

РАЗРАБОТКА МЕТОДА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОГЕННЫХ АМИНОВ И ИХ МЕТАБОЛИТОВ В СТРУКТУРАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС**А. Ф. Рябуха, Е. А. Сучков, А. В. Мекеня, Е. В. Дьякова, Д. Г. Ковалев, Л. А. Смирнова***Лаборатория фармакокинетики, лаборатория психофармакологии НИИ фармакологии ВолГМУ*

Определение биогенных аминов в различном биологическом материале животных необходимо при оценке эффектов и механизмов действия новых психотропных лекарственных средств. Наиболее часто в качестве биологических объектов используются белые беспородные крысы. Наиболее эффективным для решения фармакодинамических задач является определение биогенных аминов и их метаболитов в различных структурах головного мозга.

Ключевые слова: биогенные амины, метод количественного определения, флуоресцентный детектор.

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR QUANTIFICATION BIOGENE AMINES AND THEIR METABOLITES IN RATS BRAIN STRUCTURES**A. F. Rjabuha, E. A. Suchkov, A. V. Mekenja, E. V. Djakova, D. G. Kovalev, L. A. Smirnova**

Analysis of the low levels of biogenic amines and metabolites in tissue and biological fluids has necessitated the use of highly sensitive analytical techniques. We describe a sensitive, simple and selective high-performance liquid-chromatographic method for measuring noradrenaline, dopamine, serotonin, 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid, 5-hydroxyindolacetic acid in brain tissue of rats.

Key words: biogenic amines, quantification method, fluorescent detector.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Разработать метод определения биогенных аминов и их метаболитов в одной пробе в структурах головного мозга крыс при помощи жидкостного хроматографа с флуоресцентным детектором RF 10-AxI (Shimadzu, Япония).

Структуры головного мозга крыс имеют малую массу (от 20 до 100 мг), и концентрация в них биогенных аминов очень низка, что значительно усложняет работу, связанную с подготовкой пробы и дальнейшим анализом. В связи с этим метод количественного определения должен иметь высокую чувствительность, возможность работы с малыми объемами проб, большую специфичность и избирательность, надежность, воспроизводимость и универсальность [2]. Данным требованиям отвечает метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), являющийся одним из основных аналитических методов при анализе биогенных аминов [1, 4].

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на 20 беспородных крысах обоего пола массой 200—220 г, содержащихся в стандартных условиях вивария. Из мозга крыс выделяли фронтальную кору, прилежащее ядро, стриатум и гипоталамус. Структуры мозга охлаждались в жидком азоте и хранились при температуре -20 °С не более недели [3].

В работе использовались стандарты норадреналина (Sigma, США), допамина (Sigma, США), серо-

тонина (Sigma, США), дигидроксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) (Sigma, США), гидроксииндолуксусной кислоты (ГИУ) (Sigma, США). Количественное определение проводилось на жидкостном хроматографе с флуоресцентным детектором RF 10-AxI (Shimadzu, Япония), на колонке Supelcosil LC-18 (5 мкм; 100*4,6 мм).

Мобильная фаза содержала 5 % ацетонитрила для ВЭЖХ (УФ 210 нм) (Россия) и 95 % буферной системы, состоящей из однозамещенного фосфата калия 50 мМ, pH 3,0. Хроматографирование проводили при скорости потока 1 мл/мин. В результате исследований была подобрана оптимальная температура анализа 30 °С. В качестве анализата использовали 20%-е гомогенаты структур мозга в 0,1 н HClO₄, получаемые на гомогенизаторе Silent Crusher (Германия).

Исследуемые вещества определялись при длине волны экстинкции 280 нм и длине волны эмиссии 320 нм. Идентификацию исследуемых веществ и расчет концентраций проводили по методу абсолютных стандартов. Для повышения пределов обнаружения допамина, норадреналина и ДОФУК использовали метод твердофазной экстракции. С этой целью к 1 мл гомогената добавляли 50 мкл 0,1%-го раствора метабисульфита калия, 400 мкл 1М трис-буфера, 10 мг адсорбента (оксид алюминия), встряхивали 10 минут на встряхивателе RS-24 (Латвия), затем разделяли на центрифуге CM-50 (Латвия) при 2000 об/мин в течение 3 минут. Десорбцию биогенных аминов проводили 100 мкл 0,1М HClO₄ и надосадочную жидкость подвергали хроматографическому разделению.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Нами был разработан метод ВЭЖХ с флуоресцентным детектированием для определения биогенных аминов и их метаболитов. Использование флуоресцентного детектора дает возможность повысить чувствительность и селективность, снизить предел определения и детектировать все вещества в одной пробе (рис. 1).

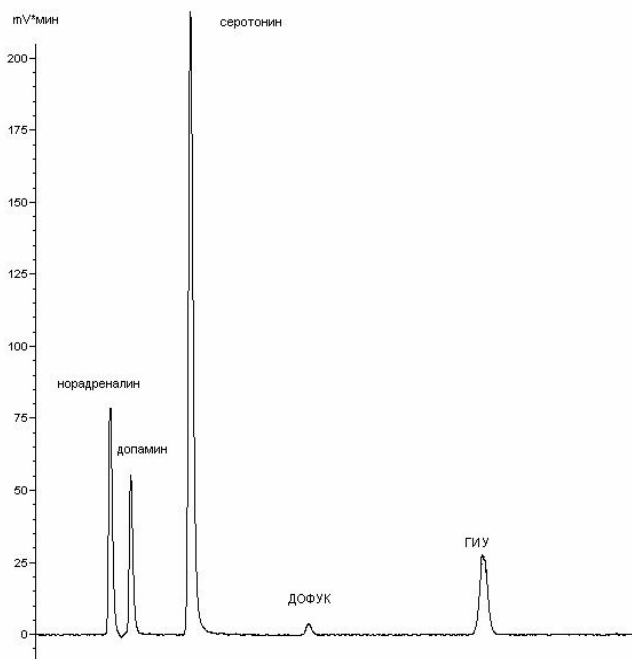


Рис. 1. Хроматограмма биогенных аминов и их метаболитов, полученная на жидкостном хроматографе с флуоресцентным детектором RF 10-AxI (Shimadzu, Япония), на колонке Supelcosil LC-18 при длине волны экстинкции 280 нм и длине волны эмиссии 320 нм

Разработанный метод позволяет определять с достаточной чувствительностью пять биогенных аминов и их метаболитов в одной пробе в структурах головного мозга крыс.

Предел обнаружения составил для норадреналина 100 пг/мл, для допамина 250 пг/мл, для ДОФУК 20 нг/мл, для серотонина 4 нг/мл и для ГИУ 12 нг/мл (табл.). Коэффициенты регрессии для определяемых веществ находятся в диапазоне от 0,995 до 0,999 (рис. 2).

Качественные и количественные показатели методики определения биогенных аминов и их метаболитов в структурах головного мозга крыс представлены в табл.

Разработанный метод позволил определить базальный уровень биогенных аминов и их метаболитов в структурах мозга крыс (рис. 3).

Аналитические характеристики количественного определения биогенных аминов в структурах мозга крыс с использованием метода ВЭЖХ с флуоресцентным детектором

Биогенный амин	Чувствительность, нг/мл	Степень извлечения, %	Время удерживания, мин	Коэффициент селективности
Норадреналин	100	99	3,6	0,82
Допамин	250	99	4,4	0,82
ДОФУК	20	97	14,7	0,24
Серотонин	4	99	8,0	0,45
ГИУ	12	98	25,2	0,14

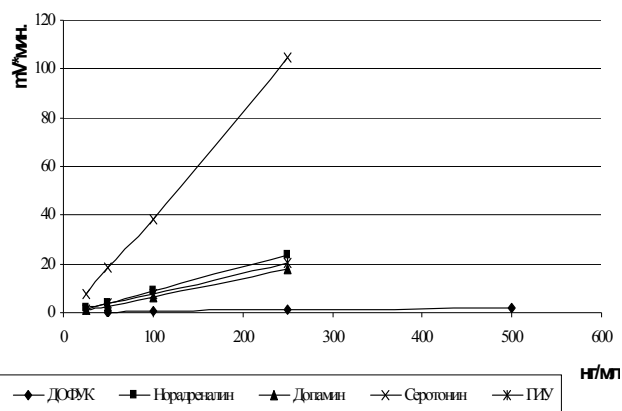


Рис. 2. Зависимость площади под пиком от концентрации биогенных аминов и их метаболитов

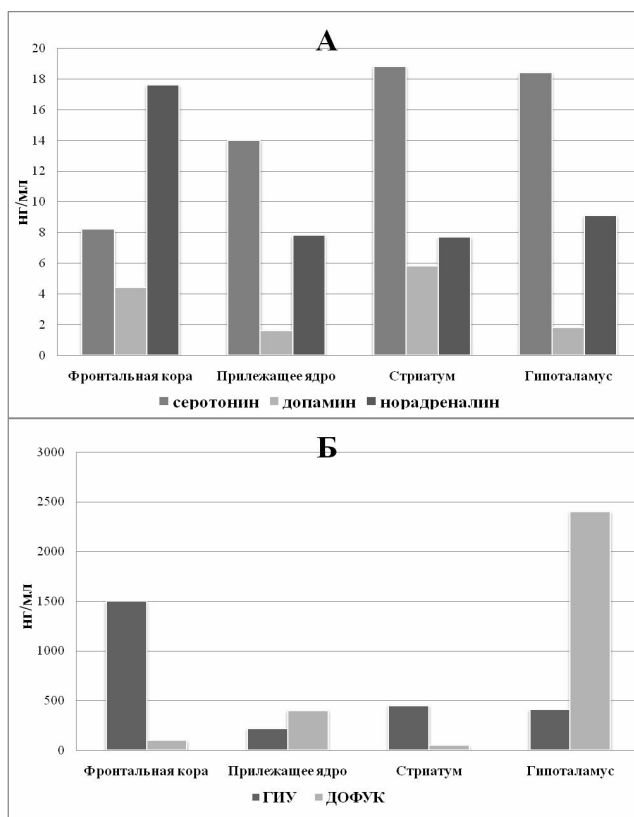


Рис. 3. Базальный уровень биогенных аминов (А) и их метаболитов (Б) в структурах головного мозга крыс

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, разработан чувствительный и селективный метод определения биогенных аминов и их метаболитов в структурах головного мозга крыс, который может быть использован для проведения исследований в области создания новых психотропных лекарственных средств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная фармакопея СССР. — XI изд. — М.: Медицина, 1987. — Вып. 1. — 336 с.

2. Зех К. Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии / Под ред. А. Хеншен и др., пер. с англ. А. П. Синицына. — М.: Мир, 1988. — С. 350—382.

3. Ковалев Г. И. Изучение роли межмедиаторных взаимодействий в механизме формирования эффектов ноотропных средств: Автореф. дис. ... доктора мед. наук. — М., 1993. — 34 с.

4. Peaston R. T., Weinkove C. // Ann. Clin. Biochem. — 2004. — № 41. — P. 17—38.

Контактная информация:

Ковалев Дмитрий Геннадьевич — к. м. н., зав. лабораторией психофармакологии ВолГМУ, e-mail: kovalev_dmi@mail.ru

УДК 614.21:681(470.45)

АВТОМАТИЗИРОВАННАЯ СИСТЕМА МОНИТОРИНГА КАЧЕСТВА МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ В СТАЦИОНАРНЫХ МЕДИЦИНСКИХ УЧРЕЖДЕНИЯХ

В. И. Сабанов, В. В. Иваненко

Кафедра общественного здоровья и здравоохранения ВолГМУ

Представлена модель мониторинга экспертизы качества и технологии оказания медицинской помощи в стационаре с помощью автоматизированной информационной системы. Проанализированы результаты экспертизы качества оказания медицинской помощи в стационарных медицинских учреждениях города Волгограда за 2008 и 2009 годы.

Ключевые слова: качество медицинской помощи, стационар, формализация экспертизы, мониторинг.

THE AUTOMATED SYSTEM OF MONITORING MEDICAL AID QUALITY IN IN-PATIENT MEDICAL INSTITUTIONS

V. I. Sabanov, V. V. Ivanenko

A model monitoring the quality and technology of rendering medical aid in a hospital by means of an automated information system is presented. The results of examination of quality of rendering medical aid in in-patient medical institutions in the Volgograd city for the period of 2008 and 2009 are analyzed.

Key words: medical aid quality, hospital, formalization of examination, monitoring.

Внедрение эффективных методик экспертизы качества лечебно-диагностического процесса в стационарах позволяет оптимизировать и повысить эффективность их деятельности [1, 2]. При этом особое внимание уделяется использованию единой унифицированной технологии проведения экспертиз для различных служб и профилей стационарной помощи. Такой подход обеспечивает взаимодействие экспертов различных уровней и направлений и позволяет объективно оценивать и сравнивать качество работы лечебно-профилактических учреждений.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Научное обоснование, разработка и внедрение автоматизированной информационной системы по оценке результатов экспертизы качества и технологии оказания медицинской помощи в стационарах.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Для реализации поставленной цели разработаны экспертная унифицированная формализованная карта, группы процессуальных индикаторов и интегрированный показатель, математическая модель их весовых характеристик. На этой платформе реализована и внедрена автоматизированная информационная система по оценке результатов экспертизы качества и технологии оказания медицинской помощи в стационаре (АИС КМП «Стационар») и сформирована база данных результатов проведенных экспертиз в разрезе отдельных учреждений и Волгограда в целом.

Для анализа полученной информации и количественного выражения качественных характеристик был использован метод квантификации, то есть оцен-