

28. Pekiner B. D. Vitamin E as an antioxidant // J. Fac. Pharm. Ankara. — 2003. — ol. 32 (4). — P. 243–267.

29. Ren J, Mozurkewich E. L., Sen A., Vahratian A.M., Ferreri T.J., Morse A.N., Djuric Z.. Total Serum Fatty Acid Analysis by GC-MS: Assay Validation and Serum Sample Stability //Current Pharmaceutical Analysis. – 2013. – Vol. 9. N 4. – P. 331–339.

30. Simopoulos A.P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids // Biomed. Pharmacother. – 2002. – Vol.56, № 8. – P.365–379.