МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ ТА НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ
І. І. МЕЧНИКОВА

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА «ІНСТИТУТ СТОМАТОЛОГІЇ ТА ЩЕЛЕПНО-ЛИЦЕВОЇ ХІРУРГІЇ НАМН УКРАЇНИ»

**О. А. МАКАРЕНКО, Л. М. ХРОМАГІНА, І. В. ХОДАКОВ,
Г. В. МАЙКОВА, Л. М. МУДРИК, В. В. КІКА,
Т. В. МОГІЛЕВСЬКА**

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ СТАНУ КИШЕЧНИКУ ТА КІСТОК У ЛАБОРАТОРНИХ ЩУРІВ

ДОВІДНИК

Одеса – 2022

Рекомендовано до друку
Навчально-методичною радою
ОНУ імені І. І. Мечникова
протокол № 2 від 14.04. 2022 р.
Вченою радою Інституту
стоматології та щелепно-
лицевої хірургії
протокол № 6 від 21.04. 2022 р.

Рецензенти:

Михейцева Ірина Миколаївна – доктор біол. наук, завідувач лабораторії біохімії ДУ «Інститут очних хвороб та тканинної терапії ім. В.П. Філатова НАМН

Гладкій Тетяна Володимирівна – кандидат біол. наук, доцент кафедри фізіології людини та тварин ОНУ імені І. І. Мечникова

Макаренко О.А. та ін.

Методи дослідження стану кишечнику та кісток у лабораторних щурів. Довідник / О. А. Макаренко, Л. М. Хромагіна, І. В. Ходаков, Г. В. Майкова, Л. М. Мудрик, В. В. Кіка, Т. В. Могілевська – Одеса: Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, 2022. – 81 с.

У довіднику надані біохімічні та морфометричні методи визначення загально прийнятих маркерів стану слизової оболонки травного тракту і кісткової тканини лабораторних тварин, а також фізико-математичні методи обчислення складу кісткової тканини тварин. Довідник буде корисний для співробітників медико-біологічних наукових і навчальних закладів, студентів та аспірантів, діяльність котрих пов’язана з дослідженнями дії біологічно-активних речовин на організм лабораторних тварин на тлі моделювання експериментальних патологій.

Контакти для співпраці, навчання та консультацій:
flavan.ua@ gmail.com

УДК: [616.33:616.348]+611.018.4+59.085

© Макаренко О. А., Хромагіна Л.М., Ходаков І. В. та ін., 2022
© Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, 2022
© ДУ «Інститут стоматології та щелепно-лицевої хірургії НАМН», 2022

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

GIP	глюкозозалежний інсулінотропний поліпептид
GLP-1	глюкагонподібний пептид-1
GLP-2	глюкагонподібний пептид-2
GSH	сульфгідрильна форма глутатіону
GS-SG	дисульфід глутатіону до його сульфгідрильної форми
PYY	пептид YY
RANKL	ліганд рецептора-активатора ядерного активатора кВ
SCFA	коротколанцюгові жирні кислоти
TNFα	фактор некрозу пухлини α
Treg	Т-регуляторні клітини імунного відклику
Wnt	внутріклітинний сигнальний шлях
BOC	N-t-BOC-L-alanine-p-nitrophenyl ester
ДТНБК	5,5’-дітіобіс-2-нітробензойна кислота, реактив Елмана
ЕДТА	етилендіамінтетраоцтова кислота
МК	мінеральний компонент кісток
МОК	мінерально-органічний комплекс кісток
ОК	органічний компонент кісток
ПТГ	паратиреоїдний гормон
СА	ступень атрофії
СД	ступень дисбіозу
СМ	ступень мінералізації
СОД	супероксиддисмутаза
ТБК	2-тіобарбітурова кислота
ТХО	трихлороцтова кислота
ЦНС	центральна нервова система

ЗМІСТ

ВСТУП

Сучасний погляд на проблему взаємозв'язку станів травного тракту і кісткової тканини 8

1. Методи дослідження стану кишечника у лабораторних щурів 14

1.1 Дослідження всмоктування глюкози, ароматичних амінокислот, кальцію в ізольованому відрізку тонкої кишки 14

1.1.1 Визначення концентрації глюкози у розчині, вилученому з ізольованої петлі тонкої кишки 16

1.1.2 Визначення концентрації кальцію у розчині, вилученому з ізольованої петлі тонкої кишки 18

1.1.3 Визначення концентрації амінокислот у розчині, вилученому з ізольованої петлі тонкої кишки 20

1.2 Дослідження проникності різних відділів кишечнику за допомогою краски Еванса 22

1.3 Дослідження виділення та засвоєння речовин у щурів за допомогою метаболічних камер 23

1.4 Біохімічні методи визначення маркерів запалення, контамінації умовно-патогенних бактерій, стану антимікробного захисту слизових оболонок травного тракту 25

1.4.1 Препарування слизової оболонки та приготування гомогенатів 25

1.4.2 Визначення активності еластази у слизовій оболонці кишечнику 26

1.4.3 Визначення активності кислої фосфатази у слизовій оболонці кишечника 30

1.4.4 Визначення активності уреази у слизовій оболонці кишечника 33

1.4.5 Визначення активності лізоциму у слизовій оболонці кишечника 36

1.4.6 Визначення ступеню дисбіоза у кишечнику 39

2. Методи дослідження кісток та кісткової тканини у

лабораторних щурів 41
2.1 Морфометричні вимірювання кісток 41
2.1.1 Визначення атрофії альвеолярного відростка щелеп 41
2.1.2 Визначення щільності кісток 42
2.1.3 Визначення вмісту мінерального та органічного компонентів у кістках 46
2.2 Біохімічні методи визначення стану кісткової тканини 49
2.2.1 Приготування гомогенатів кісткової тканини 49
2.2.2 Методи визначення маркерів ремоделювання кісткової тканини 50
2.2.2.1 Визначення активності еластази у кістковій тканині 50
2.2.2.2 Визначення активності кислої та лужної фосфатаз у кістковій тканині 53
2.2.2.3 Визначення вмісту кальцію і фосфору у кістковій тканині 56
2.2.2.3.1 Визначення концентрації неорганічного фосфору в кістковій тканині 58
2.2.2.3.2 Визначення концентрації іонізованого кальцію у кістковій тканині 61
2.2.2.4 Визначення вмісту білка у кістковій тканині 62
2.2.2.5 Визначення індексу мінералізації кісткової тканини 64
2.2.3 Методи визначення маркерів антиоксидантно-прооксидантного стану кісткової тканини 65
2.2.3.1 Визначення активності каталази у кістковій тканині 65
2.2.3.2 Визначення активності супероксиддисмутази у кістковій тканині 67
2.2.3.3 Визначення активності глутатіонпероксидази у кістковій тканині 70
2.2.3.4 Визначення активності глутатіонредуктази у кістковій тканині 74
2.2.3.5 Визначення вмісту малонового діальдегіду 76
2.2.3.6 Визначення вмісту дієнових кон’югатів 79

ВСТУП

У зв'язку із зростаючою кількістю хворих на остеопороз та відсутністю точних патофізіологічних механізмів розвитку патології кісткової тканини виникла ідея складання Довідника при сумісних дослідженнях на кафедрі фізіології людини та тварин Одеського національного університету імені І. І. Мечникова сумісно з лабораторією біохімії Державної установи «Інститут стоматології та щелепно-лицевої хірургії Національної академії медичних наук». Як причина інвалідизації і смертності хворих від переломів кісток остеопороз займає 4-е місце серед неінфекційних захворювань, поступаючись хворобам серцево-судинної системи, онкології і цукровому діабету.

Природа взаємозв'язку фізіології та патофізіології травного тракту з процесами ремоделювання кісткової тканини на даний час залишається не встановленою. Для вирішення цієї проблеми необхідно застосувати доступні морфометричні та біохімічні методи дослідження в експерименті на тваринах особливостей розвитку остеопатій при порушеннях у шлунково-кишковому тракті. Патогенетичне розуміння взаємозв'язку патології травного тракту з метаболічними та структурними порушеннями кісткової системи, зрештою, є важливим для розробки ефективних та безпечних препаратів, здатних протистояти розвитку остеопорозу та інших остеопатій.

Додатковим стимулом до створення представленого Довідника стала відсутність в сучасному інформаційному просторі України докладного опису доступних морфометричних та

біохімічних методів дослідження кісток та шлунково-кишкового тракту експериментальних тварин.

У Довіднику запропоновані методи експериментального дослідження всмоктування та засвоєння поживних речовин, проникності стінок кишечнику, біохімічні методи визначення маркерів запалення, контамінації умовно-патогенних бактерій, антимікробного захисту у слизових оболонках травного тракту лабораторних щурів. Також наведено методи оцінки стану кісткової тканини, особливо визначення маркерів антиоксидантно-прооксидантного статусу кісток. Застосування цих методів досліджень може бути корисним як для експериментального встановлення патогенетичних шляхів розвитку остеопорозу, так і для перевірки ефективності нових остеотропних препаратів.

Довідник призначений для наукових співробітників у галузі фармакології, фізіології та патофізіології, а також для аспірантів і студентів, які займаються науковими дослідженнями.

СУЧАСНИЙ ПОГЛЯД НА ПРОБЛЕМУ ВЗАЄМОЗ'ВЯЗКУ СТАНІВ ТРАВНОГО ТРАКТУ І КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ

Кісткова тканина являється динамічною структурою – постійно відбувається процес ремоделювання, який складається із резорбції та утворення нової кісткової тканини. Баланс цих процесів має вирішальне значення для здоров'я кістки. В останній час з'явилися відомості про вплив стану кишечника на здоров'я кісток. Перш за все, велике значення для кісткової тканини має нутритивний статус, з поганим станом якого пов'язані хронічні запальні захворювання шлунково-кишкового тракту. У свою чергу це викликає затримку засвоєння поживних речовин, важливих для метаболізму кісток. Більш того, мікробіота кишечника відіграє роль в системному запаленні через імунну систему [1].

При хронічному запальному захворюванні шлунково-кишкового тракту рівень всмоктування кальцію і вітаміну D знижується. Ці поживні речовини мають вирішальне значення для підтримки адекватної мінералізації кісток, і організм реагує на їх дефіцит збільшенням секреції паратироїдного гормону (ПТГ). Рецептори ПТГ остеобластів забезпечують посилену передачу сигналів, що призводить до збільшення експресії ліганду рецептора-активатора ядерного активатора кВ (RANKL). Підвищений рівень RANKL стимулює остеокластогенез і призводить до резорбції кісткової тканини щоб підвищити рівень кальцію в сироватці крові для компенсації дефіциту. Однак, якщо абсорбція кальцію обмежена через порушення всмоктування в

кишечнику, цей цикл триватиме. Кістки будуть продовжувати розсмоктуватися, і ремоделювання буде порушене. Таким чином, дефіцит кальцію і вітаміну D може негативно вплинути на мінералізацію кісток [1].

Дослідження на тваринах, у яких є запальне захворювання кишечнику, продемонстрували, що запальні цитокіни, такі як TNFα, IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-11 і IL-17A пов'язані зі зменшенням об’єму кістки і швидкістю утворення кістки. Ці цитлкіни є активаторами остеобластів і, імовірно, діють на остеокласти і їх попередники, сприяючи таким чином резорбції кісток. Крім того, деякі з цих цитокінів можуть пригнічувати диференціювання остеобластів. Подвійні ефекти запалення призводять до значного зниження щільності кісток, що згодом призводить до остеопорозу [2].

Взаємодія між кишечником і кістковою системою також опосередковується гормонами, які секретуються кишечником у відповідь на прийом їжі. В дослідженні [3] показано, що виділення цих гормонів знижує резорбцію кістки і, таким чином, вони є медіаторами адаптації кісток до доступності поживних речовин [3]. Наприклад, глюкагонподібний пептид-2 (GLP-2) пригнічує резорбцію кістки з мінімальним впливом на її формування, що призводить до збільшення мінеральної щільності кістки. GIP (глюкозозалежний інсулінотропний поліпептид) має анаболічну дію на остеобласти і антирезорбтивну дію на остеокласти. Подібну дію на кістки має GLP-1. Інший гормон, пептид YY (PYY), грає роль у втраті кісткової маси [3].

Порушення мікробіому кишечнику є однією з важливих причин розвитку остеопорозу. Відомо, що дисбактеріоз стимулює втрату кісткової маси, а модуляція мікробіоти кишечнику за допомогою пробіотиків та пребіотиків має позитивну місцеву та системну дію. Дослідження в цьому напрямку проводяться для розробки стратегій профілактики остеопорозу через дію на мікробіом. Так, пребіотики запобігають викликану оваріоектомією втрату кісткової маси у експериментальних тварин. В дослідженнях на людях відмічали зменшення втрати кісткової маси у жінок в постменопаузі, хоча механізм дії пребіотиків на кістки залишається невідомим [4]. Тому ще належить провести клінічні дослідження для оцінки ефективності пребіотиків та пробіотиків в запобіганні втрати кісткової маси, пов’язаної з віком та менопаузою у людей.

В дослідженнях на стерильних мишах або при введенні антибіотиків здоровим мишам встановлено підвищення рівня кісткової маси у результаті порушення механізмів, за допомогою яких кишкова мікробіота регулює кісткову тканину [4]. Вплив мікробіому на метаболізм кісток опосередковується шляхом пригнічення остеокластогенезу, що призводить до збільшення кісткової маси [5].

Зв’язок між проникністю кишечника і втратою кісткової маси показано в дослідженнях при розвитку коліту. Підвищення проникності кишечника сприяє проникненню більшого діапазону молекул і патогенів в епітеліальну підслизову оболонку і виникненню запальних реакцій [4]. Припущено, що дисбіоз порушує бар'єрну функцію, що призводить до посилення запалення і активує Т-клітини, що призводить до посилення експресії TNFα в

кістковому мозку. Збільшення TNFα стимулює остеокластогенез та / або посилює апоптоз остеобластів, тим самим порушуючи нормальний гомеостаз кістки, що призводить до втрати кісткової маси. Механізм збільшення кількості активованих Т-клітин в кістковому мозку у відповідь на зміни мікробіоти кишечника до кінця не вивчений. Але активація Т-клітин може відбуватися через те, що кишкові антигени перетинають кишковий бар'єр внаслідок дисбактеріозу [6].

Кишкова мікробіота може покращити стан кісток через збільшення абсорбції кальцію [1]. Вплив мікробіому на всмоктування кальцію регулюється, в основному, коротколанцюговими жирними кислотами (SCFA). SCFA можуть підвищувати абсорбцію кальцію стінкою кишечнику за рахунок зниження pH в кишечнику, тим самим збільшувати кісткову масу [5]. Повідомлялося, що серотонін регулює метаболізм кісток через мікробіом кишечника [5]. Мікробом також є джерелом вітаміну K_2, який необхідний для функції остеокальцину і може впливати на формування кісток, стимулюючи остеобласти. Більш того, викликане антибіотиками зниження рівня вітаміну K_2 через дисбіоз пов'язано зі зниженням остеокальцину і міцності кісток у мишей [7].

Одні із ключових регуляторних метаболітів мікробіоти на кісткову систему – SCFA, які утворюються в результаті бактеріальної ферментації складних вуглеводів. Також джерелом SCFA може бути катаболізм амінокислот і лактату. Основними SCFA є бітурат, пропіонат і ацетат. Дія SCFA на кісткову систему полягає в інгібуванні диференціювання остеокластів, інгібуванні

активності гістонових деацетілаз і стимуляції гістонацетілтрансфераз на ранніх етапах диференціювання остеокластів. Також пропіонат і бітурат здатні викликати метаболічний здвиг в бік збільшення гліколізу в попередниках остеокластів. SCFA ефективно запобігають втраті кісткової маси, викликану оваріектомією [8].

SCFA стимулюють остеобластогенез шляхом активації передачі сигналів (Wnt) в остеобластах. Експериментальні дані свідчать про те, що здатність бітурата стимулювати утворення кістки зумовлена збільшенням кількості Treg ($CD4^+$ Т-клітини) в кістковому мозку. Часткове блокування Treg запобігає збільшенню продукції Wnt10b, індуковане бітуратом. Це відкриття важливе, тому що Wnt10b є ключовим активатором передачі сигналів Wnt в стромальних клітинах і остеобластах [8, 9, 10].

У серії досліджень група Pacifici продемонструвала, що стимулювання продукції бутирата при введенні лактобацил або пряме додавання бутирата мишам сприяло утворенню кісткової тканини за рахунок збільшення експресії остеогенного ліганда Wnt Wnt10b Treg-клітинами кістковому мозку [7].

Група фахівців Pacific, що вивчала роль імунних клітин кишечника в ремоделюванні кісток при гіперпаратиреозі, продемонструвала, що у мишей з мікробіомом, збагаченим сегментованими нитчастими бактеріями, ПТГ збільшує популяцію кишкових клітин Т-хелпери 17, які виходять з кишечника в кровотік, мігрують в кістковий мозок і викликають деградацію кісток [7].

Отже, стан кишечнику, а саме його мікробіота, ступень засвоєння поживних речовин та відсутність запалення грає значну роль в підтриманні здоров'я кісток. Тому розробка стратегій лікування остеопорозу через нормалізацію стану кишечнику є багатообіцяючою альтернативою сучасним остеотропним препаратам.

Література

1. Epsley S., Tadros S., Farid A., Kargilis D., Mehta S., Rajapakse C. S. The Effect of Inflammation on Bone // Front Physiol. – 2021. – Jan 5. Vol. 11, Article 511799. – P. 1-14. doi: 10.3389/fphys.2020.511799.
2. Collins F.L., Schepper J.D., Rios-Arce N.D., Steury M.D., Kang H.J., Mallin H., Schoenherr D., Camfield G., Chishti S., McCabe L.R., Parameswaran N. Immunology of Gut-Bone Signaling // Adv Exp Med Biol. – 2017. – Vol.1033. – P. 59-94. doi: 10.1007/978-3-319-66653-2-5.
3. Schiellerup S.P., Skov-Jeppesen K., Windeløv J.A., Svane M.S., Holst J.J., Hartmann B., Rosenkilde M.M. Gut Hormones and Their Effect on Bone Metabolism. Potential Drug Therapies in Future Osteoporosis Treatment // Front Endocrinol (Lausanne). – 2019. – Feb26; Vol.10, Article 75, P. 1-13. doi: 10.3389/fendo.2019.00075.
4. Pacifici R. Bone Remodeling and the Microbiome // Cold Spring Harb Perspect Med. – 2018. – Apr 2, 8(4). – P. a031203. doi: 10.1101/cshperspect.a031203.
5. Ding K. , Hua F., Ding W. Gut Microbiome and Osteoporosis // Aging Dis. – 2020. – Vol. 11(2). – P. 438-447. doi: 10.14336/AD.2019.0523.
6. Rios-Arce N.D., Collins F.L., Schepper J.D., Steury M.D., Raehtz S., Mallin H., Schoenherr D.T., Parameswaran N., McCabe L.R.. Epithelial Barrier Function in Gut-Bone Signaling // Adv Exp Med Biol. – 2017. – Vol.1033. – P. 151-183. doi: 10.1007/978-3-319-66653-2_8.
7. Cooney O.D., Nagareddy P.R., Murphy A.J., Lee M.K.S. Healthy Gut, Healthy Bones: Targeting the Gut Microbiome to Promote Bone Health // Front Endocrinol (Lausanne). – 2021. – Vol.11, Article 620466. – P. 1-7. doi: 10.3389/fendo.2020.620466.
8. Zaiss M.M., Jones R.M., Schett G., Pacifici R. The gut-bone axis: how bacterial metabolites bridge the distance // J Clin Invest. – 2019. – Vol.129(8). – P. 3018-3028. doi: 10.1172/JCI128521.
9. Li J.Y., Yu M., Pal S., Tyagi A.M., Dar H., Adams J., Weitzmann M.N., Jones R.M., Pacifici R. Parathyroid hormone-dependent bone formation requires butyrate production by intestinal microbiota // J Clin Invest. – 2020. – Vol. 130(4). – P. 1767-1781. doi: 10.1172/JCI133473.
10. Pacifici R. Role of Gut Microbiota in the Skeletal Response to PTH // J Clin Endocrinol Metab. – 2021. – Vol.106(3). – P. 636-645. doi: 10.1210/clinem/dgaa895.

1. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ СТАНУ КИШЕЧНИКУ У ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИН

Роботу з тваринами необхідно проводити згідно з Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 1759-VI від 15.12.2009 р.) з урахуванням правил Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях.

1.1. Дослідження всмоктування глюкози, ароматичних амінокислот, кальцію в ізольованому відризку тонкої кишки

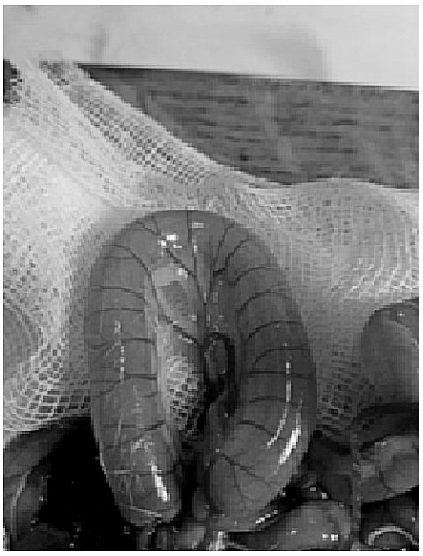
Методика дослідів для дослідження механізмів всмоктування речовин (глюкози) *in vivo* в тонкій кишці щурів в умовах, близьких до фізіологічних, розроблена Уголєвим та Заріповим [1].

Хід роботи

Піддослідну тварину (щура) наркотизують тіопенталом натрію у дозі 20 мг/кг. Наркотизовану тварину фіксують на спеціальній дощечці, прив'язавши лапи бинтами. Зафіксованої тварині роблять розтин по середній лінії черевця таким чином, щоб був вільний доступ до петель порожньої кишки. На порожній кишці лігатурами ізолюють ділянку довжиною 5 см зі збереженням судин, що кровопостачають цю ділянку (рис.1).

За допомогою шприца в ізольований відрізок вводять 1-1,5 мл розчину, всмоктування якого досліджується (7 % розчину глюкози, 0,05-0,07 % хлориду кальцію (0,18-0,25 мг кальцію / мл), 0,25 % розчину ароматичних амінокислот (фенілаланіну, тирозину, триптофану)). Ізольовану петлю кишечника занурюють у черевну порожнину та залишають на 30-60 хвилин для проходження

процесу всмоктування. По досягненню часу вилучають рідину з ізольованої ділянки в приготовлену заздалегідь ємкість, та виміряють об’єм рідини піпеткою.



А Б

Рисунок 1. Витяг кишечника з черевної порожнини (А) та ізолюваний відрізок тонкої кишки щура, заповнений розчином досліджуваної речовини (Б)

Визначають концентрацію сполуки, яка досліджувалася у розчині, що був вилучений з ізольованої ділянки порожньої кишки за відповідними методиками. Для перерахунку кількості речовини, що залишилася у делянці кишки, об'єм множать на концентрацію і отримують кількість речовини, що невсмокталася (А). Одночасно визначають концентрацію сполуки в розчині, який вводився в ділянку ізольованої кишки, множать її на об'єм (А1). Кількість речовини, що всмокталася, розраховують за формулою:

$$A2 = A1 - A$$

де:

А2 – кількість речовини, що всмокталася в мг, молях;

А1 – кількість речовини, що вводили у ділянку ізольованої кишки, в мг, молях;

А – кількість речовини, що залишилася у ізольованої кишці, в мг, молях.

Література

1.Уголев А.М. Методические приемы для изучения мембранного пищеварения и всасывания в тонкой кишке в условиях хронического эксперимента на крысах и некоторых других животных / А.М. Уголев, Б.З. Зарипов // Физиологический журнал СССР. – 1979. – № 12. – С. 1850–1854.

1.1.1. Визначення концентрації глюкози у розчині, вилученому з ізольованої петлі кишечника

Для визначення кількості глюкози використовують глюкозооксидазний метод.

Принцип методу

Глюкооксидаза каталізує окислення глюкози до глюконової кислоти та перекису водню. Перекис водню (H_2O_2) в присутності пероксидази вступає в реакцію з фенолом і 4-амінофеназоном з утворенням забарвленого хініноміну, який визначають спектрофотометрично. Інтенсивність забарвлення пропорційна концентрації глюкози в досліджуваному зразку [1, 2].

Реактиви

1. Ензими (розчин)

- пероксидаза (2200±220) U/л;
- β,D-глюкозооксидаза (18000±1800) U/л;
- 4-амінофеназон (110±11) мг/л
- стабілізатори, активатори.

2. Буферний розчин

- фосфатний буфер (pH 7,2- 7,4) (0,10±0,01) моль/л;

-фенол (190±19) мг/л;

- стабілізатори.

3. Калібрувальний розчин глюкози (10,0±0,5) ммоль/л

Хід визначення

Аналіз проводять за схемою, наведеною в таблиці.

Таблиця

Відміряти у пробірку, мл	Калібрувальна або дослідна проба, мл	Холоста проба, мл
Калібрувальний або аналізуємий розчин	0,02	2,00
Фізіологічний розчин	–	0,02
Буферний розчин	1,0	1,0
Ензими	1,0	1,0

Всі компоненти перемішують, витримують 20 хв. при кімнатній температурі (від плюс 18^0С до плюс 25^0С), або 12 хв при температурі 37ºС у водяному термостаті, або автоматичній водяній бані.

Оптичну щільність калібрувальної та дослідної проби проти холостої проби вимірюють на спектрофотометрі при довжині хвилі 550 нм в діапазоні 0–1,0 од. опт. щільності та довжині оптичного шляху в кюветі 5 мм або 10 мм. Забарвлення стійке протягом 1 години.

Розрахунок

$$C = \frac{E_{\text{дослід}}}{E_{\text{каліб}}} \cdot K \cdot 10$$

де:

С – концентрація глюкози в дослідній пробі, ммоль/л (мг/дкл);

10 – концентрація глюкози в калібрувальному розчині, ммоль/л ;

$E_{дослід}$ – оптична щільність дослідної проби, од. опт. щільності;

$E_{каліб}$ – оптична щільність калібрувальної проби, од. опт. щільності;

К – коефіцієнт розведення.

Література

1. Справочник по клинической химии / Под ред. В.Г. Колба // Минск: Беларусь. – 1976. – С. 144-117.
2. Hyvärinen A., Nikkilä E.A. Specific determination of blood glucose with o-toluidine // Clinica Chimica Acta. – 1962. – v.7(1). – P. 140-143.

1.1.2. Визначення концентрації кальцію у розчині, вилученому з ізольованої петлі кишечника

Для забезпечення всмоктування кальцію попередньо готують його іонізовану форму. Для цього 1 г цитрату кальцію піддають гідролізу 25 мл 0,1N HCl протягом 2 години при температурі 37^{o} С у термостаті. Потім доводять pH розчину до 7,0 0,1N бікарбонатним буфером pH 9,0. Отриманий розчин розводять у 4 рази 0,1N бікарбонатним буфером та використовують для введення в кишку щурів.

Принцип методу

Кальцій з Арсеназо III утворює забарвлений комплекс, який можна виміряти спектрофотометрично.

Реактиви

1. Арсеназний реагент:

- арсеназо III – (0,20 ±0,01) ммоль /л;

- 8-оксихінолін – (20,0± 0,2) ммоль /л;

- активатори.

2. Калібрувальний розчин кальцію: (2,50±0,05) ммоль/л або (10,0±0,2) мг %.

Хід визначення

Аналіз проводять у відповідності зі схемою, наведеною в таблиці.

Таблиця

Відміряти в пробірку, мл	Холоста проба, мл	Калібрувальна проба, мл	Дослідна проба, мл
Арсеназний реагент	1,00	1,00	1,00
Біологічна рідина	-	-	0,01
Калібрувальний розчин	-	0,01	-
Дистильована вода	0,01	-	-

Всі компоненти змішують і витримують (2,0±0,5) хв при кімнатній температурі (від плюс 20^0С до плюс 25^0С).

Оптичну щільність калібрувальної та дослідної проби проти холостої проби вимірюють на спектрофотометрі при довжині хвилі 650 нм в діапазоні 0–1,0 од.опт. щільності та довжині оптичного шляху в кюветі 5 мм або 10 мм. Забарвлення стійке протягом 60±5 хв.

Розрахунок

$$C = E_{дослід}/E_{каліб} \times 2,5,$$

де:

2,5 – концентрація кальцію в калібрувальному розчинні, ммоль/л;

$E_{дослід}$ – оптична щільність дослідної проби, од. опт. щільності;

$E_{каліб}$ – оптична щільність калібрувальної проби, од. опт. щільності;

С – концентрація кальцію в дослідній пробі, ммоль/л.

Література

Горячковский О. М. Клінічна біохімія в лабораторній діагностиці: Довідковий посібник. – Одеса: Екологія, 2005. – 616 с.

1.1.3. Визначення концентрації амінокислот у розчині, вилученому з ізольованої петлі кишечника

Принцип методу

Спосіб визначення сумарного вмісту ароматичних амінокислот (тирозин, триптофан, фенілаланін, у меншому ступеню цистеїн) колориметричним методом з використанням реактиву Фолина-Чокалтеу заснований на тому, що фосфовольфрамова і фосфомолібденова кислоти, які містяться в реактиві, при відновленні ароматичними амінокислотами в лужному середовищі утворюють комплекс синього кольору (вольфрамова синь), інтенсивність забарвлення якого пропорційна кількості амінокислот [1, 2].

Реактиви

1. Реактив А: 20 г карбонату натрію (Na_2CO_3) і 4 г гідроксиду натрію розчиняють у 1 л дистильованої води.

2. Реактив Фоліна-Чокальтеу: 10 мл реактиву змішують з 10 мл дистильованої води.

3. Стандартний розчин: 36,2 мг тирозину розчиняють у 10 мл дистильованої води. До 1 мл розчину додають 49 мл води.

Хід визначення

До 0,2 мл досліджуваного розчину додають 2,0 мл реактиву А, перемішують, потім додають 0,2 мл реактиву Фоліна-Чокальтеу. Перемішують. В стандартну пробу замість досліджуваного зразка вносять 0,2 мл стандартного розчину, в холосту пробу – 0,2 мл води.

Усі проби інкубують 30 хв при кімнатній температурі. Оптичну щільність дослідних проб проти холостої проби вимірюють на спектрофотометрі при довжині хвилі 750 нм в діапазоні 0–1,0 од.опт. щільності та довжині оптичного шляху в кюветі 5 мм або 10 мм. Забарвлення стабільне впродовж 60 хв.

Розрахунок

$$C = \frac{E_{\text{дослід}}}{E_{\text{станд}}} \cdot C_0$$

де:

С – концентрація амінокислот в дослідній пробі, мг/мл;

C_0 – концентрація амінокислот в стандартному зразку, мг/мл;

$E_{\text{дослід}}$ – оптична щільність дослідної проби, од. опт. щільності;

$E_{\text{станд}}$ – оптична щільність стандартної проби, од. опт. щільності.

Література

1. Руководство к лабораторным занятиям по биологической химии / Е.Г. Доркина [и др.]. – Пятигорск, 2013. –120 с.

2. Горячковский О. М. Клінічна біохімія в лабораторній діагностиці: Довідковий посібник. – Одеса: Екологія, 2005. – 616 с.

1.2. Дослідження проникності різних відділів кишечнику за допомогою краски Еванса

Для оцінки проникності тонкого кишечнику у щурів використовують фарбник Еванса (Evans Blue, Германия). Проникність оцінюють за кількістю дифундованої фарби у інкубаційний розчин [1].

У наркотизованих тіопенталом натрію щурів виділяють за допомогою лігатур ділянку тонкого кишечнику довжиною 7-8 см. У ізольований відрізок кишечника вводять 0,001% фарбу Еванса на 0,9 % фізіологічному розчині.

Відрізок тонкої кишки щура поміщають у скляний стакан об'ємом 50 мл з інкубаційним середовищем (0,9 % фізіологічний розчин) та ставлять на інкубацію у термостат на 60 хв. при температурі 37 °С. Через 60 хв. з розчину, у який був поміщений ізольований сегмент кишечника, відбирають 0,5 мл розчину для визначення ступеня проникності стінок кишечника за показниками в ньому оптичної щільності дифундованої фарби.

Оптичну щільність вихідної та дослідної проб вимірюють на спектрофотометрі при довжині хвилі 620 нм в діапазоні 0–1,0 од.опт. щільності та довжині оптичного шляху в кюветі 5 мм або 10 мм.

Розрахунок

$$C = E_{дослід}/E_{станд} \times 1,0$$

де:

1,0 – концентрація фарби Еванса в розчинні, мкг/мл;

$E_{дослід}$ – оптична щільність дослідної проби, од. опт. щільності;

$E_{станд}$ – оптична щільність вихідної проби, од. опт. щільності;

С – концентрація дифундованої фарби, мкг/мл.

Кількість фарби в рідині виражають в мкг/мл.

Література

1. Голота Ю. В. Біохімічні показники стану кишкового бар'єру у віддалені терміни після введення цефтриаксону. Автореферат дис. канд. біол. наук. – Київ, 2017. – 20 с.

1.3. Дослідження виділення та засвоєння речовин у щурів за допомогою метаболічних камер

Для дослідження кількості надходження та виведення дослідних речовин з організму щурів використовують метаболічні камери, за допомогою яких контролюють вживання щурами їжі, води, препаратів, що містять дослідні речовини, кількість кала та сечі. Принципова схема метаболічної камери наведена на рисунку 2.

У годівницю кладуть їжу, яку попередньо зважують, з урахуванням добової норми для дослідної групи щурів з урахуванням віку тварин. Вхідний отвір годівниці має бути таким, щоб щури просовували в годівницю тільки голову і не мали змоги лапами витягувати корм. Їжу у годівницю кладуть змелену, щоб щури не витягували з годівниці шматочки їжі і не забруднювали ними кал та сечу. Через добу залишки їжі в годівниці зважують та відбирають від них наважку вагою 5 г для подальшого визначення в їжі кількості дослідної речовини.

Перед відбором кала та сечі щура переміщують у чисту пусту клітку без підстилкового матеріалу, їжі та води.

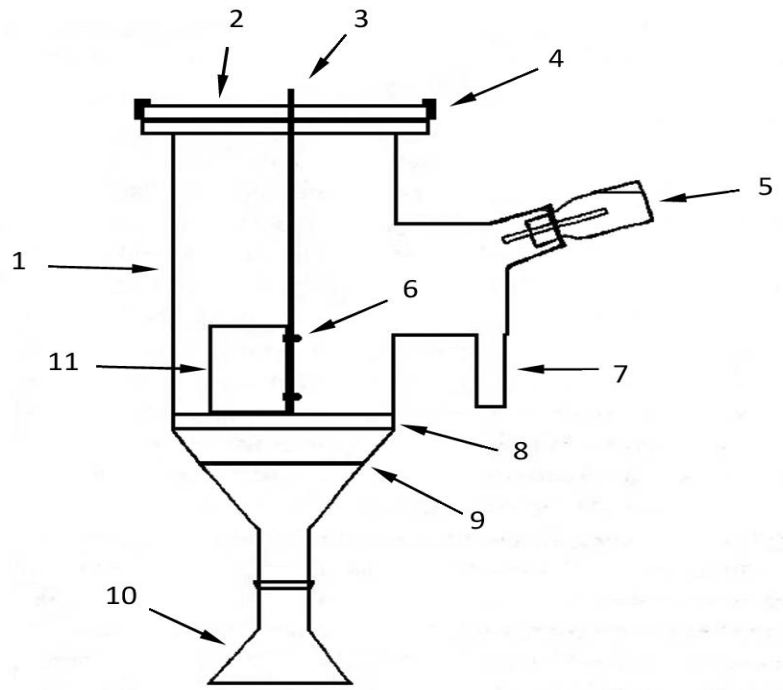


Рисунок 2. Метаболічна камера для збору сечі та калу щурів [1].

1 – скляна камера
2 – перфорована кришка
3 – штир для фіксації перфорованої підлоги
4 – гумове кільце для фіксації перфорованої кришки
5 – поїлка
6 – фіксатори годівниці
7 – відведення втраченої з напувалки води
8 – перфорована підлога для щурів
9 – сітка для затримки калу
10 – знімна колба для збору сечі
11 – годівниця

Добову сечу відбирають із колби для забору сечі, яка знаходиться у нижній частині камери (рис. 2). Перед відбором сечі сухі залишки сечі на склі метаболічної камери змивають дистильовано водою відомого об’єму в колбу для забору сечі. Визначають кількість сечі мірним циліндром, відбирають 1 мл для подальшого визначення вмісту дослідної речовини в сечі з урахуванням води, якою змивали залишки сечі із скла.

Поїлку в метаболічну камеру встановлюють таким чином, щоб вода з неї у разі капання не додавалася до рідини в колбі для забору сечі.

Добовий кал весь збирають з сітки, яка знаходиться під перфорованою підлогою метаболічної камери (рис. 2). Кал розміщують на фільтрувальному папері та висушують у сушильній шафі при 65^{o}С до постійної ваги. Сухий кал зважують та відбирають від нього наважку 1 г для подальшого визначення вмісту дослідної речовини в калі.

Дослід проводять впродовж 3-7 діб. Після збору калу і сечі камеру ретельно миють миючими засобами та дезинфікують, обполіскують дистильованою водою та висушують.

Всі щоденні маніпуляції над щурами при обслуговуванні метаболічних камер повинні бути однотипними по дії та тривалості, щоб не викликати у щурів раптового почуття тривоги.

Література

1. Левицкий А.П., Макаренко О.А.,Деньга О.В., Сукманский О.И., Подорожная Р.П., Россаханова Л.Н., Ходаков И.В., Зеленина Ю.В. Экспериментальные методы исследования стимуляции остеогенеза. Метод. рекомендации – Киев: «Авиценна», 2005. – С. 41-43.

1.4. Біохімічні методи визначення маркерів запалення, контамінації умовно-патогенних бактерій, стану антимікробного захисту слизових оболонок травного тракту

1.4.1. Препарування слизової оболонки та приготування гомогенатів

Виділення слизових оболонок різних відділів кишечнику, в залежності від завдань експерименту, проводять після виведення

тварин з експерименту, яке здійснюють під тіопенталовим наркозом (доза тіопенталу – 40 мг/кг маси щура). Для цього відрізають ділянку тонкої або товстої кишки довжиною 20 см, ретельно промивають водою за допомогою шприца, потім акуратно відокремлюють слизову оболонку шляхом її вичавлення за допомогою скальпеля, яким, утримуючи один кінець виділеного фрагменту кишки, проводять вздовж кишки. Виділену слизову оболонку поміщають у попередньо марковані чашки Петрі і зберігають при – 20^{o}С.

Для приготування гомогенатів тканини розморожують, зважують і гомогенізують в 0,05 М трис-HCl буфері рН 7,6 з розрахунку 50 мг тканини на 1 мл буфера. Гомогенізацію можна здійснювати вручну в порцелянових ступках, розташованих на заморожених акумуляторах холоду. Гомогенати при постійному помішуванні витримують 30 хв в холодильнику, потім центрифугують при 2500 об/хв і +4˚С протягом 15 хв. Супернатант переносять в чисті пробірки або флакони і використовують для біохімічного аналізу. Невикористані гомогенати для подальших визначень зберігають в холодильнику не більше трьох діб.

1.4.2. Визначення активності еластази у слизовій оболонці кишечнику

Еластаза (КФ 3.4.21.36 і 37) відноситься до групи серинових лізосомальних протеїназ, які мають у активному центрі серин і каталізують протеоліз білків на складові α-амінокислоти. Еластаза проявляє специфічність до пептидних зв’язків аланіну, лейцину, валіну, метіоніну і розщеплює їх у білках та пептидах. На відміну

від інших протеолітичних ферментів здатна розщеплювати еластин, що входить до складу сполучної тканини. Це глюкопротеїд, що містить біля 23 % вуглеводних компонентів, складається з одного поліпептидного ланцюжка (218 амінокислот) з молекулярною масою 28-29 кДа та оптимумом pH 7,0-7,5. Еластаза має широкий спектр дії щодо білків і гідролізує крім еластину протеоглікани, гемоглобін, фібриноген, казеїн, неспиральні кінцеві ділянки колагену I, II, III, IV типів, білки системи комплементу (C-1s, C4, C2, C3, C5, C9), імуноглобуліни M, G, антитромбін III, α_1- і α_2-інгібітор плазміну та інші [1, 2, 3]. Еластаза також приймає участь у розщеплені білків клітинних оболонок бактерій і в деструкції їх білків.

Рівень активності еластази слизових оболонок кишечника може пов'язуватися з порушенням функціонування травного тракту і пошкодженням клітин слизових оболонок при різних експериментальних патологіях, що приводять до підвищення вивільнення цього ферменту з лізосом.

Принцип методу

Визначення активності еластази у гомогенатах слизових оболонок травного тракту ґрунтується на здатності еластази здійснювати гідроліз синтетичного субстрату N-t-BOC-L-alanine-p-nitrophenyl ester (BOC) за методом Visser et Blouf [4]. Під дією еластази від субстрату відщеплюється n-нітрофенол жовтого забарвлення, інтенсивність якого пропорційна активності еластази.

Реактиви

1. 0,05 М фосфатний буфер, pH 6,5:

   а) 0,2 М $Na_2 HPO_4$ (б/в) – 2841 г до 100 мл д.H_2O;

б) 0,2 М Na H_2PO_4 (б/в) – 4,80 г до 200 мл д.H_2O д.H_2O;

в) 60 мл 0,2 М Na_2 HPO_4(а) + 140 мл 0,2 М Na H_2PO_4 (б) довести до 800 мл. Перевірити pH на pH-метрі та довести до 6,5.

2. Субстрат готують безпосередньо перед використанням: 3,1 мг BOC розчиняють в 1 мл ацетонітрилу. Працюють з субстратом в ацетонітрилі тільки скляною піпеткою.

3. Калібрувальні розчини n-нітрофенолу: 69,6 мг n-нітрофенолу розчиняють у 100 мл 0,02 н NaOH. 10 мл цього розчину розчиняють в 1000 мл 0,02 N NaOH. Зі стандартного розчину готують розчини у наступному розведенні:

1) 1 мл вихідного розчину + 10,1 мл 0,02 н NaOH (0,05 мкМ);
2) 2 мл вихідного розчину + 9,1 мл 0,02 н NaOH (0,10 мкМ);
3) 3 мл вихідного розчину + 8,1 мл 0,02 н NaOH (0,15 мкМ);
4) 5 мл вихідного розчину + 6,1 мл 0,02 н NaOH (0,25 мкМ);
5) 7 мл вихідного розчину + 4,1 мл 0,02 н NaOH (0,35 мкМ).

Вимірюють показники екстинкцію калібрувальніх розчинів на спектрофотометрі при довжині хвилі 347,5 нм для формування калібрувального графику. Обчислюють середній коефіцієнт К для визначення вмісту n-нітрофенолу по показникам екстинції дослідних проб.

Хід визначення

Гомогенати тканини готують, як вказано в 1.4.1 цього довідника.

У скляні пробірки вносять по 1,9 мл 0,05 М фосфатного буфера pH 6,5, додають 1 мл гомогенату тканини. Пробірки розміщують у водяній бані з температурою + 25 ˚С на 10-15 хв.

Після цього в пробірку скляною піпеткою вносять 0,1 мл розчину субстрату ВОС, швидко перемішують і вимірюють екстинкцію на нульовій і на 5-ій хвилинах.

Оптичну щільність всіх розчинів вимірюють на спектрофотометрі проти 0,05 М фосфатного буфера рН 6,5 при довжині хвилі 347,5 нм в діапазоні 0–1,0 од.опт. щільності та довжині оптичного шляху в кюветі 5 мм або 10 мм.

Паралельно ставлять контроль на спонтанний гідроліз ВОС, в якому 1 мл гомогенату замінюють на 0,9 % фізіологічний розчин.

Розрахунок

$$A = \frac{((E_5 - E_0) - E) \cdot n \cdot 1000}{1{,}0 \cdot K \cdot 300 \cdot m}$$

де:

А – активність ферменту в мк-кат на 1 кг слизової оболонки;

E_5 – екстинкція на 5-ій хвилині, од. опт. щільності;

E_0 – екстинкція на 0-ій хвилині, од. опт. щільності;

Е – контроль на ВОС, од. опт. щільності;

n – розведення проби;

m – маса слизової оболонки кишечнику в грамах в 1 мл гомогенату;

1000 – перерахунок мл на літр або грам на кг;

1,0 – об’єм речовини в мл;

К – коефіцієнт перерахунку величини екстинкції в концентрацію n-нітрофенолу;

300 – час інкубації, в секундах.

Активність еластази розраховують в мікрокаталах на кг слизової оболонки шлунку або тонкої кишки, де 1 катал – це активність еластази, що каталізує відщеплення 1молю n-нітрофенолу за 1 секунду.

Література

1. Біць Ю.В., Досенко В.Є. Роль еластази та її інгібіторів у патогенезі артеріосклерозу // Проблемы медицины. – 1999.– № 9–10. – С. 10-17.
2. Веремеенко К.Н., Голобородько О.П., Кизим А.Й. Протеолиз в норме и при патологии. – Київ: Здоров'я, 1998. – 199 с.
3. Сологуб Л.І., Пашковська І.С., Антоняк Г.Л. Протеази клітин та їх функції. – Київ: Наукова думка,1992. – 194 с.
4. VisserL., Blouf E.R. The use of p-nitrophenyl-N-tert-butyl-oxy-carbonyl-L-alaninate as substrate for elastase // Biochem. of Biophys. Acta. – 1972. – v. 268. – № 1. – P. 275-280.

1.4.3. Визначення активності кислої фосфатази у слизовій оболонці кишечнику

Кисла фосфатаза (кисла фосфомоноестераза, КФ 3.1.3.2) належить до сімейства двоядрових металогідраз с центром Fe^{3+}–Zn^{2+} в якості активного сайту, має довжину 35–50 кДа. Фермент від'єднує фосфорильні групи від молекул-субстратів. Міститься в лізосомах і функціонує при злитті лізосом з ендосомами або при порушеннях цілісності мембран лізосом. Кислотний pH-оптимум фермента – від 4 до 5. Одним із проявів патологічних процесів є зміна або пошкодження мембранних структур, порушення проникності їх для іонів. Особливо небезпечним при патологіях є порушеннях цілісності мембран лізосом, в яких міститься значна кількість різних деструктивних ферментів, в том числі й кисла фосфатаза. Розвиток запалення в слизових оболонках травного тракту, як правило, супроводжується різким підвищенням

активності цього лізосомального ферменту у тканинах, які досліджують, та ротовій рідині.

Принцип методу

Активність кислої фосфатази визначають по інтенсивності забарвлення дослідної рідини внаслідок гідроліза субстрату п-нітрофенілфосфата методом Бессея-Лоурі-Брока [1, 2]. Під впливом фосфатаз від субстрату відщеплюється п-нітрофенол, що має в лужному середовищі жовтий колір. Інтенсивність отриманного забарвлення пропорційна активності ферменту.

Реактиви

1. Субстрат п-нітрофенілфосфат pH 4,8: 0,41 г лимонної кислоти, 1,125 г лимоннокислого натрію та 165 мг n-нітрофенілфосфату розчиняють в 100 мл дистильованої води, визначають pH. Субстрат зберігають в холодильнику, в морозильній камері, в пластмасовій посуді.

2. 0,05 N NaOH: 2 г NaOH розчинять у 1000 мл дистильованої води.

3. Калібрувальні розчини n-нітрофенолу (див. стор. 28)

Хід визначення

Гомогенати тканини готують як вказано в 1.4.1 цього довідника.

У пробірки розливають по 0,4 мл субстрату, додають по 0,1 мл дослідної рідини (за секундоміром) і поміщають в термостат при температурі 37˚С на 30 хвилин. На кожну пробу ставлять контроль: до 0,4 мл субстрату додають 5,0 мл 0,05 н NaOH, потім 0,1 мл дослідної рідини. Контроль не інкубують. Реакцію зупиняють додаванням 5,0 мл 0,05 NaOH строго за секундоміром.

Оптичну щільність контрольної та дослідної проби вимірюють на спектрофотометрі при довжині хвилі 400 нм в діапазоні 0–1,0 од.опт. щільності та довжині оптичного шляху в кюветі 5 мм або 10 мм.

Активність ферментів виражають в мікрокаталах на 1 кг тканини (мк-кат/кг), де за 1 катал беруть активність ферменту, здатну утворити 1 моль п-нітрофенолу.

Розрахунок

$$A = \frac{\Delta E \cdot n \cdot 1000}{K \cdot T \cdot M \cdot V}$$

де:

A – активність ферменту, мк-кат на 1 г тканини;

ΔЕ – різниця екстинкції між контрольною та дослідною пробами, од. опт. щільності;

n – розведення ферментного розчину;

1000 – коефіцієнт перерахунку на літр;

K – коефіцієнт перерахунку екстинкції на кількість кінцевого продукту реакції (п-нітрофенолу);

T – час інкубації, сек.;

V – об’єм дослідної рідини, мл;

M – маса тканин в грамах в 1 мл гомогената.

Література

1. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотгицкая Р.П. Под ред. Меньшикова В.В. – Москва: Медицина, 1987. – С. 205-209.

2. Bergmeyer H.U. Methoden der enzymatischen Analyse. – Verlag Chemie Weinheim, 1974. – P. 528-529.

1.4.4. Визначення активності уреази у слизовій оболонці кишечнику

Уреаза (карбамід-аміногідролаза, КФ.3.5.1.5) – гідролітичний фермент з групи амідаз, який має властивість каталізувати гідролітичне розщеплення сечовини на вуглекислоту та аміак. Фермент являє собою мультимерний ензим з молекулярною масою 380 ± 30 дальтон. Нативний протеїн утворюється 2-ма структурними субодиницями Ure A (26,5 кД) и Ure B (60,3 кД) та 5-ма додатковими протеїнами Ure I, Ure E, Ure F, Ure G, Ure H, які мають іон нікелю Ni^{2+}, наявність котрого необхідно для оптимальної активності активного центру апофермента. В організмі людини і хребетних тварин уреаза не синтезується, а її присутність обумовлюється синтезом бактеріальної складової мікробіоти організмів. Уреазу продукують наступні мікроорганізми: *Helicobacter pylori*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*, *Providencia rettgeri*, *Providencia stuartii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus vulgaris* та ін.. Тому підвищення активності цього ферменту може свідчити про зростання долі условно-патогенних бактерій у мікробіоті, тобто про розвиток і ступень дисбіозу.

Компоненти їжі, за винятком сирих бобових, не впливають на активність уреази, яка повністю залежить від чисельності мікробів у слизовій оболонці кишки. Порівнюючи активність уреази у здорових та хворих тварин роблять висновки про те, підвищена або, навпаки, знижена чисельність умовно-патогенної мікробіоти у слизовій оболонці кишки.

Принцип методу

Визначення активнсті уреази засноване на здатності цього ферменту розщеплювати сечовину до аміаку, який з реактивом Неслера дає жовте забарвлення. Інтенсивність забарвлення проби прямо пропорційна активності уреази в гомогенаті [1, 2, 3, 4].

Реактиви

1. 0,1 М розчин сечовини: 6 г CH_4ON_2 до 1000 мл д.води.

2. Стандартний розчин NH_4Cl для калібрувального графіка (0,555 мкмолей NH_4/мл). Приготування:

– 0,787 г NH_4Cl розчиняють у бідистильованій воді та доводять до 0,5 л;

– 2 мл стандартного розчину доводять до 100 мл бідистильованої води.

3. Реактив Неслера.

Хід визначення

Гомогенати тканин готують як вказано в 1.4.1 цього довідника.

Розливають в пробірки по 0,4 мл розчину сечовини, потім додають 0,2 мл гомогенату, ретельно перемішують і поміщають у термостат на інкубацію на 1 годину при 37°С. Через 1 годину пробірки виймають з термостату, додають 4,4 мл дистильованої води і 1 мл реактиву Неслера. Паралельно готують контрольні проби на реактиви на кожен зразок: 4,4 мл води + 0,4 мл розчину сечовини + 1 мл реактиву Неслера + 0,2 мл гомогенату. Контрольні проби на інкубацію не ставлять. Усі проби, контрольні і дослідні, центрифугують 20 хвилин при 2500 об/хв.

Оптичну щільність дослідних проб проти контролю на реактиви вимірюють на спектрофотометрі при довжині хвилі 440 нм в діапазоні 0–1,0 од.опт. щільності та довжині оптичного шляху в кюветі 5 мм або 10 мм.

Розрахунок

$$A = \frac{(E_{\text{досл}} - E_{\text{контр}}) \cdot 1000}{K \cdot 3600 \cdot 0{,}2 \cdot m}$$

де:

А – активність уреази в мккат/кг;

$E_{досл}$ – екстинкції дослідної проби, од.опт. щільн.;

$E_{контр}$ – екстинкції контрольної проби, од. опт. щільн.;

1000 – перерахунок на 1 кг тканини;

К – коефіцієнт перерахунку екстинкції в мкмолі NH_4;

m – маса слизової оболонки кишечнику в грамах в 1 мл гомогенату;

3600 – 1 час в секундах;

0,2 – об’єм біологічного розчину, мл

Активність уреази виражають в мікрокаталах на кг слизової оболонки шлунку або тонкої кишки, де 1 катал – це активність ферменту, що каталізує відщеплення 1 молю аміаку за 1 секунду.

Література

1. Гаврилова Л.М., Сегень И.Т. Уреазная активность ротово тполости у больных с острой и одонтогенной инфекцией челюстно-лицевой области // Стоматология. – 1996. – Спец. выпуск. – С. 49-50.

2. Храмов В.А., Гаврилова Л.М. Определение уролитической и гликолитической активности ротовой жидкости человека // Стоматология . – 1996. – т.35. – № 3. – С. 7-9.

3. Murakami M., Yoo J.K., Teramura S. et al. Generation of ammonia and mucosal lesion formation following hydrolysis of urea by urease in the rat stomach // J. Clin. Gastroenterol. – 1990. – № 12 (Suppl 1). – P. 104-109.

1.4.5. Визначення активності лізоциму у слизовій оболонці кишечнику

Лізоцим (мурамідаза, N-ацетилмурамідкліканг ідролаза, КФ 3.2.1.17) – фермент, який відноситься до мукопетид-глікогідролаз, руйнує клітинну стінку грампозитивних бактерій шляхом каталізу реакції гідролізу 1,4-бета-зв'язків між залишками N-ацетилмурамової кислоти і N-ацетил-D-глюкозаміном у складі гліканового ланцюжка пептидоглікану та між залишками N-ацетил-D-глюкозаміну в складі хітодекстрину, чим викликає пошкодження макромолекул бактеріальної стінки, що приводить до загибелі мікроорганізмів. Довжина поліпептидного ланцюга лізоциму становить 148 амінокислот, молекулярна маса – 16 537. Лізоцим грає одну з провідних ролей в природному неспецифічному імунітеті слизових оболонок шлунково-кишкового тракту, його основним джерелом в організмі є епітеліальні клітини слизових оболонок, гранулоцити, моноцити і макрофаги [2]. Активний синтез лізоциму здійснюється також нормальною пробіотичною мікробіотою кишечника. Лізоцим бере участь в захисних імунних реакціях організму, оскільки має здатність активувати імуноглобуліни та стимулювати фагоцитоз нейтрофілів і макрофагів, підвищувати синтез антитіл [3]. Лізоцим також має протигрибкову та противірусну дії. На гриби лізоцим впливає двома взаємодоповнюючими механізмами: ферментним гідролізом N-глікозидних зв’язків полісахаридів і глікопетидів клітинної

стінки та пошкодженням і підвищенням проникності цитоплазматичної мембрани по катіонному механізму [3, 4]. Лізоцим виконує ключову роль в системі антимікробного захисту тканин організму, тому при різних експериментальних патологіях зміна рівня лізоциму в дослідних тканинах є індикатором важкості процесу і ступеня стійкості до мікробних інвазій [5, 6, 7].

Принцип методу

Визначення активності лізоциму засноване на здатності лізоциму лізувати бактерії [1]. При взаємодії лізоциму з субстратом *Micrococcus lysodeikticus* спостерігається просвітлення субстрату, ступінь якого пропорційна активності лізоциму.

Реактиви

1. 0,1 М фосфатний буфер, pH 6,2. Готують з розчинів:

а) 0,1 М розчин Na_2HPO_4: 14,2 г Na_2HPO_4 поміщають в мірну колбу об'ємом 1000 мл, розчиняють і доводять до мітки дистильованою водою;

б) 0,1 М розчин KH_2PO_4: 1,36 г KH_2PO_4 поміщають в мірну колбу об'ємом 1000 мл, розчиняють і доводять до мітки дистильованою водою.

Приготування фосфатного буферу: змішують 915 мл 0,1 М розчину Na_2HPO_4 і 85 мл 0,1 М розчину KH_2PO_4 та доводять pH до 6,2.

2. Субстрат. Приготування: 10 мг ацетонового порошку бактерій *Micrococcus lysodeikticus* (штам 2665) суспендують в 50 мл фосфатного буфера в гомогенізаторі при 2500 об/хв протягом 3 хвилин.

Хід визначення

Гомогенати тканини готують як вказано в методі 1.4.1 цього довідника.

В кювету спектрофотометра, забезпечену термостатуючим пристроєм для підтримки температури + 30 °С, вносять 3 мл субстрату, прогрівають до 30°С протягом 5-6 хвилин, потім додають 0,1 мл дослідного гомогенату і вмикають секундомір.

Оптичну щільність проб вимірюють на спектрофотометрі при довжині хвилі 570 нм на 1-й та 5-й хвилинах в діапазоні 0–1,0 од.опт. щільності та довжині оптичного шляху в кюветі 5 мм або 10 мм. У якості контролю використовувують 3 мл 0,1 М фосфатного буфера pH 6,2.

Розрахунок

$$A = \frac{\Delta E \cdot 3{,}1 \cdot n}{\Delta t \cdot m}$$

де:

А – активність лізоциму в од/мл або од/г, де 1 одиниця – це зміна оптичної щільності на 1 одиницю за 1 хвилину;

ΔЕ – різниця экстинкцій між 5 і 1 хвилинами, од. опт. щільності;

3,1 – об’єм субстрату і дослідного гомогенату, мл;

n – розведення гомогенату;

m – маса слизової оболонки кишечнику в грамах в 1 мл гомогенату;

Δt – час спостереження (5 хвилин).

Результат перераховують в од/кг слизової оболонки шлунку або тонкої кишки.

Література

1. Жигіна О.О., Левицький А.П. Привушная залоза – джерело лізоциму у хом'яків // Укр. фізіол. журн. – 1974. – т. 20. – № 3. – С. 400-402.
2. Левицкий А. П. Лизоцим вместо антибиотиков / А. П. Левицкий – Одеса: КП «Одеська міська друкарня», 2005. – С. 55-56.
3. Marquis G., Montplaisir S., Garzon S., Strykowski H., Auger P. Fungitoxicity of muramidase. Ultrastructural damage to Candida albicans // Lab Invest. – 1982. – 46(6). – P. 627-636.
4. Edgerton M., Koshlukova S.E. Salivary histatin 5 and its similarities to the other antimicrobial proteins in human saliva // Adv. Dent. Res. – 2000. – 14. – P. 16-21.
5. Сторожук П.Г., Сафарова И.В., Еричев В.В. Определение активности лизоцима слюни // Клин. лабор. Диагностика. – 2000. – № 6. – С. 13-14.
6. Чумакова Ю.Г., Перова А.И., Мороз О.В., Запорожец Н.Н. Содержание лизоцима в различных биологических жидкостях у больных с воспалительными и дистрофически-воспалительными заболеваниями пародонта // Вісник стоматології. – 2001. – № 2. – С. 26-28.
7. Ющук Н.Д., Зюзин В.А., Фролов В.М., Пересадин Н.А. Клиническая оценка функциональной активности макрофагов у больных затяжной дизентерией и её коррекция лизоцимом и витамином Е // ЖМЭИ. – 1992. – № 11–12. – С. 57-59.

1.4.6. Визначення ступеню дисбіоза у слизових оболонках кишечнику

Принцип визначення

Ступень дисбіозу (СД) визначають як відношення показників активності уреази і лізоциму, які в свою чергу є відносними до контрольних значень [1].

Хід визначення

1. Гомогенати тканини готують як вказано в методі 1.4.1 цього довідника.

2. Визначають активність уреази в контрольній та дослідних группах щурів як вказано в методі 1.4.4 цього довідника.

3. Визначають активність лізоциму в контрольній та дослідних группах щурів як вказано в методі 1.4.5 цього довідника.

4. Визначають середню активність уреази і лізоциму в слизовій оболонці кишечнику у щурів контрольної та дослідної.

5. Розрахувують відносні активності уреази ($У_{відн}$) і лізоциму ($Л_{відн}$) за формулами:

$$У_{відн} = \frac{У_{досл}}{У_{конт}} \quad і \quad Л_{відн} = \frac{Л_{досл}}{Л_{конт}},$$

де:

$У_{досл}$ і $Л_{досл}$ – показники в дослідній групі,

$У_{конт}$ і $Л_{конт}$ – показники в контрольній групі.

6. Розрахувують ступень дисбіоза за формулою:

$$СД = \frac{У_{відн}}{Л_{відн}}, \text{ ум. од.}$$

Література

1. Ферментативный метод определения дисбиоза полости рта для скрининга про- и пребиотиков: методические рекомендации / А. П. Левицкий, О. А. Макаренко, И. А. Селиванская [и др.]. – К.: ГФЦ, 2007. – 22 с.

2. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ КІСТОК ТА КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ У ЛАБОРАТОРНИХ ЩУРІВ

2.1. Морфометричні вимірювання кісток щурів

2.1.1. Визначення атрофії альвеолярного відростка щелеп

Принцип методу

Оцінкою дистрофічного процесу в пародонті при моделюванні патологіїї або введені дослідної речовини є ступень оголення коренів молярів внаслідок атрофіїї кісткової тканини альвеолярного відростка [1].

Хід визначення

1. На верхній і нижній щелепах скальпелем видаляють м'які тканини.

2. Вимірюють відстань (L) між нижнім краєм альвеоли і рівнем анатомічної шийки кожного кореня всіх молярів, при цьому виконують: у трикореневих зубів – три вимірювання, у двокореневих – два.

3. Вимірюють відстань (М) між нижнім краєм альвеоли і вершиною зуба для кожного кореня всіх молярів з кількістю вимірювань як у першому випадку.

Вимірювання здійснюють за допомогою бінокулярної лупи МБС-1 зі шкалою розподілу 0,05 мм так, як показано на рисунку 3.

Визначають величину ступеня атрофії (СА) як відносне оголення коренів молярів у відсотках за формулою:

$$CA = \frac{L \cdot 100}{M}\%$$

де:

L – відстань від краю альвеоли до анатомічної шийки зуба,

М – відстань від краю альвеоли до вершини горбка зуба.

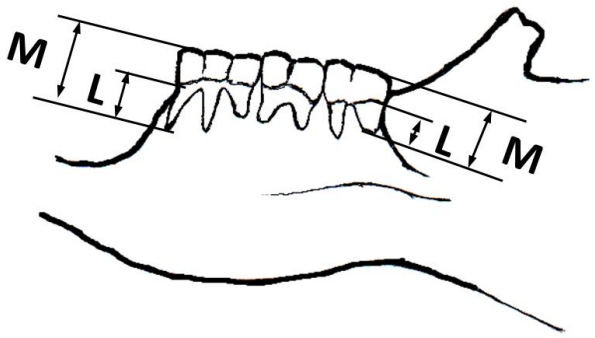


Рисунок 3. Об’єкти вимірювання в скелетованій нижній щелепі для визначення ступеня атрофії альвеолярного відростка (пояснення до відстаней L і M надані в тексті).

Величину СА визначають для кожного кореня всіх молярів верхньої та нижньої щелеп в контрольній і в дослідній групах щурів та утворюють для кожної групи варіаційний ряд, аналіз якого проводять статистичними методами.

Література

1. Николаева А.В. Влияние некоторых нейротропных средств на состояние тканей пародонта при раздражении верхнего шейного симпатического узла: Автореф. дис. …канд.мед.наук. – Харьков, 1967. – 28 с.

2.1.2. Визначення щільності кісток

Принцип методу

Щільність кісток ρ розраховують за формулою $\rho = m/V$, де m – маса вологої кістки, V – її об’єм.

Об’єм кісток визначають на основі виміру архімедової сили, що діє на кістку при повному зануренні її у воду, шляхом

зважування кістки в повітрі та в воді. Величину архімедової сили, як різницю між вагою кістки в повітрі та при зануренні її в воду з урахуванням прискорення сили тяжіння і щільності води, переводять в об'єм води, що витісняє кістка, який і дорівнює об'єму кістки. Зважування кісток, що занурюють у воду, припускає підвішування їх на важелі вагів за допомогою кріпильного пристосування, певна частина якого занурюється разом з кісткою в рідину. У формулі розрахунку щільності кісток лабораторних тварин враховується поправка на об'єм частини кріпильного пристосування, занурюваного разом з кісткою у воду, а також враховується щільність води залежно від її температури для підвищення точності визначення щільності [1].

Обладнання та матеріали

– ваги торсіонні ВТ-500;

– ваги аналітичні або електронні;

– стакан хімічний;

– стаканоутримувач;

– пінцет;

– скальпель;

– лінійка вимірювальна;

– дріт мідний з діаметром поперечного перерізу 0,1 мм;

– дріт жорсткий з діаметром поперечного перерізу 1 мм;

– термометр ртутний з точністю 0,1^{o}C;

– медична марля для осушування кісток;

– вата;

– вода дистильована;

– формалін 5 %-ний.

Хід визначення

1. Зважують тонкий мідний дріт довжиною 200 мм з петлею на одному з його кінців.

2. Свіжопрепаровану кістку, або після зберігання її в 5 % - ому розчині формаліну, очищують скальпелем від сухожиль, промивають у воді і швидко осушують медичною марлією до зникнення вологих відбитків. Якщо було виділено діафіз стегнової або великогомілкової кісток, або досліджують хребці щурів, то в цих кістках очищують канали від кісткового або спинного мозку шляхом проштовхування ватного тампону через канали за допомогою жорсткого дроту.

3. Визначають масу кістки зважуванням на електронних або торсіонних вагах.

4. Прикріплюють дріт до кістки. На стегновій кістці вільний кінець дроту намотують на шийку під проксимальним епіфізом, на великогомілковій кістці – намотують на звужену частину під дистальним епіфізом, на хребцях і трубці діафізу – просовують дріт через мозковий канал і загинають кінець.

5. Кістку за допомогою дроту підвішують до важеля торсіонних вагів.

6. Підводять знизу стакан з водою так, щоб кістка повністю занурилася у воду.

7. Стакан встановлюють на стаканоутримувач та реєструють показання вагів (рис. 4).

8. Пінцетом затискають дріт в місці його виходу з води, знімають дріт з важеля вагів, відкріпляють кістку і вимірюють лінійкою довжину ділянки дроту, що занурювалася разом з кісткою у воду.

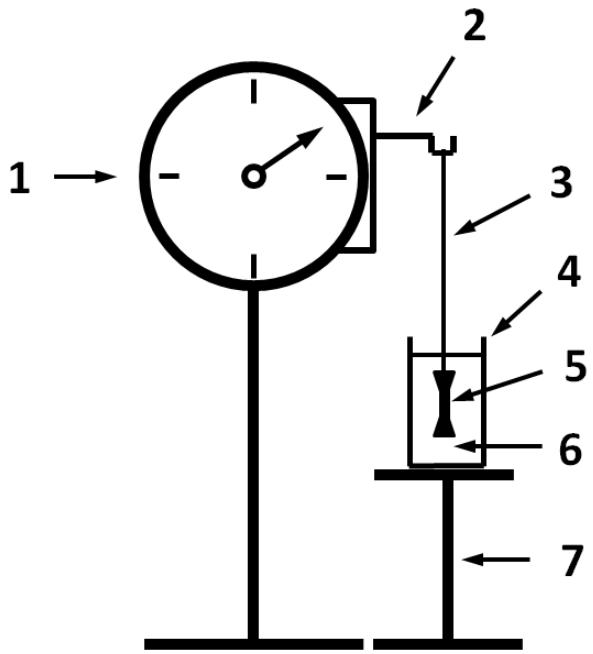


Рисунок 4. Зважування кісток у воді за допомогою торсіонних вагів.

1 – торсіонні ваги;
2 – важель вагів;
3 – дріт;
4 – хімічний стакан;
5 – кістка;
6 – дистильована вода;
7 – стаканоутримувач.

9. Термометром вимірюють температуру води в стакані.

10. Обчислюють щільність кістки (мг/мм^3) за формулою:

$$\rho = \frac{m}{\frac{(m + m_{\text{д}} - m_{\text{кдв}})}{\rho_{\text{в}}} - \frac{l \cdot m_{\text{д}}}{L \cdot \rho_{\text{д}}}}$$

де:

ρ – щільність кістки, мг/мм^3;

m – маса кістки в повітрі, мг;

$m_{\text{д}}$ – маса дроту, мг;

$m_{\text{кдв}}$ – показання вагів із зануреною в воду кісткою, мг;

L – довжина дроту, мм;

l – довжина ділянки дроту, зануреного в воду, мм;

$\rho_в$ – щільність води, мг/мм^3;

$\rho_д$ – щільність дроту, мг/мм^3 (для мідного дроту – 8,96).

Щільність води $\rho_в$ в діапазоні температур від 10 до 30^{o}С рз точністю до 5-го знаку після коми визначають за формулою:

$$\rho_в = 1{,}00017 + 9\cdot10^{-6}\cdot t - 5{,}3\cdot10^{-6}\cdot t^2 \text{ (мг/мм}^3\text{)}$$

де: t – температура води.

Література

1. Ходаков І.В. Спосіб визначення щільності кісток лабораторних тварин // Досягнення біології та медицини. – 2004. – № 2(4). – С. 38-41.

2.1.3. Визначення вмісту мінерального та органічного компонентів у кістках

Принцип методу

Кісткову тканину спрощено уявляють у вигляді системи з трьох основних компонентів: мінеральний компонент (МК), органічний компонент (ОК) і вода. МК і ОК мають високу міру однорідності їх складів – МК значною мірою складається з солей кальцію, переважно з гідроксиапатита, ОК – переважно з колагена. Тому кожен із компонентів характеризується індивідуальними значеннями щільності $\rho_{мін}$ і $\rho_{орг}$, які приймаються як константні значення. Вагове та об’ємне відношення МК і ОК в кістці формує певне значення щільності мінерального-органічного комплексу (МОК). Використання значень щільності МК, ОК і МОК дозволяє оцінювати ваговий (чи об'ємний, при необхідності) вміст МК і ОК в кістці [1].

Базовою для обчислення абсолютного та відносного вмісту компонентів в кістках є формула визначення об'ємного вмісту МК:

$$V_{\text{мін}} = V_{\text{мок}} \cdot \frac{\rho_{\text{мок}} - \rho_{\text{орг}}}{\rho_{\text{мін}} - \rho_{\text{орг}}} \quad (1)$$

де:

$V_{\text{мін}}$ – об'єм МК, мм^3;

$V_{\text{мок}}$ – об'єм МОК, мм^3;

$\rho_{\text{мок}}$ – щільність МОК, мг/мм^3;

$\rho_{\text{мін}}$ – щільність МК, мг/мм^3;

$\rho_{\text{орг}}$ – щільність ОК, мг/мм^3.

В наведеній формулі об'єм та щільність МОК ($V_{\text{мок}}$ і $\rho_{\text{мок}}$) розраховують шляхом попереднього визначення маси вологої і висушеної кістки, та її об'єму [1].

Обладнання та матеріали

– ваги торсіонні ВТ-500;

– ваги аналітичні або електронні;

– стакан хімічний;

– стаканоутримувач;

– пінцет;

– скальпель;

– лінійка вимірювальна;

– дріт мідний з діаметром поперечного перерізу 0,1 мм;

– дріт жорсткий з діаметром поперечного перерізу 1 мм;

– термометр ртутний с точністю 0,1^{o}C;

– медична марля для осушування кісток;

– вата;

– вода дистильована;

– формалін 5% - ний;

– шафа сушильна з температурою 65°С.

Хід визначення

1. Свіжопрепаровану кістку, або після зберігання її в 5%-ому розчині формаліну, очищують скальпелем від сухожиль.

2. Визначають масу вологої кістки m_0.

3. Визначають об'єм V_0 вологої кістки за методом 2.1.2 цього довідника.

3. Кістку висушують в сушильній шафі до постійної ваги.

4. Визначають масу сухої кістки $m_с$ на електронних або аналітичних вагах, яка дорівнює масі МОК.

5. Визначають об'єм МОК за формулою:

$$V_{мок} = V_0 - \frac{m_0 - m_с}{\rho_в}$$

де:

$V_{мок}$ – об'єм МОК, мм^3;

$V_о$ – об'єм вологої кістки, мм^3;

$m_о$ – маса вологої кістки, мг;

$m_о$ – маса сухої кістки, мг;

$\rho_в$ – щільність води при температурі процедури визначення об'єму кістки, яку знаходять за формулою:

$\rho_в = 1{,}00017 + 9 \cdot 10^{-6} \cdot t - 5{,}3 \cdot 10^{-6} \cdot t^2$ (мг/мм^3)

з точністю до 5-го знаку після коми.

6. Визначають щільність МОК за формулою: $\rho_{мок} = m_с / V_{мок}$.

7. Визначають об’єм МК $V_{мін}$ за формулою (1), де $\rho_{мін}$ = 3,16 мг/мм^3, $\rho_{орг}$ = 1,40 мг/мм^3.

8. Визначають об’єм ОК $V_{орг}$ за формулою: $V_{орг} = V_{мок} - V_{мін}$.

9. Визначають масу МК за формулою: $m_{мін} = V_{мін} \cdot \rho_{мін}$.

10. Визначають масу ОК за формулою: $m_{орг} = V_{орг} \cdot \rho_{огр}$.

11. Визначають відносний ваговий вміст МК $m_{мін.відн.}$ в кістці за формулою:

$$m_{мін.відн.} = \frac{m_{мін}}{m_0} \cdot 100\ \%$$

12. Визначають відносний ваговий вміст ОК $m_{орг.відн.}$ в кістці за формулою:

$$m_{орг.відн.} = \frac{m_{орг}}{m_0} \cdot 100\ \%$$

Література

1. Левицкий А.П., Макаренко О.А., Деньга О.В., Сукманский О.И., Подорожная Р.П., Россаханова Л.Н., Ходаков И.В., Зеленина Ю.В. Экспериментальные методы исследования стимуляции остеогенеза. Метод. рекомендации – Киев: «Авиценна», 2005. – 50 с.

2.2. Біохімічні методи визначення стану кісткової тканини щурів

2.2.1. Приготування гомогенатів кісткової тканини

Для дослідження ферментативної активності використовують цільні стегнову або велику гомілкову кістки, які препарують відразу після евтаназії тварин і ретельно очищають від м’яких тканин і сухожиль. Всі процедури, пов’язані з виділенням кістки і приготуванням гомогената проводять при низькій температурі (на

лотку зі льодом) для збереження активності ферментів. Очищені цільні кістки зважують на терезах з точністю до 1 мг. Розраховують необхідний об’єм 0,1 N цитратного буфера pH 6,1, виходячи зі співвідношення 75 мг кістки на 1 мл буфера. Потім кістки подрібнюють за допомогою кусачок і поміщають в охолоджену ступку. Додають трохи товченого скла і необхідний об’єм буферу. Ретельно розтирають і переносять в центрифужну пробірку. В пробірку вставляють скляну паличку до її зіткнення з дном пробірки. Всі пробірки поміщають в штатив і струшують на шейкері протягом 15 хвилин при температурі + 4°С. Після цього гомогенати центрифугують 20 хвилин при 2 500 об/хв і температурі + 4°С. Для аналізу відбирають надосадову рідину пастерівською піпеткою.

2.2.2. Методи визначення маркерів ремоделювання кісткової тканини

2.2.2.1. Визначення активності еластази у кістковій тканині

Еластаза (КФ 3.4.21.36) має широкий спектр дії щодо білків і гідролізує крім еластину протеоглікани, неспиральні кінцеві ділянки колагену I, II, III, IV типів. Ступень її активності має велике значення у процесах руйнування кістки, так як колаген I типу становить білкову матрицю кісткової тканини. Участь еластази в деградації колагену більш значна, ніж колагенази, оскільки остання розщеплює лише один пептидний зв'язок в молекулі колагену, а еластаза має більш ширшу специфічність по відношенню до колагену і його фрагментів. Крім того, еластаза

шляхом обмеженого протеолізу активує ряд матриксних протеїназ, що поетапно розщеплюють колаген кісткової тканини. Таким чином, еластаза індукує патологічний гідроліз колагенових білків і резорбцію кісткової тканини, а визначення рівня її активності має діагностичне значення для встановлення ступеня активності резорбції кісткової тканини при експериментальної патології [1].

Принцип методу

Активність еластази оцінюють за ступенем гідролізу синтетичного субстрату N-t-BOC-L-alanine-p-nitrophenyl ester (BOC) за методом Visser et Blouf [2, 3]. Під дією еластази від субстрату відщеплюється n-нітрофенол жовтого кольору, при цьому інтенсивність забарвлення розчину пропорційна рівню активності еластази.

Реактиви

1. 0,05 М фосфатний буфер з pH 6,5 (див. стор. 27).
2. Субстрат готують безпосередньо перед використанням: 3,1 мг BOC розчиняють в 1 мл ацетонітрилу, працюють в ацетонітрілі за домогою скляної піпетки.
3. Калібрувальні розчини n-нітрофенолу (див. стор. 28)

Хід визначення

В скляні пробірки вносять по 1,9 мл 0,05 М фосфатного буферу, додають 1 мл гомогенату кісткової тканини (гомогенати кісткової тканини готують, як вказано в 2.2.1 цього довідника).

(див. стор. 47 п.). Пробірки поміщають на водяну баню при температурі +25˚С на 10-15 хвилин. В пробірку за допомогою скляної піпетки вносять 0,1 мл розчину субстрату BOC, швидко перемішують і вимірюють екстинкцію на «нульовій» і на 5-й

хвилинах.

Оптичну щільність дослідних проб проти холостої проби вимірюють проти фосфатного буферу на спектрофотометрі при довжині хвилі 347,5 нм в діапазоні 0–1,0 од.опт. щільності та довжині оптичного шляху в кюветі 5 мм або 10 мм.

Паралельно ставлять контроль на спонтанний гідроліз ВОС, в якому 1 мл гомогенату замінюють на фізіологічний розчин.

Розрахунок

$$A = \frac{((E_5 - E_0) - E) \cdot n \cdot 1000}{1{,}0 \cdot K \cdot 300 \cdot m}$$

де:

A − активність ферменту в мк-кат на 1 кг ткани;

E_0 − екстинкція на 0-й хвилині, од. опт. щільності;

E_5 − екстинкція на 5-й хвилині, од. опт. щільності;

Е − контроль на ВОС, од. опт. щільності;

1,0 − об’єм гомогенату кісткової тканини в мл;

1000 – коефіцієнт перерахунку в кг;

n − розведення проби;

m – маса кісткової тканини в грамах в 1 мл гомогенату;

300 − час інкубації, в секундах;

К − коефіцієнт перерахунку величини екстинкції в концентрацію n-нітрофенолу (коефіцієнт визначають як вказано методі 1.4.2 цього довіднику).

Активність еластази виражають в мікрокаталах на 1 кг кісткової тканини, де 1 катал − це активність еластази, що каталізує відщеплення 1 n-нітрофенолу за 1 секунду.

Література

1. Макаренко О.А. Біохімічні механізми остеотропної дії флавоноїдів. Автореф. дис. … докт. біол. наук. – Одеса, 2011. – 40 с.
2. Visser L., Blouf T.R.. The use of p-nitrophenyl-N-test-butyl-oxycarbonyl-L-alaninate as substrate for elastase // Biochem. Of biophys. Acta. – 1972. – V. 268. – № 1. – P. 275-280.
3.Оглобина О.Г, Платонова Л.В., Мясникова Л.В. Активность протеиназ гранулоцитов и уровень кислотостабильных ингибиторов протеиназ в бронхоальвеолярном секрете детей с бронхиопатиями различной этиологии // Вопросы мед. химии. – 1980. – № 3. – С. 387-392.

2.2.2.2. Визначення активності кислої та лужної фосфатаз у кістковій тканині

Лужна фосфатаза (КФ 3.1.3.1) – гідролаза, яка відщеплює фосфат від молекул білків, нуклеотидів, алкалоїдів та ін. Являє собою гомодимерний білковий фермент масою 86 кДа. Кожний мономер містить п’ять залишків цистеїну, два атоми цинку й один атом магнію, які мають вирішальне значення для каталітичної функції ферменту. Найбільшу активність фермент має в лужному середовищі і грає важливу роль в обміні речовин в печінці та кісткових тканинах.

Лужна фосфатаза кісткової тканини зосереджена в мембрані остеобластів, тому вважають, що активність лужної фосфатази відображає функціональну діяльність остеобластів. Так, зниження активності цієї фосфатази відзначено в крові хворих з ослабленням остеобластичних процесів (гіпотиреоз, гіповітаміноз С, старечий остеопороз) і при остеолітичному перебігу саркоми кісток. Гіперфосфатаземія має місце при переважанні остеобластичних

процесів (при рахіті як компенсаторний механізм забезпечення потреб організму в неорганічних фосфатах).

Загальним ферментом лізосом остеокластів є кисла фосфатаза (КФ 3.1.3.2), яка руйнує гідроксиапатит кісткової тканини при pH від 4 до 5. Тому прийнято вважати, що активність кислої фосфатази відображає функціональну діяльність остеокластів. У клінічної практиці інформативними і досить часто вживаним цей фермент представляють як маркер метаболізму кісткової тканини, зокрема метод визначення активності тартрат-резистентної кислої фосфатази в сироватці крові. У експериментальних дослідженнях при можливості безпосередньо аналізувати кісткову тканину, визначення активності кислої фосфатази використовують для встановлення ступеня резорбційних процесів кісток дослідних тварин.

Принцип методу

Активність кислої та лужної фосфатази визначають на основі гідролізу субстрату n-нітрофенілфосфату по методу Бессея-Лоурі-Брока [1, 2]. Субстрат для кислої фосфатази готують цитратному буфері з pH 4,8, для лужної фосфатази – з pH 10,5. Під впливом фосфатаз від субстрату відщеплюється n-нітрофенол, що в лужному середовищі має жовтий колір. Інтенсивність забарвлення розчину пропорційна активності ферменту. Активність ферментів виражали в мікрокаталах на 1 кг кісткової тканини (мк-кат /кг). За 1 катал приймали активність ферменту, що здатна утворити 1 моль n-нітрофенолу.

Реактиви

1. Субстрат pH 4,8: 0,41 г лимонної кислоти, 1,125 г лимоннокислого натрію та 165 мг n-нітрофенілфосфату розчиняють в 100 мл дистильованої води, визначають pH. Субстрат зберігають в холодильнику, в морозильній камері, в пластмасовій посуді.

2. Субстрат pH 10,5: 375 мг гліцину, 0,012 мл насиченого $MgCl_2$ (10 мг $MgCl_2$), 165 мг n-нітрофенілфосфату в 42,0 мл 0,1 н NaOH, доводять до 100 мл дистильованою водою, визначають pH. Субстрат зберігають в холодильнику або в морозильній камері в пластмасовому посуді.

3. 0,05 N NaOH: 2 г NaOH розчинять у невеликій кількості дистильованої води, доводять до 1000 мл у мірної колбі дистильованою водою.

4. Калібрувальні розчини n-нітрофенолу, (див. стор. 28)

Хід визначення

У пробірки розливають по 0,4 субстрату, додають по 0,1 мл гомогенату кісткової тканини (гомогенати кісткової тканини готують, як вказано в 2.2.1 цього довідника) за секундоміром і поміщюють в термостат при температурі 37˚С на 30 хвилин. Контроль не інкубують і до внесення досліджуваного матеріалу додають 5,0 мл 0,05 N NaOH. Реакцію зупиняють додаванням 5,0 мл 0,05 N NaOH строго за секундоміром.

Оптичну щільність дослідних проб вимірюють на спектрофотометрі при довжині хвилі 400 нм в діапазоні 0–1,0 од. опт. щільності та довжині оптичного шляху в кюветі 5 мм або 10 мм. На кожну пробу ставлять контроль.

Розрахунок

$$A = \frac{\Delta E \cdot n}{K \cdot T \cdot M \cdot V}$$

де:

A − активність ферменту в мк-кат на 1 кг кісткової тканини;

ΔЕ − різниця екстинкції між контрольною та дослідною пробами, од. опт. щільності;

n − розведення ферментного розчину;

1000 − коефіцієнт переведення на кг;

K − коефіцієнт перерахунку екстинкції на кількість кінцевого продукту реакції (n-нітрофенолу);

T − час інкубації, сек.;

V − об'єм досліджуваної рідини, мл;

M − маса тканини в грамах в 1 мл гомогенату.

Активність ферментів виражають в мікрокаталах на 1 кг кісткової тканини (мк-кат /кг), де за 1 катал приймали активність ферменту, що здатна утворити 1 моль n-нітрофенолу.

Література

1. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник /Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотгицкая Р.П. Под ред. Меньшикова В.В. – Москва: Медицина, 1987. – С. 205-209.
2. Bergmeyer H.U. Methoden der enzymatischen Analyse. – Verlag Chemie Weinheim, 1974. – P. 528-529.

2.2.2.3 Визначення вмісту кальцію і фосфору у кістковій тканині

Кальцифікація, або накопичення солей кальцію в синтезованому остеобластами органічному матриксі (остеоїді), є

заключним етапом формування кісткової тканини. Цей процес починається з формування аморфного фосфату кальцію $Ca_3(PO_4)_2$ в матриксних бульбашках, які грають роль центрів кальцифікації, котрі виділяють і відкладають в остеоїдній тканини остеобласти. Матриксні бульбашки характеризуються високою активністю лужної фосфатази, що гідролізує етери фосфорної кислоти з утворенням ортофосфатів, які взаємодіють з іонами кальцію, що також містяться в бульбашках, з утворенням осадка $Ca_3(PO_4)_2$ [1]. Остаточно сформований мінеральний компонент кісткової тканини представлений переважно кристалами гидроксиапатиту $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ (до 50 % від загальної маси кісток), дуже тісно асоційованим з колагеном разом з β-трикальційфосфатом, карбонатом кальцію та іншими неорганічними й органічними сполуками [2, 3]. При цьому для більш зрілої і щільної кісткової тканини характерно більш високе відношення Ca–P. Таким чином, на всіх етапах мінералізації новоутвореної в ході ремоделювання кісткової тканин (остеоїда) або стимуляції її синтезу обов'язковим є наявність у кістках іонів кальцію і фосфору. Вміст цих елементів у кістках лабораторних тварин та відношення залежить від надходження їх в організм з їжею, від факторів стимуляції або пригнічення процесів обміну речовин у кістках, які зв'язані з цілеспрямованою дією остеотропних препаратів і моделюванням різних патологій.

Для переведення кальцію і фосфатів з кристалічної решітки гідроксиапатиту в іонізовану форму кісткову тканину піддають гідролізу.

Приготування гідролізату кісткової тканини

Кістковоу тканину ретельно очищають від м'яких тканин і кісткового мозку та висушують до постійної ваги при 65 ^{o}C. Беруть наважку 50 мг, поміщають в пробірку, заливають 2 мл 0,2 N HCI. Струшують на шейкері протягом 24 годин при кімнатній температурі. Гідролізат переносять через паперовий фільтр в мірну колбу на 25 мл. Фільтр кілька разів промивають 0,1 N HCI. Доводять об'єм до 25 мл 0,1 N HCI. В приготованому гідролізаті проводять кількісне визначення іонізованого кальцію і неорганічних фосфатів.

2.2.2.3.1 Визначення концентрації неорганічного фосфору у кістковій тканині

Принцип методу

Неорганічний фосфор утворює з молібденовою кислотою фосфорно-молібденову кислоту, яка в подальшому відновлюється аскорбіновою кислотою до фосфорно-молібденового комплексу синього кольору. Інтенсивність забарвлення в досліджуваній пробі пропорційна концентрації неорганічного фосфору.

Реактиви

1. 10% розчин трихлороцтової кислоти (ТХО);
2. 5% розчин молібдату амонію;
3. 1% розчин аскорбінової кислоти;
4. Стандартний розчин фосфату 1,61 ммоль/л.

Хід визначення

У центрифужні пробірки вносять 1,6 мл дистильованої води, 0,4 мл гомогенату і 2 мл 10% ТХО для осаджування білків. Через 10

хв центрифугують. До 2 мл центрифугата додають 0,4 мл розчину молібдату амонію, 0,08 мл розчину аскорбінової кислоти і 0,72 мл дистильованої води. Проби залишають при кімнатній температурі.

Через 20 хв вимірюють екстинцію на спектрофотометрі при довжині хвилі 630–690 нм в діапазоні 0–1,0 од. опт. щільності та довжині оптичного шляху в кюветі 5 мм або 10 мм. Контроль готують як дослід, але замість центрифугата використовують 0,5 мл ТХО і 0,5 мл дистильованої води.

Розрахунок

Вміст неорганічного фосфору в гомогенаті кісткової тканини визначають за формулою:

$$C = \frac{E \cdot n \cdot 25}{K \cdot 0{,}05}$$

де:

С – концентрація фосфору в пробі, ммоль/г;

Е – екстинкція випробуваної проби, од. опт. щільності;

n – розведення випробуваної проби;

25 – кінцевий об’єм гомогената кісткової тканини, мл;

0,05 – навіска кісткової тканини, г;

К – коефіцієнт перерахунку екстинкції в концентрацію фосфату в пробі.

Побудова калібрувального графіка.

Зі стандартного розчину фосфату готують розведення як зазначено в таблиці.

Таблиця

Приготування калібрувальних проб зі стандартного розчину

№	Розчин, мл				Вода, мл	Вміст фосфору		
	Робочий стандарт	ТХО	молібдат амонію	аскорб. кислота		мг/проба	ммоль/л	мг/100 мл
1	0,5	2,5	1,0	0,2	3,8	0,01	0,64	2
2	1,0	2,5	1,0	0,2	3,3	0,02	1,30	4
3	1,5	2,5	1,0	0,2	2,8	0,03	1,98	6
4	2,0	2,5	1,0	0,2	2,3	0,04	2,58	8
5	2,5	2,5	1,0	0,2	1,8	0,05	3,23	10

За показниками вмісту фосфору і екстинції калібрувальних розчинів формурують калібрувальний графік. Розраховують коефіцієнт К з використанням калибрувального графіка за формулою:

$$K = \frac{C}{E}$$

де:

С – концентрація фосфору, ммоль/г;

Е – екстинція, од.опт. щільності.

Концентрацію неорганічного фосфору в кістковій тканині розраховують в ммоль/г тканини.

Література

Горячковский О. М. Клінічна біохімія в лабораторній діагностиці: Довідковий посібник. – Одеса: Екологія, 2005. – 616 с.

2.2.2.3.2 Визначення концентрації іонізованого кальцію у кістковій тканині

Принцип методу.

Вміст іонізованого кальцію в гомогенатах кісткової тканини визначають за допомогою арсеназного реагенту, який утворює з іонами кальцію забарвлений комплекс, інтенсивність якого оцінюють спектрофотометрично.

Реактиви

1. Арсеназний реагент:
   - арсеназо III (0,20 ± 0,01 ммоль / л)
   - 8-оксихінолін (20,0 ± 0,2 ммоль / л)
   - активатори
2. Калібрувальний розчин кальцію (2,50 ± 0,05 ммоль/л)

Хід визначення

Пробірки обробляють бідистильованною водою. У дослідну пробірку вносять 1,0 мл арсеназного реагенту і 0,01 мл гомогенату кісткової тканини, в калібровану пробірку – 1,0 мл арсеназного реагенту і 0,01 мл калібрувального розчину кальцію, в холосту пробу – 1,0 мл арсеназного реагенту і 0,01 мл бідистильованої води. Ретельно перемішують, витримують 2-3 хвилини. Реєструють екстинкцію на спектрофотометрі при довжині хвилі 650 нм в діапазоні 0–1,0 од. опт. щільності та довжині оптичного шляху в кюветі 5 мм або 10 мм. Забарвлення стійке протягом 60 хвилин.

Розрахунок

$$C = \frac{E_{\text{досл}} \cdot 0{,}025}{E_{\text{кал}} \cdot 0{,}05} \cdot 2{,}5$$

де:

С – вміст кальцію у кістковій тканині;

$E_{досл}$ – екстинкція дослідної проби, од. опт. щільності;

$E_{кал}$ – екстинкція калібрувальної проби, од. опт. щільності;

2,5 – концентрація кальцію в стандартному розчині, ммоль/л;

0,025 – кінцевий об’єм гомогенату кісткової тканини, л;

0,05 – маса кісткової тканини, г.

Концентрацію іонізованого кальцію в кісткової тканини виражають в ммоль/г ткани.

Література

Горячковский О. М. Клінічна біохімія в лабораторній діагностиці: Довідковий посібник. – Одеса: Екологія, 2005. – 616 с.

2.2.2.4. Визначення вмісту білка у кістковій тканині

Метод заснований на утворенні забарвлених продуктів ароматичних амінокислот і цистеїну з реактивом Фоліна в поєднанні з біуретовою реакцією на пептидні зв’язки [1].

Реактиви

1. Реактив А: 2 % розчин Na_2CO_3 в 0,1 н NaOH (4г NaOH, 20 г Na_2CO_3 до 1000 мл дистильованої води).
2. Реактив В: 0,5% розчин $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ в 1% розчині цитрата Na (500 мг $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ + 1 г цитрата Na до 100 мл води).
3. Реактив С: 50 мл реактива А + 1мл реактива В (*extempore*).
4. Реактив Фоліна у розведенні 1:1.
5. Розчин альбуміну для калібрувального графіку в наступних концентраціях: 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,100 мг/мл води.

Хід визначення

До 0,4 мл гомогенату кісткової тканини додають 4 мл реактиву С (гомогенати кісткової тканини готують, як вказано в 2.2.1 цього довідника). Суміш перемішують, через 10 хв доливають до неї 0,4 мл реактиву Фоліна. Інтенсивність забарвлення визначають на спектрофотометрі при довжині хвилі 750 нм через 30 хв за секундоміром проти контролю на реактиви (4 мл реактиву С, 0,4 мл екстрагенту, 0,4 мл реактиву Фоліна) в діапазоні 0–1,0 од.опт. щільності та довжині оптичного шляху в кюветі 5 мм або 10 мм.

Розрахунок

$$C = \frac{E \cdot n \cdot V}{K \cdot m}$$

де:

С – вміст білка, мг/г;

Е – екстинкція, од. опт. щільності;

n – розведення;

К– коефіцієнт перерахунку екстинкції в мг білка;

V – об’єм екстрагента, мл;

m – маса кісткової тканини в грамах в 1 мл гомогенату.

Коефіцієнт *К* розраховують по калібрувальній кривій.У приготованих розчинах альбуміну визначають білок по вище описаному методу. За отриманими даними будують калібрувальну криву: по осі ординат відкладають значення оптичної щільності, а по осі абсцис – концентрацію альбуміну.

Література

1. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Parr A.L., Rendall R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent // Biol. Chem. – 1951. – v. 193. – P.265.

2.2.2.5. Визначення індексу мінералізації кісткової тканини

Для характеристики ступеня мінералізації кісткової тканини експериментальних тварин наочним є показник СМ, який заснований на визначенні вмісту білка і вмісту кальцію в кістковій тканині і його розрахунок проводять за формулою:

$$CM = \frac{C_{Ca}}{C_{\text{білок}}},$$

де:

СМ – ступень мінералізації;

C_{Ca} – вміст кальцію, ммоль/г тканини;

$C_{\text{білок}}$ – вміст білка, мг/г тканини.

Література

1. Хэм А., Кормак Д. Гистология в пяти томах. Том 3. – Москва: «Мир», 1983. – 293 с.
2. Куляшова К.С., Шаркеев Ю.П. Получение синтетического гидроксиапатита для формирования биопокрытий на имплантах медицинского назначения // Химия в интересах устойчивого развития. – 2019. – 19. – С. 447-453.
3. Эшле М. Биоматериалы и биоминерализация. – Томск: Ветер, 2007. – 137 с.

2.2.3. Методи визначення маркерів антиоксидантно-прооксидантного стану кісткової тканини

2.2.3.1. Визначення активності каталази у кістковій тканині

Каталаза (КФ 1.11.1.6) – фермент з молекулярною масою 240 кДа, належить до хромопротеїдів, які мають в якості небілкової групи окислений гем [1]. Це один із ферментів антиоксидантої системи, що належить до класу оксидоредуктаз, який каталізує гетеролітичне розщеплення О–О-зв'язку в пероксиді водню за схемою: $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$. Головна функція каталази в організмі – руйнування токсичного пероксиду водню, який утворюється в ході різних окислювальних процесів, в тому числі при відновленні супероксиданіона супероксиддисмутазою. Фермент широко розповсюджений в клітинах тварин, рослин і мікроорганізмів й приймає участь у процесах тканинного дихання. Специфічність каталази до субстрату невелика, тому фермент здатен в присутні пероксиду водню каталізувати розкладання та окислення низькомолекулярних спиртів та нітритів. У ссавців каталаза переважно знаходиться в печінці, еритроцита, нирках і ЦНС [2]. При патологіях дезорганізація структур і функцій органів і систем може відбуватися внаслідок активації процесів вільнорадикального окиснення, які приводять до пригнічення ланки антиоксидантної системи через надлишкову витрату антиоксидантів та втрату антиоксидантних ферментів при порушеннях цілісності клітинних мембран. Рівень активності каталази в досліджуваних тканинах відображає стан оксидантної та антиоксидантної систем та дозволяє оцінювати окислювальне навантаження на тканини [3].

Принцип методу

Метод заснований на здатності пероксиду водню утворювати з молібдатом амонію стійкий забарвлений комплекс з максимумом поглинання при 410 нм [4]. Активність каталази оцінюють по інтенсивності забарвлення розчинів та виражають в мкат/кг.

Реактиви

1. 0,03 % пероксид водню;
2. 4 % розчин молібдата амонію.

Хід визначення

Реакція запускається додаванням 0,1 мл гомогенату кісткової тканини до 2 мл 0,03 % розчину пероксиду водню (гомогенати кісткової тканини готують, як вказано в 2.2.1 цього довідника). У холосту пробу замість гомогенату вносять 0,1 мл дистильованої води. Реакцію зупиняють через 10 хвилин додаванням 1 мл 4 % молібдату амонію.

Інтенсивність забарвлення вимірюють на спектрофотометрі при довжині хвилі 410 нм проти контрольної проби, в яку замість пероксиду водню вносять 2 мл води, в діапазоні 0–1,0 од.опт. щільності та довжині оптичного шляху в кюветі 5 мм або 10 мм.

Розрахунок

$$A = (E_{хол} – E_{досл}) \cdot V \cdot t \cdot m \cdot K ,$$

де:

A – активність каталази, мкат/кг;

$E_{хол}$ і $E_{досл}$ – екстинція холостої і дослідної проб, од. опт. щільності;

V – об’єм внесеної проби (0,1 мл);

t – час інкубації (600 с);

m – маса кісткової тканини в грамах в 1 мл гомогенату;

К – коефіцієнт мілімолярної екстинції пероксиду водню, рівний $22{,}2\times10^{3}$ $мМ^{-1}\times см^{-1}$.

Література

1. Чеснокова Н.П., Понукалина Е.В., Бизенкова М.Н. Общая характеристика источников образования свободных радикалов и антиоксидантных систем // Успехи соврем. Естествознания. – 2006. – № 7. – С. 37-41.
2. Рязанцева Л.Т. Ферменты-антиоксиданты: структурно-функциональные свойства и роль в регулировании метаболических процессов // Вестн. Воронеж. гос. техн. ун-та. – 2011. – т. 7. – № 2. – С. 126-129.
3. Кашулина А.П. Эритроциты периферической крови как источник информации о состоянии организма в норме и при патологии // Медицина и качество жизни. – 2011. – № 2. – С. 11-14.
4. Гирин С. В. Модификация метода определения активности каталазы в биологических субстратах // Лабораторная диагностика. – 1999. – № 4. – С. 45-46.

2.2.3.2. Визначення активності супероксиддисмутази у кістковій тканині

Супероксидддисмутаза (КФ 1.15.1.1) належить до групи антиоксидантних ферментів, разом з іншими антиоксидантними ферментами захищає організм від високотоксичних кисневих радикалів, що постійно утворюються в ході процесів метаболізму. Існує три форми супероксиддисмутазы (СОД): цитоплазматична (молекулярна маса 32,5 кДа), мітохондріальна (86–88 кДа) й екстраклітинна (135 кДа). Перша і третя форми містять мідь в активному центрі, а друга – марганець. СОД каталізує дисмутацію супероксида O_2^- у кисень O_2 та пероксид водню H_2O_2.

Супероксид O_2^- – один з основних прооксидантів у клітини, тому супероксиддисмутаза грає ключову роль у антиоксидантному

захисті організму, особливо тканин, які так чи інакше знаходяться у постійному контакті з киснем. O_2^- спонтанно швидко дисмутує у O_2 та H_2O_2, але ще швидше він реагує з іншими молекулами-мішенями, такими як оксид азоту NO, утворюючи при цьому різні пероксид-сполуки, неконтрольована дія яких приводить до оксидантного стресу. Але, як відомо, СОД характеризується самою високою каталітичною швидкістю (~10^9 M^{-1} s^{-1}), при цьому реакція взаємодії лімітована лише частотою зіткнення супероксида з ферментом, завдяки чому фермент захищає клітину від шкідливої дії суперксида. Зміна рівня супероксиддисмутази може вказувати на активацію чи пригнічення ензимної ланки антиоксидантного захисту в досліджувальних тканинах як результат впливу оксидативного стресу при експериментальних патологіях [1].

Принцип методу

Активність СОД визначають за методом, заснованому на визначенні ступеня гальмування СОД кісткової тканини реакції окислення кверцетина [2].

Реактиви

1. 0,15 М фосфатний буфер pH 7,8:

   а) 26,2 Na_2HPO_4 до 1000 мл дистильованої H_2O;

   б) 20,4 KH_2PO_4 до 1000 мл дистильованої H_2O;

   в) 915 мл Na_2HPO_4 + 85 мл KH_2PO_4, доводять pH до 7,8.

2. ЕДТА (етилендіамінтетраацетат): 0,08мМоль (0,0234 мг в 1 мл дистильованої H_2O;

3. ТЕМЕД (N,N, N ', N ' - Tetramethyl-ethylenediamine, MW 116,20 г/моль) - 0,5 мМ (0,0581 мл в 1 мл дистильованої H_2O);

4. Кверцетин 0,462 ммоль (0,140 мг в 1 мл диметилсульфоксида *extempore*).

Разрахунок реактивів на 40 мл.

Робоча суміш:

- 0,15 М фосфатний буфер pH 7,8 – 20 мл,
- ЕДТА (етилендіамінтетраацетат): 0,08 мМоль – (0,468 мг в 10 мл дистильованої H_2O) – 10 мл,
- ТЕМЕД 0,5 мМ (1,2 мл в 10 мл дистильованої H_2O) – 10 мл.
- кверцетин 0,462 мМоль в фосфатному буфері *extempore* (1,40 мг кверцетину розчиняють в 0,05-0,1 мл диметилсульфоксида і доводять об'єм до 10 мл 0,15 М фосфатним буфером pH 7,8).

Хід визначення

В дослідні та контрольні пробірки розливають по 1,0 мл робочої суміші (в дослідні по 0,1 мл гомогенату кісткової тканини та 1,8 мл дистильованої H_2O) в контрольні проби 1,9 мл дистильованої H_2O), прогрівають 10 хвилин в термостаті при 37°С. Гомогенати кісткової тканини готують, як вказано в 2.2.1 цього довідника. В контрольні та дослідні пробірки вносять по 0,1 мл розчину кверцетину. Вміст пробірок переносять в кювети. Вимірюють оптичну щільність на спектрофотометрі при довжині хвилі 406 нм на «нульовій» хвилині та на 10 хвилині в діапазоні 0–1,0 од.опт. щільності та довжині оптичного шляху в кюветі 5 мм або 10 мм.

Розрахунок

$$A = \frac{E_{\text{конт}} - E_{\text{досл}}}{E_{\text{конт}}} \cdot 100\%$$

де:

А – активність супероксиддисмутази, од/л;

$E_{конт}$ – екстинкція контрольної проби, од. опт. щільності;

$E_{досл}$ – екстинкція дослідної проби, од. опт. щільності;

Література

1. Копаниця О. М. Супероксиддисмутази і каталази у стінці тонкої кишки, серці і печінці щурів при експериментальному застуванні карагінану // Здобутки клінічної і експериментальної медицини. – 2017. – № 4. – 57-61.

2. Костюк В.А. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина / В.А.Костюк, А.И. Потапович, Ж.В Ковалева // Вопросы медицинской химии. – 1990. – т. 36, выпуск 2. – С. 88-91.

2.2.3.3. Визначення активності глутатіонпероксидази у кістковій тканині

Глутатіонпероксидази (КФ 1.11.1.9) – сімейство ферментів глутатіонової антиоксидантної системи, які захищають організм від оксидативного ушкодження. Каталізують відновлення гідроперекисів ліпідів у відповідні спирти та відновлення пероксиду водню до води. У ссавців і людини значна частина ферментів даного сімейства являє собою білки і глікопротеїни, що містять в активному центрі атом селену Se у ступені окислення -1 у складі залишку амінокислоти селеноцистеїна [1]. Селен окислюється гидропероксидами до SeOH. Для регенерації селену SeOH послідовно реагує з двома молекулами сульфгідрилу глутатіону GSH, при цьому регенерується Se^- і утворюється побічний продукт дисульфід глутатіону GS-SG. Молекули GS-SG відновлюватися у ході глутатіонредуктазної реакції за участю NADPH.

Глутатіонпероксидаза здатна знешкоджувати ліпідні пероксиди лінолевої і ліноленової кислот, холестерин-7-гідроксіпероксід, які синтезуються в організмі при активації процесів ПОЛ, а також деякі синтетичні речовини (кумен-, трет-бутил-гідропероксид). Фермент захищає від окисної атаки білки, ліпіди, нікотинамідні коферменти і локалізован в цитоплазмі в невеликих кількостях, а також в мітохондріях. У тканинах ссавців максимальна активність виявлена в печінці, еритроцитах, наднирниках та залежить від кількості утворених пероксидов. Функціонує зв'язано з глутатіонредуктазою [2].

Принцип методу

Активність глутатіонпероксидази визначають за допомогою реактива Елмана (5,5'-дітіобіс-2-нітробензойна кислота – ДТНБК) спектрофотометрично. Метод заснований на тому, що глутатіонпероксидаза каталізує реакцію взаємодії відновленого глутатиона (GSH) з H_2O_2. Активність ферменту оцінюють по зміні вмісту GSH в пробах до і після інкубації з субстратом в ході кольорової реакції з реактивом Елмана [3].

Реактиви

1. 0,1 М фосфатний буфер з pH 7,4. Приготування:

– 6,8 г KH_2PO_4 розчиняють в 500 мл дистильованої H_2O;

– 11,4 г $K_2HPO_3 \cdot 3H_2O$ розчиняють в 500 мл дистильованої H_2O;

– розчини змішують під контролем pH-метру до pH 7,4.

2. 31,88 ммоль/л розчин відновленого глутатіона (GSH): 24,29 мг відновленого глутатіона + 14,52 мг натрія азиду + 27,68 мг ЕДТА-Na розчиняють в 35 мл фосфатного буферу pH 7,4 (*extempore*).

3. 13,8 ммоль/л розчину H_2O_2 (0,048 %).

4. 10 % розчин ТХО. Приготування: 35 мл насиченого розчину доводять до 400 мл H_2O.

5. 0,3 моль/л фосфатний буфер з pH 8,0. Приготування:

– 10,2 г KH_2PO_4 розчиняють в 25 мл дистильованої H_2O;

– 34,2 г $K_2HPO_3 \cdot 3H_2O$ розчинять в 500 мл дистильованої H_2O;

– розчини змішують під контролем pH-метру до pH 8,0.

6. 10,0 ммоль/л розчин Елмана. Приготування: 39,6 мг 5,5'-дітіобіс (2-нітробензойної) кислоти розчиняють в 10 мл абсолютного метилового спирту.

Хід визначення

Схема та послідовність операцій для визначення активності глутатіонпероксидази наведена у таблиці.

Таблиця

Схема визначення активності глутатіонпероксидази

Реактиви	Дослід	Контроль
Розчин глутатіона відновленого	0,25 мл	0,25 мл
Досліджуваний матеріал	0,25 мл	0,25 мл
Інкубація 5 хв. при 37°С у термостаті		
H_2O_2 (0,048 %)	0,1 мл	-
10 % ТХО охолоджена (через 1 хв)	2 мл	2 мл
H_2O_2	-	0,1 мл
В холодильник на 10 хв. (дослід і контроль)		
Центрифугують при 2500 об/хв при 0-4°С потягом 15 хв.		
Відбирають 0,25 мл надосад. рідини (дослід і контроль)		
Фосфатний буфер pH 8,0	5 мл	5 мл
Реактив Елмана	0,025 мл	0,025 мл

Вимір оптичної щільності проводять при довжині хвилі 412 нм

Розрахунок

$$A = \frac{(E_{\text{досл}} - E_{\text{конт}}) \cdot 10{,}55 \cdot 10^6 \cdot 166{,}4}{13100}$$

де:

А – активність фермента, МО (мкмоль відновленого глутатіона /л·хв);

$E_{\text{досл}}$ – оптична щільність дослідної проби, од. опт. щільності;

$E_{\text{конт}}$ – оптична щільність контрольної проби, од. опт. щільності;

10,55 – кінцевий об'єм проби, мл;

10^6 – перерахунок в мкмолі;

166,4 – фактор розведення;

13100 – коефіцієнт молярної екстинкції тіонітрофенільного аніона (ТНФА), що утворюється після окиснення 5,5'-дітіобіс 2-нітробензойної кислоти.

Література

1. Разыграев А.В., Матросова М.О., Титович И.А. Роль глутатионпероксидаз в ткани эндометрия: факты, гипотезы, перспективы изучения // Журнал акушерства и женских болезней. – 2017. – Т. 66, № 2. – С. 104-111.

2. Карбышев М.С., Абдуллаев Ш.П. Биохимия оксидативного стресса: учебно-методическое пособие – М.: ФГБОУ ВО РНИМУ имени Н. И. Пирогова Минздрава России, 2018. – 60 с.

3. Разыграев А.В. Метод определения глутатионпероксидазной активности с использованием пероксида водорода и 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислоты // Клинико-лабораторный консилиум. – 2004. – №. 4. – С. 19-22.

2.2.3.4. Визначення активності глутатіонредуктази у кістковій тканині

Глутатіонредуктаза (КФ 1.8.1.7) – фермент глутатіонової антиоксидантної системи, який відновлює дисульфід глутатіону GS-SG до його сульфгідрильної форми GSH за рахунок енергії НАДФ-Н, який утворюється у пентозному шляху. Глутатіонредуктаза складається з двох однакових субодиниць з молекулярною масою 50-55 кДа, проміжок між якими займає оксилений глутатіон. Фермент знаходиться у цитоплазмі й мітохондріях більшості клітин організму. У клітинах з підвищеним оксидативним стресом для відновлення глутатіону глутатіонредуктазою використовується до 10 % споживаної глюкози.

Принцип методу

Глутатіонредуктаза каталізує відновлення окисненого глутатіону, використовуючи як відновний еквівалент окиснений глутатіон-кофактор за схемою: GSSG + 2НАДФ·Н = 2GSH + 2НАДФ.

Величина показника активності ферменту залежить від кількості відновленого глутатіона в середовищі інкубації. На спад екстинції при довжині 340 нм впливає інтенсивність окислення НАДФ-Н [1].

Реактиви

1. 0,05 М фосфатний буфер pH 7,4. Приготування:

– 0,57 г KH_2PO_4 + 3,75 г Na_2HPO_4 на 500 мл дистильованої H_2O;

– 0,285 г KH_2PO_4 + 1,875 г Na_2HPO4 на 250 мл дистильованої H_2O.

3. Глутатіон окиснений (*extempore*) 0,001 М (0,625 мг/1 мл дH_2O);

4. ЕДТА 0,006 М (40 мг на 50 мл дистильованої H_2O);

5. НАДФН 0,001 М (1 мг на 1 мл дистильованої H_2O).

Хід визначення

У досліджувані та контрольні пробірки розливають

- 0,05 М фосфатний буфер по 1,6 мл,
- ЕДТА – по 0,5 мл,
- НАДФН – по 0,2 мл,
- по 0,2 мл досліджуваної проби гомогената кісткової тканини (див. стор. 47 п. 2.2.1) в дослідні пробірки, а в контрольну 0,2 мл H_2O.

Прогрівають 20 хв. при 37° С в термостаті. Після прогрівання додають 0,5 мл окисненого глутатіона в дослідні проби, 0,5 мл дистильованої H_2O в контрольні проби. Вимірюють оптичну щільність на спектрофотометрі при довжині хвилі 340 нм, проти дистильованої H_2O на «нульовій» хвилині в діапазоні 0–1,0 од. опт. щільності та довжині оптичного шляху в кюветі 5 мм або 10 мм.

Поміщають в термостат на 60 хв. при 37°С. Потім знову вимірюють оптичну щільність при довжині хвилі 340 нм.

Розрахунок

$$A = \frac{n \cdot \Delta E \cdot 3 \cdot 1000}{6{,}22 \cdot 60 \cdot 0{,}2}$$

де:

А – активність глютатіонредуктази, ммоль/кг·хв;

ΔЕ – різниця екстинкції між контрольною та дослідною пробами, од. опт. щільності;

3 – об’єм інкубаційної суміші, мл;

60 – час реакції, хв;

6,22 – коефіцієнт екстинкції НАДФН при довжині хвилі 340 нм, см/мкМ;

0,2 – об’єм біологічного матеріалу, мл.

Активність глутатіонредуктази виражають у ммоль/кг. Одиниця активності глутатіонредуктази – це кількість ферменту, яка при 37^{o}С за 1 хвилину відновлює 1М GSSG.

Література:

1. Путилина Е.Ф. Определение активности глутатионредуктазы // Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / Под ред.М.И. Прохоровой. – Л.: Изд-во Ленингр.ун-та, 1982. – С.181-183.

2.2.3.5. Визначення вмісту малонового діальдегіду у кістковій тканині

Малоновий діальдегід (малондіальдегід) – альдегід з формулою $CH_2(CHO)_2$. Утворюється в організмі при деградації поліненасичених жирних кислот активними формами кисню. Вільнорадикальні та перекисні реакції – необхідна ланка транспорту електронів і синтезу простагландинів, лейкотриєнів, метаболізму катехоламінів, фагоциоза та ін. У вільнорадикальні реакції залучаються білки, нуклеїнові кислоти й, особливо, ліпіди, враховуючи наявності великої кількості їх у мембранах клітин. При дії патогенних факторів (запалення, ішемія, гіпоксія тощо) генерація перекисного окиснення ліпідів значно зростає, чим підсилюється ушкодження клітин. Ріст рівня ендогенних перекисів виступає в якості ушкоджуючого фактору, який порушує структуру

і функціональність мембран. В ході цих процесів утворюється діальдегіди типу малонового, які є мутагенами и мають виражену цитотоксичність через те, що, наприклад, малоновий діальдегід здатен вступати у реакцію з нуклеїновими кислотами, утворюючи мутагенні сполуки, фосфоліпідами і амінокислотами, пригнічує активність ферментів цитохрооксидази, гідролази та ін. [1, 2]. Визначення рівня малонового альдегіду у досліджувальних тканинах дозволяє оцінювати активацію перекисного окиснення жирів та пов'язаний з ним розвиток і інтенсифікацію реакцій оксидативного стресу.

Принцип методу

При високій температурі в кислому середовищі малоновий діальдегід реагує з 2-тіобарбітуровою кислотою, утворюючи забарвлений триметиловий комплекс, с максимумом поглинання при довжині хвилі 532 нм. Молярний коефіцієнт екстинкції цього комплексу $\varepsilon = 1{,}56\times10^5$ см$^{-1}$[3].

Реактиви

1. 0,05 М трис-HCl буфер трис (оксиметил)-амінометан гідрохлорид, pH 7,4, який містить 0,175 М хлориду калію. (3,028 г трис (оксиметил)-амінометан довести до 500 мл дистильованої H_2O, та довести pH до 7,4.
2. 17 % розчин трихлороцтової кислоти (ТХО);
3. 0,75 % розчин 2-тіобарбітурової кислоти (ТБК).

Хід визначення

Гомогенат кісткової тканини (див. стор. 47 п. 2.2.1) по 0,5 мл поміщають в центрифужні пробірки і осаджують білок додаванням 1,5 мл 17 % розчину ТХО (кінцева концентрація 5 %), додають 1,5

мл 0,75 % ТБК. Проби поміщають на 30 хв в киплячу водяну баню, охолоджують. Після цього осад відокремлюють центрифугуванням протягом 15 хв при 2500 об/хв. В якості контролю використовують проби, що містять замість зразка 0,5 мл води. Вимірюють оптичну щільність при довжині хвилі 530 нм на спектрофотометрі проти контрольної проби в діапазоні 0–1,0 од. опт. щільності та довжині оптичного шляху в кюветі 5 мм або 10 мм.

Розрахунок

Кількість малонового діальдегіду розраховують, використовуючи зазначену вище величину молярного коефіцієнта екстинкції, і отриманий результат виражають у ммоль на пробу:

$$C = \frac{E}{1{,}56 \cdot 10^{-5} \cdot m \cdot 0{,}5}$$

де:

С – концентрація в ммоль/кг;

Е – екстинкція дослідної проби, од. опт. щільності;

$1{,}56 \cdot 10^{-5}$ – коефіцієнт молярний;

0,5 – об’єм речовини, яку вносять, мл;

m – кількість тканини в 1 мл гомогената, г.

Література

1. Воейков В.Л. Активные формы кислорода – патогенны или целители? // Клиническая геронтология. – 2003. – Т. 9, № 3. – С. 27-40.

2. Карбышев М.С., Абдуллаев Ш.П. Биохимия оксидативного стресса: учебно-методическое пособие // ФГБОУ ВО РНИМУ имени Н. И. Пирогова Минздрава России. – М., 2018. – 60 с.

3. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Современные методы в биохимии. – Москва: Медицина. – 1977. – С. 66–68.

2.2.3.6. Визначення вмісту дієнових кон'югатів у кістковій тканині

Дієнові кон'югати жирних кислот – це сполуки на основі вуглеводного ланцюга, що мають два подвійні зв'язки, розділені двома одинарними зв'язками. Прискорення процесів перекисного окиснення ліпідів – одна з чинників дестабілізації мембран і розвитку патологій. Утворення дієнових кон'югатів жирних кислот з поліненасичених жирних кислот внаслідок вільно-радикального окиснення є першою стадією цього процесу, з яких при дії на них гідроксильних радикалів утворюються гідроперекиси ліпідів. Разом з вмістом триєнових кон'югатів і малонового діальдегіду рівень дієнових кон'югатів жирних кислот є інформаційним показником інтенсивності перекисного окислення жирів та ступеня оксидативного стресу.

Принцип методу

В ході перекисного окиснення на стадії утворення вільних радикалів в молекулах поліненасищенних вищих жирних кислот виникає система зв'язаних подвійних зв'язків, що супроводжується появою нового максимуму в спектрі поглинання при довжині хвилі 233 нм; $\varepsilon = 2{,}2 \cdot 10^{-5}$; $M = 1 \cdot см^{-1}$ [1].

Хід визначення

Готують органічну суміш: гептан–ізопропіловий спирт у співвідношенні 1:1 в об'ємі з розрахунку кількості досліджених проб. У високі пробірки з притертими пробками розливають по 5 мл суміші, додають 2 мл гомогенату кісткової тканини (див. стор.

47 п. 2.2.1). Струшують 2 хвилини по секундоміру. Залишають 5 хвилин прикімнатной температурі. У чисті пробірки відбирають 2 мл гептанової фази. Додають 1 мл етилового спирту. Оптичну щільність проб вимірюють на спектрофотометрі при довжині хвилі 233 нм в діапазоні 0–1,0 од. опт. щільності в кварцевих кюветах с довжиною оптичного ходу 10 мм. В якості контролю використовують 3 мл гептану.

Розрахунок:

$$C = \frac{\Delta E \cdot n}{2{,}2 \cdot 10^{-5}}$$

де:

С – вміст дієнових кон'югатів, ммоль/кг;

Е – екстинкція досліджуваної проби, од. опт. щільності;

1000 – коефіцієнт переведення грам в кг;

n – розведення;

$2{,}2 \cdot 10^{-5}$ – молярний коефіцієнт, $М^{-1} \cdot см^{-1}$

Література

1. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Современные методы в биохимии. – Москва: Медицина. – 1977. – С. 66–68.

Автори:

Макаренко Ольга Анатоліївна – доктор біол. наук, завідувач кафедри фізіології людини та тварин ОНУ імені І. І. Мечникова, завідувач лабораторії біохімії ДУ «ІСЧЛХ НАМН»

Хромагіна Лариса Миколаївна – кандидат біол. наук, старший науковий співробітник лабораторії біохімії ДУ «ІСЧЛХ НАМН»

Ходаков Ігор Володимирович – науковий співробітник лабораторії біохімії ДУ «ІСЧЛХ НАМН»

Майкова Ганна Вікторівна – доцент кафедри фізіології людини та тварин ОНУ імені І. І. Мечникова

Мудрик Любов Михайлівна – науковий співробітник лабораторії біохімії ДУ «ІСЧЛХ НАМН»

Кіка Владислав Володимирович – аспірант кафедри фізіології людини та тварин ОНУ імені І. І. Мечникова, інженер лабораторії біохімії та віварію ДУ «ІСЧЛХ НАМН»

Могілевська Тетяна Василівна – аспірант кафедри фізіології людини та тварин ОНУ імені І. І. Мечникова

УДК: [616.33:616.348]+611.018.4+59.085

© Макаренко О. А., Хромагіна Л.М., Ходаков І. В. та ін., 2022
© Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, 2022
© ДУ «Інститут стоматології та щелепно-лицевої хірургії НАМН», 2022