



A. Г. Сыса, В. А. Стельмах,
Е. К. Власенко, А. В. Бакунович

МЕТОДЫ КЛИНИЧЕСКОЙ БИОХИМИИ И БИОФИЗИКИ



Учреждение образования
«Международный государственный экологический
институт имени А. Д. Сахарова»
Белорусского государственного университета

А. Г. Сыса, В. А. Стельмах,
Е. К. Власенко, А. В. Бакунович

МЕТОДЫ КЛИНИЧЕСКОЙ БИОХИМИИ И БИОФИЗИКИ

Лабораторный практикум

Минск
«ИВЦ Минфина»
2018

УДК 577 (076)
ББК 28.07
С95

Р е ц е н з е н т ы:

доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник
Республиканского унитарного предприятия «Научно-практический центр
гигиены» *В. В. Шевляков*;

доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой
экологической медицины и радиобиологии *А. Н. Батян*

Сыса, А. Г.

С95 Методы клинической биохимии и биофизики : лабораторный
практикум / А. Г. Сыса, В. А. Стельмах, Е. К. Власенко [и др.]. –
Минск : ИВЦ Минфина, 2018. – 129 с.
ISBN 978-985-7205-90-5.

Практикум содержит 13 лабораторных работ, которые включают перечень используемых приборов, химической посуды, материалов и реактивов; описание методики проведения эксперимента; теоретическую часть; вопросы для усвоения основных положений конкретной работы; список рекомендуемой литературы.

Предназначен студентам 5 курса для проведения лабораторных работ по дисциплине «Методы клинической биохимии и биофизики».

Материал всех лабораторных занятий написан авторами настоящего издания совместно.

УДК 577 (076)
ББК 28.07

ISBN 978-985-7205-90-5

© Сыса А. Г., Стельмах В. А.,
Власенко Е. К., Бакунович А. В., 2018
© МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ, 2018

СОДЕРЖАНИЕ

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1.	
ОБЩЕКЛИНИЧЕСКИЕ ЛАБОРАТОРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	4
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2.	
МЕТОДЫ КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНОЙ ГЕМАТОЛОГИИ.....	15
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3.	
КЛИНИЧЕСКИЕ ПРИЛОЖЕНИЯ ЭЛЕКТРОХИМИИ, ИССЛЕДОВАНИЯ ЭЛЕКТРОЛИТОВ	33
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4.	
ПРИМЕНЕНИЕ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ КИСЛОТНО-ОСНОВНОГО БАЛАНСА И ГАЗОВ КРОВИ.....	44
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 5.	
ОСНОВЫ ФОТОМЕТРИИ.....	53
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 6.	
КЛИНИЧЕСКАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ.....	60
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 7.	
ХРОМАТОГРАФИЯ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ	69
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 8.	
ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА	76
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 9.	
КЛИНИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ...	86
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 10.	
ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ	91
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 11.	
МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ	104
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 12.	
ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ (ПЦР).....	113
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 13.	
АВТОМАТИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	125

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1.

ОБЩЕКЛИНИЧЕСКИЕ ЛАБОРАТОРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Цель: определение основных качественных и количественных параметров мочи, характеризующих общее состояние организма.

Оборудование и материалы: микроскоп, стекла предметные, пробирки стеклянные, микропипетки автоматические, центрифуга UNIVERSAL, «Глюкотест», урومتر.

Реактивы: сульфосалициловая кислота, 20 % раствор йода, 1 % спиртовой раствор.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Общий анализ мочи – лабораторное исследование мочи, проводимое для нужд медицинской практики, как правило, с диагностической целью. Включает органолептическое, физико-химическое и биохимическое исследования, а также микробиологическое исследование и микроскопическое изучение мочевого осадка.

Общие сведения

Моча – биологическая жидкость, в составе которой из организма выводятся продукты обмена веществ. Моча образуется путём фильтрации плазмы крови в капиллярных клубочках и обратного всасывания (реабсорбции) большинства растворенных в ней веществ и воды в канальцах первого порядка (проксимальных) и секреции в канальцах второго порядка (дистальных). Состав мочи коррелирует с составом крови, отражает работу почек, а также состояние мочевых путей. *Диурез* – выделение мочи за единицу времени. Различают суточный, дневной и ночной диурез.

Правила сбора мочи

Для анализа следует использовать утреннюю мочу, которая в течение ночи собирается в мочевом пузыре, что позволяет исследуемые параметры считать объективными. Перед сбором обязательно следует сделать тщательный туалет половых органов. Для сбора предпочтительно использовать промышленно произведенные стерильные контейнеры для биопроб, которые можно купить в аптеке. Анализ должен быть выполнен в течение 1,5 часов после сбора мочи.

Перед сдачей мочи на анализ запрещается применение лекарственных препаратов, так как некоторые из них оказывают влияние на результаты биохимических исследований мочи.

Транспортировка мочи должна производиться только при плюсовой температуре, в противном случае выпадающие в осадок соли

могут быть интерпретированы как проявление почечной патологии, либо совершенно затрудняют процесс исследования. В таком случае («перемороженная моча») анализ придется повторить.

Основные показатели

Органолептическое исследование

Количество

Суточный диурез колеблется в пределах 70–80 % выпитой жидкости, что соответствует 1,5–2 л, при обычном питании.

- *Полиурия* – увеличение суточного диуреза.

Физиологическое состояние: приём большого количества жидкости, употребление продуктов, повышающих выделение мочи.

Патологическое состояние: нервное возбуждение, рассасывание отёков, транссудатов, экссудатов, постлихорадочные состояния, при сахарном и не сахарном диабете.

- *Олигурия* – уменьшение суточного диуреза до 500 мл.

Физиологическое состояние: ограниченный приём жидкости, усиленное потоотделение.

Патологическое состояние: диспепсические, лихорадочные состояния, заболевания сердца, острая печёночная недостаточность, нефросклероз, заболевания почек.

- *Анурия* – суточный диурез составляет не более 50 мл в сутки.

Патологическое состояние: острая почечная недостаточность, тяжелые нефриты, менингиты, отравления, закупорка мочевыводящих путей камнем, опухолью, спазм мочевыводящих путей.

- *Поллакиурия* – частое мочеиспускание.

Физиологическое состояние: прием большого количества жидкости, нервное возбуждение.

Патологическое состояние: воспаление мочевыводящих путей, простуда.

- *Олакизурия* – редкое мочеиспускание.

Патологическое состояние: нервно рефлекторные нарушения.

- *Дизурия* – болезненное мочеиспускание.

Патологическое состояние: вульвовагинит, уретрит, и другие воспалительные заболевания мочевыводящей системы.

- *Никтурия* – превышение ночного диуреза над дневным.

Физиологическое состояние: у детей до года – двух лет.

Патологическое состояние: начальная стадия сердечной декомпенсации, циститы, цистопиелиты.

- *Энурез* – недержание мочи.

Физиологическое состояние: у детей ночные недержания мочи до года – двух лет.

Патологическое состояние: воспаление мочевых путей, судороги, тяжёлые лихорадочные состояния, заболевания ЦНС.

Цвет

Цвет мочи в норме колеблется от соломенного до насыщенного жёлтого, он определяется присутствием в ней красящих веществ – урохромов, концентрация которых в основном и определяет интенсивность окраски (уробилин, урозеин, уроэритрин). Насыщенный жёлтый цвет обычно указывает на относительно высокую плотность и концентрированность мочи. Бесцветная или бледная моча имеет низкую плотность и выделяется в большом количестве.

Изменение окраски мочи может быть связано с рядом патологических состояний. В зависимости от наличия в моче не встречающихся в норме пигментов, ее цвет может быть синим, коричневым, красным, зеленым и пр. Потемнение мочи до темно-бурого цвета характерно для больных с желтухой, чаще обтурационной или паренхиматозной, например, при гепатите. Это связано с неспособностью печени разрушать весь мезобилиноген, который в большом количестве появляется в моче и, превращаясь на воздухе в уробилин, обуславливает ее потемнение.

Красный или розово-красный цвет мочи, похожей на мясные помои, говорит о наличии в ней крови (*макрогематурия*); это может наблюдаться при гломерулонефрите и других патологических состояниях. Темно-красная моча бывает при гемоглобинурии вследствие переливания несовместимой крови, гемолитического криза, синдрома длительного сдавливания и др. Кроме того, красная моча бывает при порфирии. Черная окраска, появляющаяся при стоянии на воздухе, характерна для алкаптонурии. При большом содержании жира моча может напоминать разбавленное молоко. Серовато-белый цвет мочи может быть обусловлен присутствием в ней гноя (*пиурия*). Зелёный или синий цвет может отмечаться при усилении процессов гниения в кишечнике, когда в моче появляется большое количество индоксилсерных кислот, разлагающихся с образованием индиго; или вследствие введения в организм метиленового синего.

Другими причинами изменения окраски мочи является употребление некоторых продуктов питания и приём отдельных лекарственных препаратов. Например, красный цвет мочи может быть обусловлен приемом в пищу свёклы или приемом таких лекарственных препаратов, как амидопирин, антипирин, сантонин, фенилин, больших доз ацетилсалициловой кислоты. Морковь, рифампицин, фурагин,

фурадонин могут обусловить оранжевый цвет, метронидазол – темно-коричневый.

Запах

- запах ацетона – кетонурия;
- запах фекалий – инфекция кишечной палочкой;
- запах зловонный – свищ между мочевыми путями и гнойными полостями и (или) кишечником;
- запах потных ног – глутаровая ацидемия (тип II), изовалериановая ацидемия;
- мышинный (или затхлый) запах – фенилкетонурия;
- запах кленового сиропа – болезнь кленового сиропа;
- капустный запах (запах хмеля) – мальабсорбция метионина (болезнь хмелесушилки);
- запах гниющей рыбы – триметиламинурия;
- запах прогорклый рыбный – тирозинемия;
- запах плавательного бассейна – хокинсинурия;
- запах аммиака – цистит.

Пенистость

При взбалтывании мочи на её поверхности образуется пена. У нормальной мочи она необильная, прозрачная и нестойкая. Присутствие в моче белка ведёт к образованию стойкой, обильной пены. У больных с желтухой пена, как правило, окрашена в жёлтый цвет.

Прозрачность

Моча в норме прозрачна. Мутность может быть вызвана бактериями, эритроцитами, клеточными элементами, солями, жиром, слизью. Причины помутнения, как правило, устанавливаются с помощью простых методик:

- при нагревании или добавлении щёлочи исчезает мутность, вызванная **уратами**;
- при добавлении уксусной кислоты исчезает мутность, обусловленная выпадением **фосфатов**;
- при добавлении соляной кислоты – **оксалатов**. Если муть исчезает при добавлении спирта или эфира, это может указывать на присутствие в моче жира;
- муть, связанная с наличием гноя, не исчезает ни при нагревании, ни при добавлении кислот, а добавление щёлочи вызывает образование густой стекловидной массы.

Более точно причины помутнения позволяет установить микроскопическое исследование мочевого осадка.

Физико-химическое исследование

Плотность. В норме плотность мочи составляет 1010–1025 г/л. Плотность может быть повышена при обезвоживании. Сниженная плотность может свидетельствовать о почечной недостаточности.

Повышение температуры в помещении приводит к повышению относительной плотности мочи. Повышают относительную плотность: 1 % сахара в моче на 0,004; 3 г/л белка в моче – на 0,001. В норме относительная плотность мочи колеблется в течение дня, принимая утром максимальные значения, а вечером минимальные. Постоянная пониженная/повышенная относительная плотность в течение дня называется – изо-гипо/гипер-стенурией.

Кислотность. Обычно показатель pH мочи колеблется от 5,0 до 7,0. Кислотность мочи сильно изменяется в зависимости от принимаемой пищи (например, прием растительной пищи обуславливает щелочную реакцию мочи), физической нагрузки и других физиологических и патологических факторов. Показатель кислотности мочи может служить диагностическим признаком.

Биохимическое исследование

Белок. Отклонением от нормы (протеинурия) считается присутствие белка в моче в концентрации более 0,033 г/л. Однако это связано с тем, что разрешающая способность широко применяемых в лабораторной практике методов определения концентрации белка в моче не позволяет обнаруживать белок в концентрации менее 0,033 г/л. В целом в утренней порции мочи концентрация белка обычно не превышает 0,002 г/л, а в суточной моче содержится не более 50–150 мг белка.

Протеинурия наблюдается при нарушении проницаемости клубочкового фильтра – гломерулярная протеинурия, при нарушении реабсорбции низкомолекулярных белков эпителием канальцев – тубулярная протеинурия при остром и хроническом гломерулонефрите, амилоидозе почек, диабетической нефропатии, системных заболеваниях соединительной ткани. Тубулярная протеинурия может быть обусловлена интерстициальным нефритом, токсическим повреждением канальцевого эпителия, а также возникать при наследственно обусловленных тубулопатиях. Кроме того, появление белка в моче может происходить при гнойных воспалительных процессах мочевыводящих путей, тяжёлой недостаточности кровообращения, нефропатии беременных, лихорадке. Также кратковременные эпизоды незначительной протеинурии могут проявляться при интенсивной физической нагрузке, быстрой перемене положения тела, при

перегревании или переохлаждении организма и после приёма значительного количества богатой неденатурированными белками пищи.

Микроскопическое исследование

Организованный осадок

В моче могут обнаруживаться:

- *Плоский* эпителий (клетки верхнего слоя мочевого пузыря) в норме единичный в поле зрения, если же его количество увеличено – это может говорить о цистите, дисметаболической нефропатии, лекарственной нефропатии.

- *Цилиндрический*, или *кубический* эпителий (клетки мочевых канальцев, лоханки, мочеточника). В норме – не обнаруживается, появляется при воспалительных заболеваниях. Так же *переходный* эпителий – выстилает мочевыводящие пути, мочевого пузыря. Наблюдается при циститах, уретритах и других воспалительных заболеваниях мочевыделительной системы.

- *Эритроциты*. Повышенное содержание эритроцитов в моче, называемое *микрогематурией* в случае небольшого количества эритроцитов и *макрогематурией* в случае их значительного содержания, является патологией, указывающей на заболевание почек или мочевого пузыря, либо на кровотечение в какой-то части мочевыделительной системы. В норме у женщин – единично в препарате, у мужчин – нет.

Эритроциты могут быть неизмененные, то есть содержащие гемоглобин, и измененные, свободные от гемоглобина, бесцветные, в виде одноконтурных или двухконтурных колец. Такие эритроциты встречаются в моче низкой относительной плотности. В моче высокой относительной плотности эритроциты сморщиваются.

- *Лейкоциты*. Повышенное содержание лейкоцитов в моче называется лейкоцитурией и указывает на воспалительный процесс.

- *Лейкоцитурия* – до 20 в поле зрения, макроскопически моча не изменена.

- *Пиурия* – более 60 в поле зрения, при этом макроскопически моча мутная, желто-зелёная с гнилостным запахом.

Неорганизованный осадок

В кислой моче обнаруживаются:

- *Мочевая кислота* – кристаллы разнообразной формы (ромбической, шестигранной, в виде бочонков, брусков и др.), окрашенные в красно-бурый или желтовато-бурый цвет. Микроскопические кристаллы в осадке мочи имеют вид золотистого песка.

- *Ураты* – аморфные мочекислые соли – мелкие желтоватые, часто склеенные группами зернышки. Микроскопически ураты имеют вид плотного кирпично-розового осадка.

- *Оксалаты* – бесцветные кристаллы в форме почтовых конвертов – октаэдров.

- *Сернокислая известь* – тонкие, бесцветные иглы или розетки.

В щелочной и нейтральной моче обнаруживаются:

- *Фосфаты* – аморфные массы солей сероватого цвета (мелкозернистые). Микроскопически – осадок белого цвета.

- *Трипельфосфаты* – бесцветные яркие кристаллы в виде гробовых крышек или длинных призм.

- *Мочекислый аммоний* – желтые непрозрачные шары с шипами на поверхности.

Цилиндрурия

- *Гиалиновые цилиндры* – мукопротеин Тамма–Хорсфалла, продуцируемый клетками канальцев и свернувшийся в их просвете. В норме – единичные. Появляются при физической нагрузке, лихорадке, ортостатической протеинурии, нефротическом синдроме, различных заболеваниях почек.

- *Зернистые цилиндры* – перерожденные и разрушенные клетки почечных канальцев на гиалиновых цилиндрах или агрегированных сывороточных белках. Появляются при тяжелых дегенеративных поражениях канальцев.

- *Восковые цилиндры* – белок, свернувшийся в канальцах с широким просветом. Появляются при поражении эпителия канальцев, чаще хронических, нефротическом синдроме.

- *Эпителиальные цилиндры* – слущенный эпителий почечных канальцев. Появляются при тяжелых дегенеративных изменениях канальцев при гломерулонефрите, нефротическом синдроме.

- *Эритроцитарные цилиндры* – эритроциты, наслоившиеся на цилиндры, чаще гиалиновые. Появляются при почечном генезе гематурии.

- *Лейкоцитарные цилиндры* – лейкоциты, наслоившиеся на цилиндры или удлиненные конгломераты из лейкоцитов с фибрином и слизью. Появляются при почечном генезе лейкоцитурии.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Назовите показатели анализа мочи здорового человека.
2. При каких патологических состояниях может быть гиперстенурия?

3. При каких патологических состояниях появляется гипостенурия?

4. Диагностическое значение цвета мочи:

а) красно-бурого цвета;

б) цвета «пива»;

в) «мясных помоев»;

г) бледная, водянистая;

д) беловатая.

5. Чем может быть обусловлено помутнение мочи?

6. При каких патологических состояниях появляется фруктовый и аммиачный запах мочи?

7. Признаком каких патологических состояний может быть появление протеинурии?

8. При каких заболеваниях наблюдается клубочковая протеинурия, избыточная протеинурия?

9. Диагностическое значение глюкозурии.

10. Каково диагностическое значение лейкоцитурии?

ЛИТЕРАТУРА

1. *Назаренко Г. И., Кишкун А. А.* Лабораторные методы диагностики неотложных состояний / Г. И. Назаренко, А. А. Кишкун. – М.: Медицина, 2002.

2. *Лившиц В. М., Сидельникова В. И.* Медицинские лабораторные анализы / В. М. Лившиц, В. И. Сидельникова. – М.: ТРИАДА-Х, 2000.

3. Медицинская лабораторная диагностика: программы и алгоритмы / под ред. А. И. Карпищенко. – СПб.: Интермедика, 1997.

4. Клиническая биохимия / под ред. В. А. Ткачука. – М.: Геотар-Мед, 2004.

5. Медицинские лабораторные технологии / под ред. А. И. Карпищенко. – СПб.: Интермедика, 1990.

6. *Камышников В. С.* Клинико-биохимическая лабораторная диагностика: справочник / В. С. Камышников. – в 2-х т. – Минск: Интерпрессервис, 2003.

ХОД РАБОТЫ

Задание I. Исследование общих свойств мочи.

1. Определение количества мочи. Норма: 0,8–1,5 л/сут.

2. Определение цвета мочи. Норма: соломенно-желтый, желтый.

3. Определение мутности мочи. Норма: слегка мутная.

4. С помощью урометра определяют удельный вес мочи.

Принцип метода

Метод основан на сравнении плотности мочи с плотностью воды, которая принята за 1. Урометр имеет шкалу (обычно от 1,000 до 1,050) и отметку о температуре, при которой он был калиброван. Мочу наливают в цилиндр, избегая появления пены. Если пена образовалась, ее снимают фильтровальной бумагой. Урометр погружают в цилиндр, не допуская его прилипания к стенкам цилиндра. Относительную плотность определяют по положению нижнего мениска на шкале урометра после полного прекращения его колебаний в цилиндре (рис. 2.1). Норма: 1,015–1,020.

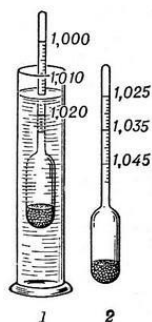
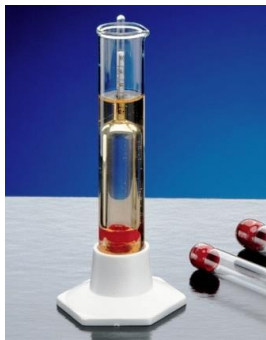


Рис. 1.1. Ареометр-урометр для определения плотности мочи

Задание II. Химическое исследование мочи.

Для химического исследования мочу отливают в центрифужную пробирку и центрифугируют при 3500 об/мин. в течение 3 минут. Для анализа отбирают центрифугат.

КАЧЕСТВЕННАЯ ПРОБА С СУЛЬФОСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ НА БЕЛОК В МОЧЕ

Принцип метода

Метод основан на осаждении белка минеральной кислотой; образовавшееся помутнение указывает на наличие белка в моче. В нормальной моче содержится небольшое количество белка, которое не обнаруживается обычными лабораторными методами.

Порядок выполнения работы

1. В две пробирки наливают по 3–4 мл центрифугата мочи.
2. В опытную пробирку прибавляют 6–8 капель сульфосалициловой кислоты. Вторая пробирка является контролем.
3. В опытной пробирке моча, содержащая белок, мутнеет (положительная проба). Результат читают на темном фоне.

КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ПРИСУТСТВИЕ ГЛЮКОЗЫ В МОЧЕ

Анализ проводится на индикаторной бумаге «Глюкотест». Реактивная бумага «Глюкотест» применяется для экспресс анализа содержания глюкозы в моче, имеет полосу светло-желтого цвета, пропитанную раствором ферментов и красителя.

Принцип метода

Метод основан на специфическом окислении глюкозы с помощью фермента глюкозооксидазы. Образовавшаяся при этом перекись водорода разлагается вторым ферментом пероксидазой и окисляет добавленный краситель. Изменение окраски красителя при окислении будет свидетельствовать о присутствии глюкозы в моче.

Рекомендуется исследовать свежесобранную мочу, взятую до приема пищи.

Порядок выполнения работы

1. Полоску «Глюкотеста» погружают в испытуемую мочу так, чтобы желтая полоса полностью смочилась.
2. Немедленно извлекают полоску из жидкости.
3. По истечении 2 минут сравнивают изменившуюся окраску на полоске с цветной шкалой.
4. Содержание глюкозы в моче определяют по наиболее совпадающему со шкалой цвету полоски.

КАЧЕСТВЕННАЯ ПРОБА НА БИЛИРУБИН В МОЧЕ ПО РЕАКЦИИ СО СПИРТОВЫМ РАСТВОРОМ ЙОДА

Принцип метода

Метод основан на окислении билирубина мочи в биливердин под действием йода.

Порядок выполнения работы

1. В пробирку наливают 3–4 мл мочи и осторожно настилают раствор йода.
2. При наличии билирубина на границе между обеими жидкостями образуется зеленое кольцо – проба считается положительной.

Задание III. Микроскопическое исследование мочи.

Для микроскопического исследования мочи используют осадок, образующийся после ее центрифугирования.

Порядок выполнения работы

1. На сухое обезжиренное предметное стекло наносят 1–2 капли осадка мочи.

2. Предметное стекло помещают под микроскоп и учитывают содержание эритроцитов, лейкоцитов, эпителия, солей в препарате.

Нормы содержания клеток и соединений:

1. Эритроциты – единичные в препарате.
2. Лейкоциты – до 8 в поле зрения.
3. Эпителий (цилиндры) – единичные в препарате.
4. Соли (ураты, фосфаты) – указываются если есть.

ОФОРМЛЕНИЕ РАБОТЫ

1. Кратко записать теоретические данные.
2. Описать ход работы.
3. Сделать выводы по работе.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2.

МЕТОДЫ КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНОЙ ГЕМАТОЛОГИИ

Цель: определение основных количественных параметров эритроцитов и лейкоцитов крови, характеризующих общее состояние организма.

Оборудование и материалы: аппарат Панченкова, микроскоп, камера Горяева, стекла предметные, спектрофотометр SOLAR, кюветы полистерольные, пробирки стеклянные, штативы для пробирок, автоматические микропипетки, палочки стеклянные, пинцет, штатив для сушки мазков.

Реактивы:

1. Трехзамещенный цитрат натрия ($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 5H_2O$), 5 % раствор.
2. Хлористый натрий, 0,9 % раствор.
3. Уксусная кислота (CH_3COOH), 3–5 % раствор, подкрашенный метиленовой синью.
4. Реактив 1:
 - D(-)-N-метилглюкаминовый буфер, 1,1 мМ рН 8,3 (25 °C).
 - Цианид калия, 0,8 мМ раствор.
 - Феррицианид калия, 0,5 мМ раствор.
5. Спирт этиловый, 96 % раствор.
6. Эозин метиленовый синий по Май-Грюнвальду, раствор.
7. Азур-эозин по Нохту, раствор.
8. Масло иммерсионное.
9. Вода дистиллированная.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Общий клинический анализ крови – самый распространенный анализ, сдавать который приходилось каждому человеку. Общий анализ крови широко используется как один из важных методов обследования при большинстве заболеваний, а в диагностике заболеваний системы кроветворения – ему отводится ведущая роль. Изменения, происходящие в крови, чаще всего неспецифичны, но в то же время отражают процессы, происходящие в целом организме.

Общий анализ крови включает:

- изучение количественного и качественного состава форменных элементов крови (клеток крови):
 - определение числа, размеров, формы эритроцитов и содержание в них гемоглобина;

- определение гематокрита (отношение объема плазмы крови и форменных элементов);
- определение общего числа лейкоцитов и процентного соотношения отдельных форм среди них (лейкоцитарная формула);
- определение числа тромбоцитов.
- исследование СОЭ (скорости оседания эритроцитов).

Подготовка к исследованию: специальной подготовки к исследованию не требуется. Рекомендуется осуществлять забор крови утром натощак или как минимум через 2 часа после последнего приема пищи.

Клеточный состав крови здорового человека довольно постоянен. Поэтому различные его изменения, наблюдаемые при заболеваниях, могут иметь важное диагностическое значение. При некоторых физиологических состояниях организма качественный и количественный состав крови может меняться (беременность, менструация). Однако небольшие колебания происходят в течение дня под влиянием приема пищи, работы и т. п. Чтобы устранить влияние этих факторов, кровь для повторных анализов следует брать в одно и то же время и при одинаковых условиях.

Основные показатели

Гемоглобин

Гемоглобин – основной компонент эритроцитов (красных кровяных клеток крови), представляет собой сложный белок, основная функция которого состоит в переносе кислорода от легких к тканям, а также в выведении углекислого газа (CO_2) из организма и регуляции кислотно-основного состояния.

Единицы измерения: г/л.

Таблица 2.1

Референсные (нормальные) значения уровня гемоглобина

Возраст	Пол	Уровень гемоглобина, г/л
Менее 2 недель		134–198
2 недели – 1 месяц		107–171
1–2 месяца		94–130
2–4 месяца		103–141
4–6 месяцев		111–141
6–9 месяцев		114–140
9–12 месяцев		113–141
1–6 лет		110–140
6–9 лет		115–145
9–12 лет		120–150

Продолжение табл. 2.1

Возраст	Пол	Уровень гемоглобина, г/л
12–15 лет	Ж	115–150
	М	120–160
15–18 лет	Ж	117–153
	М	117–166
18–45 лет	Ж	117–155
	М	132–173
45–65 лет	Ж	117–160
	М	131–172
Старше 65 лет	Ж	117–161
	М	126–174

Повышение уровня гемоглобина:

- заболевания, сопровождающиеся увеличением количества эритроцитов (первичные и вторичные эритроцитозы);
- сгущение крови (обезвоживание);
- врожденные пороки сердца, легочно-сердечная недостаточность;
- курение;
- физиологические причины (у жителей высокогорья, летчиков после высотных полетов, альпинистов после повышенной физической нагрузки).

Снижение уровня гемоглобина (анемия):

- повышенные потери гемоглобина при кровотечениях – геморрагическая анемия;
- повышенное разрушение (гемолиз) эритроцитов – гемолитическая анемия;
- нехватка железа, необходимого для синтеза гемоглобина, или витаминов, участвующих в образовании эритроцитов (преимущественно В12, фолиевая кислота);
- нарушение образования клеток крови при специфических гематологических заболеваниях.

Эритроциты

Эритроциты (красные кровяные тельца) – наиболее многочисленные форменные элементы крови, содержащие гемоглобин, транспортирующие кислород и углекислый газ.

Единицы измерения: $\times 10^{12}$ клеток/л.

Таблица 2.2

Референсные значения количества эритроцитов в крови

Возраст	Пол	Уровень эритроцитов, $\times 10^{12}$ клеток/л
Менее 2 недель		3,9–5,9
2 недели – 1 месяц		3,3–5,3
1–4 месяца		3,0–5,1
4–6 месяцев		3,9–5,5
6–9 месяцев		4,0–5,3
9–12 месяцев		4,1–5,3
1–3 года		3,8–4,9
3–6 лет		3,7–4,9
6–9 лет		3,8–4,9
9–12 лет		3,9–5,1
12–15 лет	Ж	3,8–5,0
	М	4,1–5,2
15–18 лет	Ж	3,9–5,1
	М	4,2–5,6
18–45 лет	Ж	3,8–5,1
	М	4,2–5,6
45–65 лет	Ж	3,8–5,3
	М	4,2–5,6
Старше 65 лет	Ж	3,8–5,2
	М	3,8–5,8

Повышение уровня эритроцитов (эритроцитоз):

- абсолютные эритроцитозы, обусловленные повышенной продукцией эритроцитов;

- относительные – при сгущении крови, когда уменьшается объем плазмы при сохранении количества эритроцитов:

- дегидратация – обезвоживание (избыточная потливость, рвота, понос, ожоги, эмоциональные стрессы);

- алкоголизм;

- курение;

- системная гипертензия.

Понижение уровня (эритроцитопения):

- острые кровопотери;

- дефицитные анемии разной этиологии – в результате дефицита железа, белка, витаминов;

- гемолиз – разрушение клеток;

- может возникать вторично при разного рода хронических негематологических заболеваниях;

- количество эритроцитов может физиологически несколько снизиться после еды, в период между 17:00 и 7:00, а также при взятии крови в положении лежа.

Гематокрит

Гематокрит – это объемная фракция эритроцитов в цельной крови (соотношение объемов эритроцитов и плазмы), которая зависит от количества и объема эритроцитов.

Величина гематокрита широко используется для оценки степени выраженности анемии, при которой он может снижаться до 25–15 %. Но этот показатель нельзя оценивать вскоре после потери крови или гемотрансфузии (переливание крови), т. к. можно получить ложно повышенные или ложно заниженные результаты.

Единицы измерения: %.

Таблица 2.3

Референсные значения показателя гематокрита

Возраст	Пол	Показатель гематокрита, %
Менее 2 недель		41–65
2 недели – 1 месяц		33–55
1–2 месяца		28–42
2–4 месяца		32–44
4–6 месяцев		31–41
6–9 месяцев		32–40
9–12 месяцев		33–41
1–3 года		32–40
3–6 лет		32–42
6–9 лет		33–41
9–12 лет		34–43
12–15 лет	Ж	34–44
	М	35–45
15–18 лет	Ж	34–44
	М	37–48
18–45 лет	Ж	35–45
	М	39–49
45–65 лет	Ж	35–47
	М	39–50
Старше 65 лет	Ж	35–47
	М	37–51

Повышение гематокрита:

- первичные эритроцитозы;
- вторичные эритроцитозы (врожденные пороки сердца, дыхательная недостаточность и др.);
- уменьшение объема циркулирующей плазмы (сгущение крови) при ожоговой болезни, перитоните и др.;
- дегидратация организма (при выраженной диарее, неукротимой рвоте, повышенной потливости, диабете).

Понижение гематокрита:

- анемии;
- увеличение объема циркулирующей крови (вторая половина беременности и др.).

Лейкоциты

Лейкоциты (белые кровяные тельца) – это форменные элементы крови, основной функцией которых является защита организма от чужеродных агентов (токсинов, вирусов, бактерий, отмирающих клеток собственного организма и др.).

Существует 5 видов лейкоцитов: нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, лимфоциты, моноциты.

Число лейкоцитов в течение дня может изменяться под действием различных факторов, не выходя, однако, за пределы нормальных значений.

Физиологическое повышение уровня лейкоцитов (физиологический лейкоцитоз) возникает например, после приема пищи (поэтому желательно проводить анализ натощак), после физической нагрузки (не рекомендуются физические усилия до взятия крови) и во второй половине дня (желательно забор крови для анализа осуществлять утром), при стрессах, воздействии холода и тепла. У женщин физиологическое повышение количества лейкоцитов отмечается в предменструальный период, во второй половине беременности и при родах.

Единицы измерения: $\times 10^9$ клеток/л.

Таблица 2.4

Референсные значения уровня лейкоцитов в крови

Возраст	Уровень лейкоцитов, $\times 10^9$ клеток/л
Дети до 1 года	6,0–17,5
1–2 года	6,0–17,0
2–4 года	5,5–15,5
4–6 лет	5,0–14,5
6–10 лет	4,5–13,5
10–16 лет	4,5–13,0
Дети старше 16 лет	4,5–11,0
Взрослые	4

Повышение уровня лейкоцитов (лейкоцитоз):

- острые инфекции, особенно стафилококк, стрептококк, пневмококк, гонококк;
- воспалительные состояния, ревматическая атака;
- интоксикации, травмы, ожоги;
- злокачественные новообразования;

- острые кровотечения;
- оперативные вмешательства и др.

Понижение уровня лейкоцитов (лейкопения):

- некоторые вирусные и бактериальные инфекции (грипп, брюшной тиф, корь, малярия, краснуха, СПИД);
- сепсис и многие другие.

Лейкоцитарная формула

Лейкоцитарная формула (лейкограмма) – это процентное соотношение различных видов лейкоцитов. Выделяют 5 основных видов лейкоцитов: нейтрофилы, лимфоциты, моноциты, эозинофилы, базофилы.

Различные виды лейкоцитов выполняют разные функции, поэтому определение соотношения разных видов лейкоцитов, содержания молодых форм клеток, выявление патологических клеточных форм несет ценную диагностическую информацию.

Лейкоцитарная формула имеет возрастные особенности, поэтому ее сдвиги должны оцениваться с позиции возрастной нормы (это особенно важно при обследовании детей).

Таблица 2.5

Референсные значения соотношения различных видов лейкоцитов у детей и взрослых в зависимости от возраста

Возраст	Нейтрофилы палочкоядерные, (%)	Нейтрофилы сегментоядерные, (%)	Эозинофилы, (%)	Базофилы, (%)	Лимфоциты, (%)	Моноциты, (%)
0–2 недели	1–5	30–50	1–6	0–1	22–55	5–15
2 недели – 1 год	1–5	16–45	1–5	0–1	45–70	4–10
1–2 года	1–5	28–48	1–7	0–1	37–60	3–10
2–5 лет	1–5	32–55	1–6	0–1	33–55	3–9
5–7 лет	1–5	38–58	1–5	0–1	30–50	3–9
7–9 лет	1–5	41–60	1–5	0–1	30–50	3–9
9–11 лет	1–5	43–60	1–5	0–1	30–46	3–9
11–15 лет	1–5	45–60	1–5	0–1	30–46	3–9
от 15 лет и старше	1–5	47–72	1–5	0–1	19–37	3–11

Нейтрофилы

Нейтрофилы – наиболее многочисленная разновидность белых кровяных телец, они составляют 50–75 % всех лейкоцитов.

Выделяют сегментоядерные (зрелые) нейтрофилы и относительно небольшое количество палочкоядерных (более молодых) нейтрофилов.

Основная функция нейтрофилов состоит в защите организма от инфекций.

Повышение уровня нейтрофилов (нейтрофилез, нейтрофилия):

- острые бактериальные инфекции;
- воспалительные процессы и некроз тканей (инфаркт миокарда, обширные ожоги, ревматизм, ревматоидный артрит, панкреатит, дерматит, перитонит);
- состояние после оперативного вмешательства;
- интоксикации;
- онкологические заболевания (опухоли различных органов);
- физическое напряжение и эмоциональная нагрузка, стрессовые ситуации.
- понижение уровня нейтрофилов (нейтропения):
- некоторые инфекции;
- болезни системы крови и др.

Лимфоциты

Лимфоциты – являются главными клеточными элементами иммунной системы. Главная функция состоит в узнавании чужеродного антигена и участии в адекватном иммунологическом ответе организма. Разные субпопуляции лимфоцитов выполняют различные функции – обеспечивают эффективный клеточный иммунитет (в том числе отторжение трансплантата, уничтожение опухолевых клеток), гуморальный ответ (в виде синтеза антител к чужеродным белкам – иммуноглобулинов различных классов), а также иммунологическую память (способность организма к ускоренному и усиленному иммунному ответу при повторной встрече с чужеродным агентом).

У взрослых лимфоциты составляют 20–40 % от всего числа лейкоцитов.

Повышение уровня лимфоцитов (лимфоцитоз):

- инфекционные заболевания: вирусный гепатит, цитомегаловирусная инфекция, коклюш, ОРВИ, токсоплазмоз, герпес, краснуха, ВИЧ-инфекция;
- заболевания системы крови;
- лечение некоторыми препаратами.

Понижение уровня лимфоцитов (лимфопения):

- тяжелые вирусные заболевания;
- почечная недостаточность;
- недостаточность кровообращения;
- иммунодефициты и многое другое.

Моноциты

Моноциты – в очаге воспаления поглощают микробы, погибшие лейкоциты, а также поврежденные клетки воспаленной ткани, очищая этим очаг воспаления и подготавливая его для регенерации. За эту функцию моноциты называют «дворниками организма».

Повышение уровня моноцитов (моноцитоз):

- инфекции;
- гранулематозы: туберкулез, сифилис, бруцеллез, саркоидоз, язвенный колит;
- болезни крови и др.

Понижение уровня моноцитов (моноцитопения):

- поражение костного мозга;
- оперативные вмешательства;
- шоковые состояния.

Эозинофилы

Эозинофилы присутствуют в периферической крови в относительно небольшом количестве – от 0,5 до 5 % от общего числа лейкоцитов.

Эозинофилы участвуют в реакциях организма на паразитарные (гельминтные и протозойные), аллергические, инфекционные и онкологические заболевания, при включении в патогенез заболевания аллергического компонента, который сопровождается повышенной продукцией особого белка – иммуноглобулина E (IgE).

Оценка динамики изменения количества эозинофилов в течение воспалительного процесса имеет прогностическое значение. Эозинопения (снижение количества эозинофилов) часто наблюдается в начале воспаления. Эозинофилия (увеличение числа эозинофилов) соответствует началу выздоровления. Однако ряд инфекционных и других заболеваний с высоким уровнем IgE характеризуются эозинофилией после окончания воспалительного процесса, что указывает на незаконченность иммунной реакции с ее аллергическим компонентом. Снижение числа эозинофилов в активной фазе заболевания или в послеоперационном периоде часто свидетельствует о тяжелом состоянии пациента.

Базофилы

Базофилы – наиболее малочисленная популяция лейкоцитов. Они участвуют в воспалительных и аллергических реакциях, в регуляции проницаемости сосудистой стенки.

Повышение уровня базофилов (базофилия):

- аллергические реакции на пищу, лекарства, введение чужеродного белка;
- ветряная оспа и др.

Тромбоциты

Тромбоциты (кровяные пластинки) – участвуют в процессах свертывания крови.

Количество тромбоцитов изменяется в зависимости от времени суток, а также в течение года. Физиологическое снижение уровня тромбоцитов отмечается во время менструации (на 25–50 %) и в период беременности, а повышение – после физической нагрузки.

Единицы измерения: $\times 10^9$ клеток/л.

Референсные значения: $150\text{--}350 \times 10^9$ клеток/л.

Повышение уровня (тромбоцитоз):

- первичные тромбоцитозы;
- вторичные тромбоцитозы (возникающие на фоне какого-либо заболевания): воспалительные процессы, цирроз печени, острая кровопотеря или гемолиз, онкологические заболевания.

Понижение уровня (тромбоцитопения):

- врожденные тромбоцитопении;
- приобретенные тромбоцитопении (на фоне различных заболеваний).

Скорость оседания эритроцитов

Скорость оседания эритроцитов (СОЭ) – показатель скорости разделения крови в пробирке. СОЭ повышается при увеличении концентрации в плазме т. н. белков острой фазы – маркеров воспалительного процесса. В первую очередь – фибриногена, С-реактивного белка, церулоплазмينا, иммуноглобулинов и других. Напротив, СОЭ снижается при увеличении концентрации альбуминов (белков). Снижение содержания эритроцитов (анемия) в крови приводит к ускорению СОЭ и, напротив, повышение содержания эритроцитов в крови замедляет скорость оседания.

При острых воспалительных и инфекционных процессах изменение скорости оседания эритроцитов отмечается через 24 часа после повышения температуры и увеличения числа лейкоцитов.

Показатель СОЭ меняется в зависимости от множества физиологических и патологических факторов. Значения СОЭ у женщин несколько выше, чем у мужчин. Изменения белкового состава крови при беременности ведут к повышению СОЭ в этот период.

Единицы измерения: мм/ч.

Таблица 2.6

Референсные значения СОЭ

Возраст	Пол	СОЭ, мм/ч
Дети до 10 лет		0–10
11–50 лет	Ж	0–20
	М	0–15
Старше 50 лет	Ж	0–30
	М	0–20

Повышение (ускорение СОЭ):

- воспалительные заболевания различной этиологии;
- острые и хронические инфекции (пневмония, остеомиелит, туберкулез, сифилис);
- опухолевые, аутоиммунные заболевания;
- анемии, состояние после кровопотери;
- интоксикации;
- травмы, переломы костей;
- состояние после шока, операционных вмешательств;
- у женщин во время беременности, менструации, в послеродовом периоде.

Понижение (замедление СОЭ):

- выраженные явления недостаточности кровообращения;
- эпилепсия;
- голодание, снижение мышечной массы;
- беременность (особенно 1 и 2 семестр);
- вегетарианская диета.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Каково нормальное содержание эритроцитов и гемоглобина в общем клиническом анализе крови?
2. Что такое анизоцитоз и пойкилоцитоз?
3. Каково нормальное содержание лейкоцитов в общем клиническом анализе крови?
4. Какими терминами обозначается повышенное и пониженное содержание лейкоцитов в общем клиническом анализе крови?
5. Укажите нормальное процентное содержание базофилов, эозинофилов, палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов, лимфоцитов, моноцитов в лейкоцитарной формуле.
6. Что означает сдвиг лейкоцитарной формулы влево?
7. В каких случаях повышается скорость оседания эритроцитов?

8. Какие изменения в общем клиническом анализе крови свидетельствуют о воспалении и аллергии?
9. Что такое агранулоцитоз?
10. Какова основная функция тромбоцитов?

ЛИТЕРАТУРА

1. Назаренко Г. И., Кишкун А. А. Лабораторные методы диагностики неотложных состояний / Г. И. Назаренко, А. А. Кишкун. – М.: Медицина, 2002.
2. Лившиц В. М., Сидельникова В. И. Медицинские лабораторные анализы / В. М. Лившиц, В. И. Сидельникова. – М.: ТРИАДА-Х, 2000.
3. Медицинская лабораторная диагностика: программы и алгоритмы / под ред. А. И. Карпищенко. – СПб.: Интермедика, 1997.
4. Клиническая биохимия / под ред. В. А. Ткачука. – М.: Геотар-Мед, 2004.
5. Медицинские лабораторные технологии / под ред. А. И. Карпищенко. – СПб.: Интермедика, 1990.
6. Камышников В. С. Клинико-биохимическая лабораторная диагностика: справочник / В. С. Камышников. – в 2-х т. – Минск: Интерпрессервис, 2003.

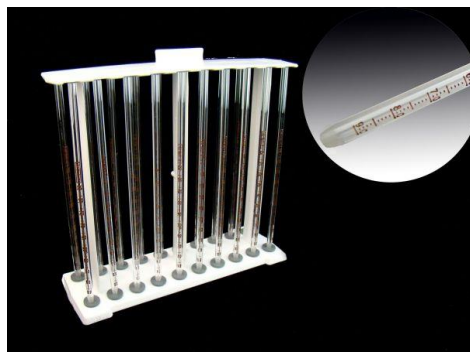
ХОД РАБОТЫ

Задание I. Определение скорости оседания эритроцитов микрометодом Панченкова.

Принцип метода

Метод основан на использовании свойства крови, смешанной с раствором цитрата натрия, не свертываться при стоянии, а разделяться на два слоя: нижний – эритроциты и верхний – плазму. Это расслоение происходит с различной скоростью в зависимости от изменения химических и физических свойств крови.

Аппарат Панченкова состоит из штатива с гнездами и зажимами для специальных капиллярных пипеток с просветом канала в 1 мм. На пипетках нанесена миллиметровая шкала длиной 10 см. Верхнее деление шкалы отмечено «0» и буквой «К» (кровь). Через каждые 10 делений имеются цифры – 10, 20, 30 и т. д. до 100. Против деления «50» имеется буква «Р» (реактив). Отверстия концов капиллярных пипеток, вставленных в прибор, герметически закрываются резиновыми прокладками или пробками (рис. 2.1).



Аппарат Панченкова

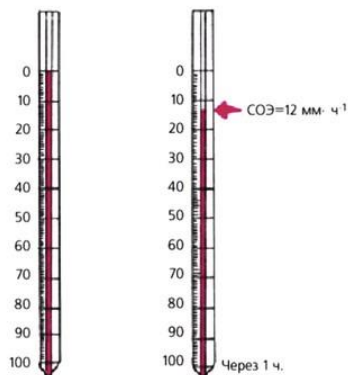


Рис. 2.1. Устройство аппарата и принцип метода определения СОЭ микрометодом Панченкова

Порядок выполнения работы

1. В капиллярную пипетку набирают раствор цитрата натрия до метки «Р» и вводят в пробирку.
2. Тем же капилляром набирают из пальца 2 раза кровь до метки «К» и вносят в пробирку с цитратом Na.
3. Содержимое пробирки переливают и отбирают смесь в капилляр до отметки «0». Капилляр ставят в штатив на 1 час.
4. Через 1 час отсчитывают по делениям капиллярной пипетки величину отстоявшегося столбика плазмы. Скорость оседания выражают в миллиметрах за 1 час.

Норма СОЭ: у женщин 2–15 мм/час, у мужчин 1–10 мм/час.

Примечание

Во избежание получения ошибочных результатов необходимо:

1. *Строго соблюдать количественное соотношение между раствором цитрата натрия и кровью.*
2. *Тщательно перемешивать смесь во избежание образования сгустков.*
3. *Капилляр помещать в строго вертикальное положение.*
4. *Соблюдать температуру воздуха в помещении, где производится исследование. Она должна быть не выше и не ниже 20 °С.*
5. *Перенос цитратной крови из одного помещения в другое при температуре ниже 0 °С должен осуществляться в ватных чехлах.*

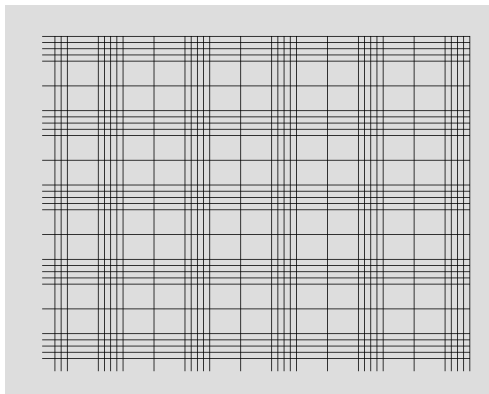
Задание II. Подсчет количества эритроцитов в 1 мкл крови в камере Горяева.

Принцип метода

Метод основан на подсчете эритроцитов в 1 мкл крови при постоянном разведении крови и определенном объеме счетной камеры.



Камера Горяева



Сетка камеры Горяева

Рис. 2.2. Камера Горяева 2-х и 4-х сеточная для подсчета клеток

Порядок выполнения работы

1. В сухую чистую пробирку вносят 4 мл 0,9 % раствора NaCl. Капиллярной пипеткой отбирают 0,02 мл крови. Кончик пипетки осторожно протирают и кровь выдувают на дно пробирки; пипетку тщательно промывают в верхнем слое жидкости. Содержимое пробирки перемешивают.

2. Перед заполнением камеры Горяева ее шлифованное покровное стекло промывают и насухо вытирают. Затем шлифованное стекло притирают к камере так, чтобы появились радужные кольца, поскольку только при этом условии будут соблюдены необходимая высота и объем камеры.

3. Наклонив пробирку, концом круглой стеклянной палочки отбирают из нее каплю крови и подносят к краю шлифованного стекла камеры.

4. После заполнения камеру оставляют на 1 мин для оседания форменных элементов. Затем подсчитывают форменные элементы при малом увеличении микроскопа (объектив $\times 8$, окуляр $\times 10$ или $\times 15$) и затемненном поле зрения (с прикрытой диафрагмой или при несколько опущенном конденсоре).

5. Эритроциты подсчитывают в 5 больших квадратах ($5 \times 16 = 80$ малых), расположенных по диагонали, так как расположение клеток в камере может быть неодинаковым. Подсчету подлежат эритроциты, расположенные внутри маленького квадрата, и те, которые находятся на левой и верхней его линиях.

6. Вычисление количества форменных элементов в 1 μ л крови проводят по следующей формуле:

$$X = \frac{a \times 4000 \times 200}{80},$$

где X – количество форменных элементов в 1 μ л крови; a – количество форменных элементов, подсчитанных в 80 малых квадратах; 80 – количество малых квадратов; 200 – степень разведения крови; 4000 – множитель, приводящий результат к объему 1 мкл крови, поскольку объем малого квадрата – 1/4000 мкл.

Норма: для мужчин в пределах 4.000.000–5.000.000; для женщин – 3.700.000–4.700.000.

Примечание

1. При гемолитических и пернициозных анемиях рекомендуется подсчитать эритроциты сразу же после взятия крови, т.к. при хранении они быстро лизируются.

2. Для более точного подсчета рекомендуется считать эритроциты в двух сетках и брать средний арифметический результат.

Задание III. Подсчет количества лейкоцитов в 1 мкл крови в камере Горяева.

Принцип метода

Метод основан на подсчете лейкоцитов в 1 мкл крови при постоянном разведении крови и определенном объеме счетной камеры.

Порядок выполнения работы

1. В пробирку наливают 0,4 мл подкрашенного раствора уксусной кислоты.

2. Капиллярной пипеткой отбирают 0,02 мл крови, осторожно выдувают ее в пробирку с реактивом и ополаскивают им пипетку. Смесь хорошо перемешивают.

3. Подготовить камеру Горяева как указано в задании II.

4. Заполнить камеру и оставить ее на 1 мин. для оседания лейкоцитов.

5. Лейкоциты подсчитывают при малом увеличении микроскопа (объектив $\times 8$, окуляр $\times 10$) при затемненном поле зрения.

6. Лейкоциты считают в 100 больших квадратах, что соответствует 1600 малым (100×16).

7. Результаты подсчета в больших квадратах суммируют и производят вычисление количества лейкоцитов в 1 мкл крови по формуле:

$$X = \frac{a \times 4000 \times 20}{1600},$$

где X – количество лейкоцитов в 1 мкл крови; а – количество форменных элементов, сосчитанных на 100 больших квадратах; 1600 – количество малых квадратов; 20 – разведение крови; 4000 – множитель, приводящий результат к объему 1 мкл крови, исходя из объема малого квадрата (1/4000 мкл)

Норма: количество лейкоцитов у взрослых колеблется от 4000 до 9000 в 1 мкл крови.

Примечание

Практически, подсчитанное количество лейкоцитов в 1600 малых квадратах умножают на 50.

Задание IV. Определение концентрации гемоглобина.

Принцип метода

Концентрацию гемоглобина определяют с помощью набора «Био-Лахема-Тест».

При взаимодействии реактива, содержащего буфер, феррицианид калия и цианид калия, гемоглобин эритроцитов трансформируется в стабильный цианогемоглобин, концентрацию которого определяют спектрофотометрически.

Порядок выполнения работы

1. Содержимое флакона с реактивом 1 из набора «Био-Лахема-Тест» растворяют в 2000 мл дистиллированной воды.

2. В пробирку вносят 5 мл реактива 1 и 0,02 мл крови и немедленно перемешивают.

3. Пробу инкубируют 10 мин.

4. Измеряют оптическую плотность пробы против рабочего раствора при $\lambda = 540\text{--}546$ нм.

5. Концентрацию гемоглобина рассчитывают по формуле:

$$[\text{Hb}] \text{ (г/л)} = 367,7 \times A,$$

где A – оптическая плотность пробы.

Норма: для мужчин – 125–175 г/л, для женщин – 115–155 г/л.

Задание V. Морфологическое исследование форменных элементов крови с дифференциальным подсчетом лейкоцитарной формулы.

Принцип метода

Микроскопическое исследование сухих фиксированных и окрашенных мазков крови с описанием морфологии эритроцитов и дифференциальным подсчетом лейкоцитов с расчетом их процентного соотношения.

Порядок выполнения работы

Фиксация мазков

Предметные стекла должны быть чистыми и обезжиренными.

Для фиксации отбирают правильно приготовленные тонкие мазки крови: мазок должен иметь желтоватый цвет, располагаться на расстоянии 1–3 мм от края широких сторон стекла и заканчиваться «метелочкой», не доходя 1,5–2 см до края.

Высохшие на воздухе мазки опускают в банку с фиксатором (спирт этиловый, 96°) на 35 мин, затем извлекают их пинцетом и высушивают на воздухе.

Окраска мазков

Для окраски используется смесь двух красителей – кислого (эозин калия) и основного (метиленовый синий и его производные – азур I и азур II).

Азур-эозиновые смеси обладают высокой чувствительностью к pH воды. Вода для приготовления красителей и смывания краски должна иметь нейтральную реакцию. При кислой реакции клетки долго не прокрашиваются и имеют красный оттенок, при щелочной – эритроциты окрашиваются в серовато-синий цвет, а ядра и цитоплазма – в очень темные цвета.

Окраска по Паппенгейму

Сухие нефиксированные мазки помещают в контейнер и опускают в кювету с раствором красителя-фиксатора Май–Грюнвальда на 5 мин. После этого контейнер с мазками ополаскивают в кювете с дистиллированной водой и помещают в кювету с рабочим раствором азур-эозина (по Нохту) на 8–15 мин. Краску смывают, перенося контейнер в кювету с водопроводной водой. Мазки высушивают на воздухе.

Микроскопическое исследование

Мазок крови просматривают при малом увеличении (объектив – $\times 10$, окуляр – $\times 7$). Подсчет лейкоцитов и оценка морфологии эритроцитов ведется только в тонкой части мазка, где эритроциты лежат одиночно.

На край мазка помещают каплю иммерсионного масла, переводят на иммерсионный объектив.

Подсчет лейкоцитов ведут до 100 клеток, отступив 2–3 поля зрения от края мазка, по зигзагу (по линии «Меандра»): 3–5 полей зрения вдоль края мазка, затем 3–5 полей зрения параллельно краю мазка и вновь под углом 90° возвратиться к краю мазка. Такое движение продолжают до тех пор, пока не будет сосчитана половина клеток. Затем переходят на противоположную сторону мазка и считают вторую половину клеток.

Оценка результатов.

а) подсчитывают только целые, неразрушенные клетки. В нормальной крови выявляются следующие формы лейкоцитов: базофилы, эозинофилы, палочкоядерные нейтрофилы, сегментоядерные нейтрофилы, моноциты, лимфоциты.

б) незрелые, бластные и трудно дифференцируемые формы лейкоцитов должны быть введены в лейкоцитарную формулу, дано их описание и морфология.

в) при оценке морфологии эритроцитов обращают внимание на: размер эритроцитов, наличие и степень выраженности анизоцитоза и пойкилоцитоза, на особенности формы эритроцитов, на интенсивность окраски, на наличие включений.

г) если при подсчете формулы были выявлены какие-либо отклонения от нормы, необходим подсчет не менее 200 лейкоцитов.

Норма: нормальное содержание различных лейкоцитов в крови здоровых взрослых людей приведено в табл. 2.5.

ОФОРМЛЕНИЕ РАБОТЫ

1. Кратко записать теоретические данные.
2. Описать ход работы.
3. Сделать выводы по работе.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3.

КЛИНИЧЕСКИЕ ПРИЛОЖЕНИЯ ЭЛЕКТРОХИМИИ, ИССЛЕДОВАНИЯ ЭЛЕКТРОЛИТОВ

Цель: освоить ионоселективные технологии исследования электролитов (K, Na, Cl в сыворотке крови человека).

Оборудование и материалы: ионоселективный анализатор AVL 924 S, пвтоматические микропипетки, пробирки, штативы для пробирок.

Реактивы:

- | | |
|-------------------------------------|--------------------------------|
| 1. Фосфатно-цитратные буферы: | pH 4,0, pH 5,4, pH 6,8, pH 8,0 |
| 2. Фосфатный буфер, | pH 6,8 |
| 3. Крахмал, | 0,25 % раствор |
| 4. Сахароза, | 2 % раствор |
| 5. Иод, раствор в KI | |
| 6. CuSO ₄ , | 1 % раствор |
| 7. NaOH, | 10 % раствор |
| 8. Вода дистиллированная | |
| 9. Цветной реагент | 1000 мл: |
| 10. Цитратный буфер (pH 4,2) | 30 ммоль/л |
| 11. Бромкрезоловый зеленый | 260 мкмоль/л |
| 12. Стандарт 1 | 3 мл |
| 13. Альбумин | 40 г/л |
| 14. Азид натрия | 0,095 % |
| 15. Реагент № 1 | |
| 16. Реагент № 2 | |
| 17. Стандарт мочевины | |
| 18. Раствор пикриновой кислоты | 0,035 моль/л – 220 мл |
| 19. Раствор гидроксида натрия, | pH 13,5 – 220 мл |
| 20. Стандартный раствор креатинина, | 177 мкмоль/л – 10 мл |

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Понятие электролитов

Электролиты – вещества, в которых в заметной концентрации присутствуют ионы, обуславливающие прохождение электрического тока (ионную проводимость). Электролиты также называют проводниками второго рода. В узком смысле слова электролиты – вещества, молекулы которых в растворе вследствие электролитической диссоциации распадаются на ионы.

Анион – отрицательно заряженный ион. Характеризуется величиной отрицательного заряда. В электрическом поле анионы перемещаются к положительному электроду – аноду.

Катион – положительно заряженный ион. Характеризуется величиной положительного электрического заряда. В электрическом поле катионы перемещаются к отрицательному электроду – катоду.

Основными анионами в организме человека являются: Cl^- , HCO_3^- , SO_4^{2-} и т. д.

Основными катионами в организме человека являются: Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} и т. д.

Натрий в организме человека

Суточная потребность варьируется в зависимости от водно-солевого обеспечения организма. Составляет 0,08 % от массы тела. Нормы суточного потребления не существует, однако считается, что потребность взрослого человека составляет около 9–16 г хлорида натрия (поваренной соли) в сутки. При значительных физических нагрузках, в жаркое время года (повышенной температуры окружающей среды), у рабочих горячих цехов, шахтеров, спортсменов и военнослужащих, которые участвуют в беге на длительные дистанции и совершающих марш броски суточная потребность возрастает до 20 г поваренной соли в сутки.

Функции

Основной катион (+) внеклеточного отдела. Играет главную роль в поддержании осмотического давления – 90 %.

1) участвует в возникновении и поддержании электрохимического потенциала на плазматических мембранах клеток;

2) регулирует состояние водно-солевого обмена;

3) участвует в регуляции работы ферментов;

4) компонент $\text{K}^+ - \text{Na}^+$ насоса;

5) проведение нервного импульса;

6) увеличение секреции натрийуретических гормонов;

7) увеличение секреции АДГ (антидиуретический гормон), что ведет к увеличению внеклеточного объема жидкости;

8) увеличение секреции альдостерона.

Калий и натрий были открыты вместе и оба важны для нормального роста и состояния организма. Они являются антагонистами на клеточном уровне, т. е. повышение содержания натрия приводит к уменьшению калия в клетке.

Вход: всасывается в верхнем отделе тонкого кишечника при участии белков-переносчиков и требует затраты АТФ.

Транспорт: по сосудам в составе крови.

Преобразование и распределение: депонируется в коже, мышцах, костях.

Выход: при отсутствии или ограничении в поступлении натрия в организм в течение 2–4 сут его выделение с мочой почти полностью прекращается. Если резко увеличить потребление натрия, то его экскреция сразу же увеличится и в ближайшие дни станет равной потребляемому количеству. Кишечная потеря натрия происходит при диареях. Из клеток натрий выводится против градиента концентрации и требует затрат энергии, что ведет к усилению теплопродукции при его избыточном поступлении в клетку. Простагландины ослабляют экскрецию натрия.

Сочетанная потеря натрия и воды:

1. Внепочечные потери: через ЖКТ (рвота, диарея, промывания желудка, свищи); секвестрация отечной жидкости в брюшную полость (перитонит, быстронаступающий рецидив асцита); через кожу (потоотделение, ожоги).

2. Потери через почки: Болезни почек (ХПН, диуретическая фаза ОПН, постобструктивный диурез, патология канальцев, сопровождаемая потерей соли); избыточный диурез; Осмотический диурез (глюкозурия при сахарном диабете); недостаточность минералокортикоидов (болезнь Аддисона, гипоальдостеронизм).

Гипонатриемия

Гипонатриемия – это состояние, при котором концентрация ионов натрия в плазме крови падает ниже 135 ммоль (в норме 150 ммоль). Гипонатриемия вызывается широким спектром патологии.

Симптомы

У большинства пациентов симптоматика отсутствует, но могут проявляться симптомы болезни, вызывающей состояние гипонатриемии.

Сильная гипонатриемия может вызвать осмотическое перераспределение воды из плазмы крови в клетки организма, включая клетки мозга. Типичные симптомы в этом случае включают головокружение, рвоту, головные боли и общее недомогание. По мере углубления гипонатриемии могут возникнуть путаница мыслей, оцепенение (ступор) и кома. Поскольку головокружение само по себе является стимулом для экскреции АДГ (антидиуретического гормона), существует возможность возникновения цикла самоусиления эффекта (положительная обратная связь).

Причины

Аномально низкую концентрацию натрия в крови необходимо исследовать во взаимосвязи с осмолярностью плазмы крови и объемом внеклеточной жидкости пациента.

В большинстве случаев гипонатриемия связана со снижением осмолярности плазмы крови. Подавляющее большинство случаев гипонатриемии у взрослых связано с повышенной активностью АДГ (антидиуретический гормон, который регулирует баланс воды в организме, но не соли). Задача врача в таком случае заключается в определении причины повышенной активности АДГ.

У пациентов с потерей объема жидкости (крови), секреция АДГ повышена, поскольку сокращения объема крови является естественным стимулом для секреции АДГ. Таким образом, почки пациента удерживают воду и выделяют очень концентрированную мочу. Лечение является простым – восстановление объема крови пациента.

У некоторых пациентов с гипонатриемией объем крови является нормальным. У них повышенный уровень активности АДГ и последующее удержание воды может быть связано с физиологическими причинами. Еще одна возможная причина – синдром несоответствующего АДГ (SIABH), при котором он выделяется постоянно с уровнем существенно выше нормы, что наиболее часто является побочным эффектом некоторых лекарственных средств (при проблемах с легкими (таких как пневмония или абсцесс), болезнях мозга или определенных типов рака (наиболее часто мелкоклеточная карцинома легких)).

Третья группа пациентов с гипонатриемией характеризуется присутствием периферийной отеки (отека). Жидкость в отечной ткани не участвует в циркуляции и застаивается. В результате свободный объем крови уменьшается, что приводит к экскреции АДГ. Лечение таких пациентов должно быть направлено на устранение причин отеков. Во многих случаях это совсем непросто, поскольку реальными причинами могут быть цирроз печени или порок сердца, лечение которых никак нельзя считать простым.

Отдельно нужно рассматривать пациентов, употребляющих диуретики. Эти лекарства повышают выделение жидкости с мочей и, как следствие, уменьшают объем крови, что является стимулом для АДГ и удержания воды почками.

Гипернатриемия

Гипернатриемия – концентрация натрия в сыворотке выше 145 мЭкв/л; клинически проявляется, если этот показатель выше 155 мЭкв/л. Гипернатриемия всегда предполагает гипертоничность всех

жидкостей организма, поскольку повышение осмолярности внеклеточной жидкости вызывает движение воды из внутриклеточного пространства, что приводит к повышению внутриклеточной осмотической активности и дегидратации клеток.

Этиология

Внепочечные причины: избыточное поступление натрия (как правило, передозировка препаратов натрия), снижение потребления воды, повышение потерь через кожу (гипергидроз, ожоги), повышение потерь через ЖКТ (диарея, длительная рвота).

Почечные причины: осмотический диурез. Наличие осмолярно активных неабсорбирующихся растворенных веществ в клубочковом фильтрате предупреждает реабсорбцию воды и натрия и приводит к возрастанию потерь воды с почками. Гипергликемия с глюкозурией – частая причина осмотического диуреза. Так как потери воды относительно больше, чем потери натрия, концентрация натрия в сыворотке при осмотическом диурезе прогрессивно увеличивается. Несахарный диабет.

Клиническая картина

- Патология ЦНС. У маленьких детей и у престарелых развивается генерализованное угнетение ЦНС, включая заторможенность, кому и эпилептические припадки. Вследствие разрывов вен могут наблюдаться внутричерепные кровоизлияния.

- Сокращение внеклеточного объема. Хотя 2/3 дефицита воды покрывается за счет внутриклеточной жидкости, в небольшой степени сокращается и объем внеклеточной жидкости (сухость кожных покровов и слизистых оболочек, жажда).

- Нарушение выделения мочи. Если потери жидкости обусловлены почками (выделение мочи несоответственно высокое по сравнению с уровнем осмолярности плазмы или объемом внеклеточной жидкости), то может отмечаться полиурия. Если почки не изменены и потери жидкости обусловлены внепочечными причинами, объем мочи обычно снижается.

Возрастные особенности

Дети: гипернатриемия может развиваться у новорожденных с низким весом при рождении. Летальность высока. Гипернатриемия может развиваться при неправильном приготовлении детского питания.

Пожилые: гипернатриемия может быть вызвана введением петлевых диуретиков.

Лабораторная диагностика

Тест с дегидратацией. Способность к концентрированию мочи можно исследовать после ночной дегидратации для выявления у больного потерь жидкости почками. Ограничение приема воды начинается в 8 вечера и продолжается 14 ч, после чего осмолярность мочи должна превышать 800 мосм/кг. Затем больному п/к вводят АДГ (5 ЕД водного р-ра вазопрессина). Осмолярность мочи после этой процедуры больше повышаться не должна. Если осмолярность мочи после проведения водной депривации ниже 800 мосм/кг или если она увеличивается более чем на 15 % после введения АДГ, это указывает на наличие в той или иной степени дефицита АДГ. Если осмолярность мочи после водной депривации не превышает 300 мосм/кг и не отмечается ее дальнейшее повышение после введения АДГ, то имеется та или иная форма нефрогенного несахарного диабета.

Исследование АДГ плазмы. При нефрогенном несахарном диабете осмолярность мочи может не быть истинным отражением высвобождения АДГ, тогда необходимо измерять уровни АДГ в плазме.

Оценка осмолярности и состава мочи. Для оценки полиурии информативно исследование состава растворенных веществ в моче. При осмолярности мочи ниже 200 мосм/кг предполагают наличие первичного дефекта в сохранении воды. При осмолярности мочи выше 200 мосм/кг при полиурии предполагают осмотический диурез. После измерения осмолярности мочи следует проанализировать наличие натрия, глюкозы и мочевины в моче для выявления этиологии диуреза.

Дифференциальная диагностика

Несахарный диабет, гиперосмолярная некетоацидотическая кома, злоупотребление солью, дегидратация по гипертоническому типу.

Лекарственная терапия

Препараты выбора

– Диета. В зависимости от этиологии заболевания – ограничение поваренной соли, увеличение количества жидкости; при несахарном диабете – диета с ограничением белков и достаточным количеством жиров и углеводов, пищу готовят без соли (больному выдают 5–6 г/сут в кристаллическом виде), рекомендуют овощи, фрукты, соки, молоко и молочнокислые продукты.

– При гиповолемии 0,9 % р-р натрия хлорида или р-р Рингера 10–20 мл/кг в/в в течение 1–2 ч. При снижении ОЦК на 10 % и более введение можно повторить. 5 % р-р декстрозы с 0,5 н р-ром натрия хлорида до нормализации диуреза.

– При гипернатриемии гипотонические растворы (натрия хлорида или декстрозы). Гипернатриемию, продолжающуюся менее 24 ч,

корректируют в течение суток; при более длительной гипернатриемии во избежание развития отека мозга содержание натрия сыворотки уменьшают до нормы в течение 48 ч, т. е. не быстрее 0,5 мЭкв/л/ч (0,5 ммоль/л/ч) или 20 мЭкв/л/сут (20 ммоль/л/сут). Петлевые диуретики, затем, дополнительно к гидратационной терапии, внутривенная инфузия 5 % р-ра декстрозы с добавлением калия хлорида. Для профилактики гипокальциемии в растворы для внутривенного введения добавляют 50 мг/кг кальция в виде 10 % р-ра кальция глюконата. При развитии ацидоза в жидкость для инфузии добавляют натрия гидрокарбонат 550 мЭкв/л.

– При сочетании ацидоза и гипокальциемии в первую очередь устраняют недостаток кальция. При необходимости назначают препараты калия и фосфаты.

– При нейрогенном несахарном диабете. При умеренной гипернатриемии – десмопрессин взрослым 10–40 мкг интраназально в 1–3 приема; детям 5–30 мкг однократно на ночь или в 2 приема. При тяжелой гипернатриемии (>155 мЭкв/л) или при поражении ЦНС – десмопрессин 5–10 ЕД и/к.

– При нефрогенном несахарном диабете гидрохлортиазид 10 мг 2 р/сут, хлорпропамид 100–250 мг каждое утро.

Альтернативные препараты. При нефрогенном несахарном диабете – НПВС.

Калий в организме

Суточная потребность и основные источники поступления: составляет 0,25 % от массы тела. Общее содержание калия в организме человека составляет примерно 250 г. Суточная потребность в калии составляет 1,5–2 г.

Лучшими натуральными источниками калия являются цитрусовые, томаты, все зеленые овощи с листьями, листья мяты, семечки подсолнуха, бананы, картофель.

Функции

1. Играет ведущую роль в возникновении и проведении нервного импульса: при клеточном покое калий находится в клетке, при возбуждении – выходит из нее.

2. Необходим для синтеза белков (на 1 г белка – 20 мг ионов калия), АТФ, гликогена.

3. Участвует в образовании медиатора – ацетилхолина.

4. Увеличение секреции альдостерона.

5. Калию свойственна способность разрыхлять клеточные оболочки, делая их проницаемыми для прохождения солей.

Вход: всасывается на протяжении всего желудочно-кишечного тракта. Алкалоз усиливает вход калия в клетку, а также инсулин, в-адренергические катехоламины, возможно альдостерон. Альфа-адренергические агонисты тормозят поступление калия в клетки.

Транспорт: по сосудам в составе крови.

Преобразование и распределение: всосавшийся в кровь калий поступает в печень, а затем распространяется по тканям. Во внеклеточном пространстве содержится только 2 % от общего количества, а остальное – в клетках, где связан с углеводными соединениями. Часть калия откладывается в печени и коже, а остальная поступает в общий кровоток. Обмен очень быстро протекает в мышцах, кишечнике, почках и печени. В эритроцитах и нервных клетках более медленный обмен калия. В плазме крови калия содержится 15–20 мг%; в эритроцитах – 450–480 мг%.

Выход: калий в виде хлористого калия выделяется в основном почками в количестве 4,5 г – этим обусловлено его мочегонное действие. С солями калия всегда выделяется много воды. В меньшей степени калий выделяется кишечником и незначительное количество – с потом. Альдостерон стимулирует секрецию калия почками. При ацидозе усиливается выход калия из клеток. В отличие от натрия экскреция калия не снижается до минимального уровня на протяжении 7–14 сут после прекращения его поступления в организм, что ведет к его значительному дефициту. Усиливают выход калия все мочегонные за исключением спиронолактона, триамтерена и амилорида.

Клинические проявления и влияние на структуры организма. Основные проявления недостатка калия – замедление роста организма и нарушение половых функций. Недостаток калия вызывает мышечные судороги, перебои в работе сердца. При хронической недостаточности калия развивается нефропатия с морфологическими изменениями подобными при хроническом пиелонефрите. Недостаточность калия вызывает заболевание *Miastenia gravis*, которое выражается периодически наступающим параличом отдельных мышц. Слабость вначале возникает в мышцах ног затем генерализуется.

ЭКГ изменения – уплощение и инверсия зубца Т, увеличение выступа зубца II и прогиб сегмента ST. Наиболее заметно снижается концентрирующая способность почек, что может вызвать полиурию и полидипсию.

Причины дефицита калия и гипокалиемии

1. ЖКТ – недостаточное поступление с продуктами питания; дисфункция ЖКТ (рвота, диарея, ворсинчатая аденома, свищи, уретеросигмостомия).

2. Почки – метаболический алкалоз; лечение диуретиками; Влияние избытка минералокортикоидов (первичный и вторичный альдостеронизм, употребление лакрицы, избыток глюкокортикоидов); Болезни почечных канальцев (канальцевый ацидоз, лейкозы, синдром Лиддла), лечение антибиотиками (карбенициллин, амфотерицин В, гентамицин); дефицит магния.

3. Гипокалиемия вследствие перехода калия в клетки (без явления дефицита) – гипокалиемический периодический паралич; эффект инсулина; алкалоз.

Избыток калия и его проявления

При применении рег оз (внутри) даже больших доз калия, его токсическое действие не проявляется за исключением случаев почечной недостаточности. Парентеральное введение хлористого калия вызывает следующие симптомы: цианоз, рвоту, слабость пульса. Калий является сильнейшим мышечным ядом, поражающим сердце. Токсический эффект внеклеточного калия проявляется на ЦНС, мышцах и сердце. После кратковременного возбуждения нервно-мышечного аппарата наступает падение возбудимости, ослабление самопроизвольных движений, замедление пульса, падение АД. Большие дозы почти мгновенно вызывают паралич сердца. Избыток калия может привести к дефициту кальция. Токсическое действие гиперкалиемии (6,5–8 ммоль/л) может быть ослаблено за счет перемещения калия из внеклеточной жидкости в клетки. ЭКГ изменения – высокоамплитудный зубец Т, удлинение интервала Р–Я. При в/м введении калия хлорида развивается некроз тканей.

Терапевтический коктейль для быстрого уменьшения концентрации калия в крови: 1 л 5 % декстрозы в 0,9 % солевом растворе добавляют 1–2 ампулы гидрокарбоната натрия.

Причины гиперкалиемии

1. Неадекватная экскреция калия – почечная недостаточность; недостаточность надпочечников (гипоальдостеронизм, болезнь Аддисона); прием диуретиков, угнетающих секрецию калия в нефронах.

2. Высвобождение калия из клеток – повреждение тканей (размозжение мышц, гемолиз, внутреннее кровотечение); прием лекарственных средств (сукцинилхолин, аргинин, интоксикация препаратами наперстянки, β-адренергические блокаторы, ингибиторы АПФ); ацидоз; гиперосмолярность жидких сред, дефицит инсулина, гиперкалиемический периодический паралич.

3. Избыточное поступление калия в организм.

4. Псевдогиперкалиемия – тромбоцитоз, лейкоцитоз, неумелая техника проведения венопунктуры, гемолиз (анализ крови).

Хлор в организме человека

С обменом натрия тесно связан метаболизм хлора в организме. Общее количество хлора составляет 18,3 г, в плазме крови его концентрация составляет 97–103 ммоль/л, в лимфе – 92–141 ммоль/л.

Хлор присутствует во всех органах и тканях, участвует в обмене веществ, входит в состав биологически активных соединений организма и является незаменимым химическим элементом. В основном он концентрируется в железах желудка и скелете человека, где его содержание на три порядка выше, чем в других органах и тканях. Хлор, являясь важнейшим анионом, поддерживает осмотическое давление и кислотно-щелочное состояние. Хлор, поступая в организм с пищей, полностью всасывается в тонком кишечнике, а затем происходит многократная его реабсорбция. Всосавшийся хлор равномерно распределяется по всем внеклеточным жидкостям.

Выводится хлор через почки, а небольшое его количество – с потом, поэтому определение хлора в моче может дать информацию о наличии его во всем организме. Потери хлора наблюдаются в тех же случаях, что и потери натрия. Динамика содержания хлоридов зависит от кислотности желудочного сока: чем выше кислотность, тем больше последующие потери хлоридов.

При воспалительном процессе (перитоните, особенно вызванном перфоративными язвами желудка и двенадцатиперстной кишки), возникает уменьшение содержания хлора в организме.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Клинико-диагностическое значение натрия. Клинические признаки гипонатриемии.
2. Клинико-диагностическое значение калия. Клинические признаки гиперкалиемии.
3. Клинико-диагностическое значение хлора. Причины гипохлоремии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Назаренко Г. И., Кишкун А. А. Лабораторные методы диагностики неотложных состояний / Г. И. Назаренко, А. А. Кишкун. – М.: Медицина, 2002.
2. Лившиц В. М., Сидельникова В. И. Медицинские лабораторные анализы / В. М. Лившиц, В. И. Сидельникова. – М.: ТРИАДА-Х, 2000.
3. Медицинская лабораторная диагностика: программы и алгоритмы / под ред. А. И. Карпищенко. – СПб.: Интермедика, 1997.

4. Клиническая биохимия / под ред. В. А. Ткачука. – М.: Геотар-Мед, 2004.

5. Медицинские лабораторные технологии / под ред. А. И. Карпищенко. – СПб.: Интермедика, 1990.

6. *Камышников В. С.* Клинико-биохимическая лабораторная диагностика: справочник / В. С. Камышников. – в 2-х т. – Минск: Интерпрессервис, 2003.

ХОД РАБОТЫ

Задание. Определение натрия, калия и хлора в сыворотке крови человека.

Принцип метода

Ионоселективная потенциометрия.

Порядок выполнения работы

Пробирку с сывороткой или плазмой подставить во всасывающую иглу прибора и через 45 с. на дисплее высвечиваются искомые показатели Na, K, Cl.

ОФОРМЛЕНИЕ РАБОТЫ

1. Кратко записать теоретические данные.
2. Описать ход работы.
3. Сделать выводы по работе.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4.

ПРИМЕНЕНИЕ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ КИСЛОТНО-ОСНОВНОГО БАЛАНСА И ГАЗОВ КРОВИ

Цель: научиться использовать электрохимические методы для исследования кислотно-основного баланса и газов крови.

Оборудование и материалы: анализатор газов крови, электролитов и метаболитов ABL 800 FLEX, контейнер для отходов, термопринтер.

Реактивы: промывочный раствор – для промывки системы транспорта жидкостей после различных действий анализатора; раствор «Кал 1» или «Кал 2» – для выполнения калибровок по 1 и 2 точкам; очищающий раствор – для очистки системы транспорта жидкостей от отложений жира.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Общие представления

Кислотно-основной баланс (КОС) является одним из важнейших показателей гомеостаза – постоянства внутренней среды организма. В силу своей общей распространенности и скудности серьезных симптомов незначительных отклонений в КОС, нарушения кислотно-основного равновесия часто пропускаются и выявляются лишь специалистами-реаниматологами в далеко зашедших случаях, когда ситуация приближается к критической.

Базисные знания

Согласно теории Бренстеда, кислотами называются такие вещества, которые способны отдавать ионы водорода (доноры протонов), а основаниями – вещества, которые способны связывать эти ионы (акцепторы протонов).

Основным показателем КОС является pH. Величина pH представляет собой отрицательный десятичный логарифм концентрации ионов H^+ :

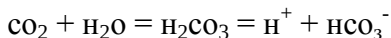
$$pH = -\lg[H^+]$$

Он отражает баланс между количеством CO_2 и HCO_3^- . CO_2 растворяется с образованием угольной кислоты (H_2CO_3), которая является ключевым кислым компонентом в кислотно-основном балансе организма. Т. к. концентрацию H_2CO_3 измерить прямым способом трудно, то кислый компонент выражается как CO_2 вместо H_2CO_3 (CO_2

и H_2CO_3 находятся в равновесии). В норме кислотно-основное отношение составляет 1:20 (1 часть $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{CO}_3$ и 20 частей HCO_3^-). При таком соотношении pH составляет 7,4.

pH артериальной крови человека (при 37 °C) в среднем составляет 7,4 (7,35–7,45).

Главным источником ионов водорода в организме является образующийся в ходе метаболизма углекислый газ, гидратация которого приводит к образованию угольной кислоты (15 000 ммоль/сутки).



В меньшей степени количество ионов водорода (30–80 ммоль/сутки) обусловлено поступлением в организм, а также образованием в нем кислот: серной (в результате обмена серосодержащих аминокислот), фосфорной (при метаболизме фосфорсодержащих соединений), органических кислот, образующихся при неполном окислении липидов и углеводов.

Механизмы регуляции КОС

Различают *физико-химические* и *физиологические механизмы* регуляции КОС в организме.

Физико-химические механизмы регуляции обусловлены буферными системами организма. Буферы присутствуют во всех жидкостях организма и при изменении pH действуют немедленно (в течение 1 с.). Они соединяются с избытком кислот или оснований и образуются вещества, которые мало влияют на pH. Основными буферными системами организма являются гидрокарбонатная, гемоглобиновая, фосфатная и белковая.

Буферные системы (БС) крови представлены БС плазмы крови (44 % буферной емкости крови) и БС эритроцитов (56 %). Основные БС плазмы – гидрокарбонатная и белковая, основные БС эритроцитов – гемоглобиновая, гидрокарбонатная, фосфатная.

Буферные свойства крови характеризует такой показатель, как ВВ (буферные основания) – сумма оснований (анионов) всех буферных систем крови.

В артериальной крови концентрация буферных оснований составляет примерно 48 ммоль/л (40–60 ммоль/л).

В плазме основную часть буферных оснований составляют ионы HCO_3^- , а в эритроцитах – протеинаты. В цельной крови более чем 1/3 всех анионов обладают буферным действием. Поскольку суммарная концентрация буферных оснований не зависит от $p\text{CO}_2$ (т. к. при увеличении CO_2 образуются равные количества H^+ и HCO_3^- , ионы водорода связываются с протеинатами и в результате концентрация

протеинов снижается настолько, насколько увеличивается концентрация бикарбоната), то по ней можно судить о сдвигах КОС, вызванных увеличением или уменьшением нелетучих кислот в крови.

Отклонение концентрации буферных оснований от нормального уровня (48 ммоль/л) называется избытком/дефицитом оснований. Таким образом, в норме ВЕ по определению равен нулю.

Физиологические механизмы регуляции КОС в основном представлены дыхательными и почечными.

Дыхательная система – в течение 1–2 мин удаляет или задерживает CO_2 в прямой зависимости от pH артериальной крови. В состоянии покоя организм выделяет около 15 000 ммоль/л CO_2 . При этом из крови выводится примерно эквивалентное число ионов водорода. При метаболическом ацидозе повышение в крови содержания H^+ приводит к стимуляции дыхательного центра и гипервентиляции (при респираторном ацидозе будет гиповентиляция, что и служит причиной повышения CO_2 и H^+ в крови). Напротив, при метаболическом алкалозе увеличение содержания оснований сопровождается гиповентиляцией (при респираторном алкалозе будет гипервентиляция).

Почки – их функция состоит в удалении нелетучих кислот. В сутки почки должны удалять 40–60 ммоль ионов водорода. Если содержание таких кислот возрастает, то при нормальном функционировании почек выделение H^+ с мочой может значительно увеличиваться. Напротив, при повышении pH выведение почками H^+ уменьшается.

Почки реабсорбируют весь профильтрованный бикарбонат HCO_3^- и образуют дополнительный бикарбонат в эпителии собирательных трубочек. 85 % профильтрованного HCO_3^- реабсорбируется в проксимальных канальцах, 10 % – в восходящей петле, оставшихся 5 % – титрируются ионами водорода, которые выделяются в просвет собирательных трубочек. В результате этого в эпителии собирательных трубочек образуется HCO_3^- . Скорость секреции ионов водорода зависит от ряда факторов, включая pH в просвете, системное $p\text{CO}_2$, уровня минералокортикоидов, разности потенциалов по обе стороны мембраны эпителия собирательных трубочек и др.

В норме разность потенциалов равна от –30 до –60 мВ. Она увеличивается при реабсорбции натрия, и в ответ на это в просвет выходят ионы водорода.

При падении pH в собирательных трубочках увеличивается NH_4^+ . NH_4^+ образуется в митохондриях эпителия проксимальных трубочек в реакции дезаминирования глутамина. Образование NH_4^+ является мишенью физиологической регуляции, контролируя секрецию кислот независимо от секреции ионов водорода. Скорость образования NH_4^+

возрастает при метаболическом ацидозе, гипокалиемии, недостатке глюкокортикоидов, потере функциональной массы почек и подавляется при гиперкалиемии.

Повышение уровня H^+ компенсируется тремя факторами: буферизация, гипервентиляция и повышение реабсорбции и образования HCO_3^- в почках. Снижение уровня H^+ и повышение анионов – буферизация, гиповентиляция и снижение реабсорбции HCO_3^- .

Нарушения КОС

Нарушения КОС могут быть компенсированные (рН удерживается в физиологических пределах), субкомпенсированные (незначительное изменение рН) и декомпенсированные (значительное изменение рН).

Понижение рН крови называют *ацидозом*, а повышение – *алкалозом*. Каждый из этих двух типов подразделяется еще на несколько разновидностей в зависимости от причины сдвига рН. Если причина кроется в легких, то такое состояние называется респираторным ацидозом или алкалозом. Если вне легких, то нереспираторным (иногда просто метаболическим). Отличить респираторные нарушения от нереспираторных позволяют $p\text{CO}_2$ и ВЕ. Для респираторных нарушений характерно изменение $p\text{CO}_2$ без изменения ВЕ.

Основные нарушения при ацидозе

Понижение рН приводит к угнетению центральной нервной системы. Человек теряет ориентацию и при прогрессировании впадает в коматозное состояние. При метаболическом ацидозе наблюдается гипервентиляция. При респираторном ацидозе дыхание обычно угнетено, что является причиной ацидоза.

Основные нарушения при алкалозе

Наблюдается перевозбуждение нервной системы. Возникает мышечная тетания. Вначале могут наблюдаться тонические сокращения предплечья, далее лица, а потом и во всех мышцах тела. Может наступить гибель от тетанического сокращения дыхательной мускулатуры. Как проявления перевозбуждения ЦНС возникают крайняя нервозность, судороги. Судороги можно провоцировать путем кратковременной гипервентиляцией, что используется в качестве диагностического теста в клинике.

Нереспираторные нарушения КОС

Нереспираторный ацидоз

Развивается при накоплении кислот или недостатке оснований.

Причины, приводящие к нереспираторному ацидозу, можно разделить на несколько групп, исходя от их топографии:

1. Экзогенные:

- повышенное поступление кислот в организм;
- гемотрансфузия жидкостями с рН ниже 7,0;

2. Метаболические – повышенное образование кислот:

- кетоацидоз (диабетический, алкогольный), лактатацидоз;
- гипоксия (при pO_2 арт. крови ниже 60 мм рт. ст) – усиление анаэробного метаболизма с повышением образования молочной кислоты;
- прием метанола, этиленгликоля, салицилатов, толуола и других веществ.

3. Почечные. Выделяют 4 типа почечного ацидоза:

1 тип – дистальный почечный ацидоз – нарушение секреции ионов водорода в просвет эпителием собирательных трубочек (как следствие – снижение секреции HCO_3^- в кровь).

Причины нарушения ацидогенеза: прием амфотерицина В, недостаточность АТФ-азы в собирательных трубочках, обструкция мочеполового тракта, почечная недостаточность, интерстициальный нефрит при СКВ, прием калий-сберегающих диуретиков (спиронолактон, триамтерен, амилорид).

2 тип – проксимальный почечный ацидоз – нарушение реабсорбции HCO_3^- .

Причины: прием ингибиторов карбангидразы (ацетазоламид), синдром Фанкони.

3 тип – сочетание 1 и 2 типов.

4 тип – нарушение аммиогенеза (как следствие – нарушение секреции ионов водорода в просвет и снижение секреции HCO_3^- в кровь).

Причины: гиперкалиемия, недостаточность минералокортикоидов.

4. Гастроинтестинальные (потеря HCO_3^-):

- диарея;
- дренирование желчи и панкреатического сока;
- уретральная сигмоидостомия или илеостомия – имплантация мочеточников в подвздошную или толстую кишку при опухолях мочевого пузыря или потере его функции вследствие неврологических отклонений;
- прием холестирамина, колестипола (связывают желчные кислоты в просвете кишечника и предотвращают их реабсорбцию).

Компенсаторный ответ при нереспираторном ацидозе: гипервентиляция (снижение pCO_2 на 1,2 мм рт. ст. при снижении HCO_3^- на каждый 1 ммоль/л).

Нереспираторный алкалоз

1. Экзогенные: назначение больших доз бикарбоната или его предшественников.

2. Метаболические: питание углеводами после голодания.

3. Почечные. Механизм развития алкалоза – гипокалиемия, стимуляция реабсорбции натрия и секреция в просвет ионов водорода, повышение образования HCO_3^- :

- тиазидные и петлевые диуретики (приводят к гипокалиемии);

- избыток минералокортикоидов наблюдается при первичном гиперальдостеронизме, эндогенном и синдроме Кушинга, врожденной гиперплазии коры с недостатком 11- и 17-гидроксилазы (17-ГКС). ГКС в норме не обладает минерало-кортикоидной активностью из-за селективного метаболизма в собирательных трубочках ферментом 11-гидроксистероиддегидрогеназы (11-ГСДГ). Если возможность этого метаболизма недостаточна (синдром Кушинга, стероидная терапия) ГКС начинают обладать минералокортикоидной активностью. Карбеноксолон и глицирризиновая кислота (противоязвенные) обладают минералокортикоидной активностью вследствие ингибирования 11-ГСДГ в почках;

- производные карбенициллина и пенициллина;

- гиперкальциемия/ гипопаратиреоз.

4. Гастроинтестинальные (из-за потери хлора):

- потеря желудочного сока (промывание желудка зондом, рвота);

- волосатый полип;

- врожденная хлордиарея.

Компенсаторный ответ при нереспираторном алкалозе: гиповентиляция (повышение $p\text{CO}_2$ на 0,7 мм рт. ст. при повышении HCO_3^- на каждый 1 ммоль/л). Дыхательная компенсация ограничивается гипоксией, которая развивается при снижении альвеолярной вентиляции.

Респираторные нарушения КОС

В норме $p\text{CO}_2$ крови поддерживается на постоянном уровне (40 мм рт. ст.) благодаря регуляции легочной вентиляции под контролем дыхательного центра. Изменения $p\text{CO}_2$ приводят к соответствующим изменениям в легочной вентиляции, что немедленно восстанавливает $p\text{CO}_2$ к физиологической норме. Хеморецепторы нейронов дыхательного центра чувствительны к изменениям $p\text{CO}_2$, $p\text{O}_2$ и pH крови. Кроме того, в дыхательный центр поступают импульсы от хеморецепторов каротидной зоны, от рецепторов растяжения легких (рефлекс Геринга–Брейера) и от коры. Респираторные нарушения КОС возникают при первичном изменении $p\text{CO}_2$ крови. Они могут сочетаться с другими формами нарушения КОС. В респираторных нарушениях КОС разумно выделять острые и хронические формы.

Острый респираторный ацидоз (острая гиперкапния)

Причины: обструкция дыхательных путей, астматический статус, угнетение дыхательного центра (морфин, барбитураты, алкоголь,

черепная травма, кровоизлияния в мозг, опухоли), нервно-мышечная слабость (миастения, синдром Гийена–Барре, полиомиелит, ЛВ), рестриктивные заболевания легких (пневмоторакс, тяжелая пневмония), неадекватная ИВЛ, тяжелые циркуляторные нарушения (артерио-венозное шунтирование в легких при респираторном дистресс-синдроме, обширных ателектазах, тяжелых пневмониях).

При повышении $p\text{CO}_2$ в крови происходит слабое повышение $[\text{HCO}_3^-]$ (примерно 1 ммоль/л на каждые 10 мм рт. ст.), вследствие внутриклеточной буферизации H^+ и выхода бикарбоната из клеток взамен на Cl^- появляется гиперфосфатемия. Пациент указывает на тревожность, одышку, при тяжелой гиперкапнии могут быть судороги. Лечение должно быть направлено на повышение легочной вентиляции (если требуется – ИВЛ) и коррекцию этиологических причин.

Компенсаторный ответ при остром респираторном ацидозе: немедленно высвобождение тканевых буферов $[\text{HCO}_3^-]$. Повышение HCO_3^- на 1 ммоль/л при повышении $p\text{CO}_2$ на каждые 10 мм рт. ст. от исходного значения.

Хронический респираторный ацидоз (хроническая гиперкапния)

Причины: хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), нарушения со стороны дыхательного центра, нервно-мышечные нарушения (амиотрофический склероз), рестриктивные заболевания легких (деформации грудной клетки).

Длительная гиперкапния приводит к повышению в спинно-мозговой жидкости $[\text{HCO}_3^-]$, что частично восстанавливает pH. Также хроническая гиперкапния приводит к повышению секреции HCO_3^- в почках, что повышает его концентрацию в крови. Такое состояние достигается к 4–5 дню и становится постоянным. Вследствие этого у пациентов с хроническим респираторным ацидозом с осторожностью надо проводить восстановление $p\text{CO}_2$ (т.к. быстрое его снижение приводит к алкалозу спинно-мозговой жидкости (СМЖ) и судорогам, а также длительному системному алкалозу).

Компенсаторный ответ при хроническом респираторном ацидозе: повышение почечной реабсорбции HCO_3^- (клинически обнаруживается через 8 ч, максимальный эффект развивается в течение 3–5 сут.). Повышение HCO_3^- на 3,5 ммоль/л при повышении $p\text{CO}_2$ на каждые 10 мм рт. ст.

Острый респираторный алкалоз (острая гипокания)

Причины: гипоксия, возбуждение, боль, сепсис, печеночная недостаточность, нарушение ЦНС (инсульты, инфекция), легочные нарушения (инфекции), применение ЛВ (отравление салицилатами), беременность.

Снижение $p\text{CO}_2$ приводит к слабому снижению $[\text{HCO}_3^-]$ вследствие его транспорта в клетки в обмен на Cl^- . Острая гипокапния также приводит к транспорту в клетки калия и фосфатов (снижая их уровень в крови) и повышению связывания кальция с альбумином. У пациентов с острым респираторным алкалозом могут быть сердечные аритмии, констрикция сосудов головного мозга, парестезии, подергивание мышц, судороги, обмороки. Лечение должно быть направлено на снижение гипервентиляции (седация, если необходимо) и коррекцию этиологической причины.

Компенсаторный эффект при остром респираторном алкалозе: немедленное высвобождение тканевых буферов. Снижение HCO_3^- на 2 ммоль/л при снижении $p\text{CO}_2$ на каждые 10 мм рт. ст.

Хронический респираторный алкалоз (хроническая гипокапния)

Причины: высотная гипоксия, хроническая печеночная недостаточность, хронические болезни легких, травмы ЦНС, беременность.

Длительная гипокапния приводит к снижению $[\text{HCO}_3^-]$ в СМЖ, корректируя pH к нормальным значениям. В течение несколько минут-часов происходит снижение реабсорбции бикарбоната в почках. Состояние стабилизируется к 2–3 дню со снижением в крови $[\text{HCO}_3^-]$. При коррекции хронической гипокапнии для повышения уровня $[\text{HCO}_3^-]$ требуется несколько дней (при быстром повышении наступит метаболический ацидоз).

Компенсаторный эффект при хроническом респираторном алкалозе: снижение почечной реабсорбции HCO_3^- . Максимальная почечная компенсация снижения HCO_3^- на каждые 10 мм рт. ст. Максимальный эффект развивается на 7–9 сут. и может приводить к нормализации pH.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Посредством каких механизмов почки участвуют в регуляции кислотно-основного равновесия?
2. При участии какого фермента в почечных канальцах происходит диссоциация угольной кислоты?
3. Каким органам принадлежит ведущая роль в регуляции кислотно-основного равновесия?
4. Какой показатель является основным критерием классификации респираторных нарушений кислотно-основного равновесия на острые и хронические?
5. Что такое метаболический алкалоз, опасный для жизни?
6. Что понимают под респираторным алкалозом, опасным для жизни?
7. Причины метаболического ацидоза?

ЛИТЕРАТУРА

1. Назаренко Г. И., Кишкун А. А. Лабораторные методы диагностики неотложных состояний / Г. И. Назаренко, А. А. Кишкун. – М.: Медицина, 2002.
2. Лившиц В. М., Сидельникова В. И. Медицинские лабораторные анализы / В. М. Лившиц, В. И. Сидельникова. – М.: ТРИАДА-Х, 2000.
3. Медицинская лабораторная диагностика: программы и алгоритмы / под ред. А. И. Карпищенко. – СПб.: Интермедика, 1997.
4. Клиническая биохимия / под ред. В. А. Ткачука. – М.: Геотар-Мед, 2004.
5. Медицинские лабораторные технологии / под ред. А. И. Карпищенко. – СПб.: Интермедика, 1990.
6. Камышников В. С. Клинико-биохимическая лабораторная диагностика: справочник / В. С. Камышников. – в 2-х т. – Минск: Интерпрессервис, 2003.

ХОД РАБОТЫ

Задание. Определить рН крови в исследуемом образце.

Порядок выполнения работы

1. В пробирку или шприц набрать кровь (капиллярная или венозная кровь).
2. Тщательно перемешать.
3. Поднять клапан входа для шприца.
4. Держать пробирку с материалом во входе для шприца.
5. Выбрать необходимый режим, нажав соответствующую клавишу и нажать *Запуск*.
6. Зонд выйдет из входа для шприца в пробирку.
7. Нажать 4 клавишу *Аспирация* («всасывание»).
8. Оценить полученный результат рН со значением рН нормальной крови (7,35–7,45)

ОФОРМЛЕНИЕ РАБОТЫ

1. Кратко записать теоретические данные.
2. Описать ход работы.
3. Сделать выводы по работе.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 5.

ОСНОВЫ ФОТОМЕТРИИ

Цель: составление программ для автоматизированных биохимических анализаторов на примере общего белка (методом конечной точки) и аланин-аминотрансферазы (кинетическим методом).

Оборудование и материалы: автоматизированный биохимический анализатор «Abbott Architect c8000», автоматические микропипетки, пробирки, штативы для пробирок.

Реактивы: субстраты для определения АЛТ (буферный раствор, рН 7,4): L-аланин, α -кетоглутаровая кислота, биуретовый реактив.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Фотометрия и фотометрическая аппаратура

В клинической лабораторной диагностике чаще всего используются оптические измерительные приборы:

- для измерения светопоглощения (фотометры, спектрофотометры);
- для измерения окраски и светопропускания пленок (денситометры);
- для измерения флуоресценции (флуориметры, спектрофлуориметры, поляризационные флуориметры);
- для измерения интенсивности светоизлучения окраски пламени, эмиссии (пламенные фотометры);
- для измерения количества излученного света (люминометры);
- для измерения поглощения света раскаленными газами (атомные абсорбциометры);
- для измерения светорассеивания (нефелометры).

Биохимические методы чаще всего оканчиваются цветной реакцией, в результате которой прозрачный раствор приобретает окраску, т. е. способность избирательно поглощать (абсорбировать) свет с определенной длиной волны. Разумеется, что тот свет, который не поглотился, проходит через раствор, поэтому субъективно воспринимаемая окраска является дополнительным цветом относительно того, который поглотился. Так, если интенсивно поглощается красный свет, то раствор бывает зеленым или синим, если поглощаются фиолетовый свет – раствор желтый и т. д. График, изображающий поглощение света разными длинами волн, называется *спектральной кривой*, обычно для фотометрии используют область, где поглощение света наибольшее, т. е. максимум спектральной кривой.

Форма кривой, количество максимумов на ней и их положение могут варьироваться, но обычно в видимой области не бывает больше одного-двух максимумов, поэтому выбрать участок спектра, наиболее подходящий для измерения, несложно.

Для аналитических целей пригодны только те цветные реакции, в которых развивается окраска, пропорциональная концентрации исследуемого вещества. В этом случае посредством фотометрии измеряется количество поглощаемого света и по этим данным рассчитывается искомая концентрация. Однако количественные результаты удастся получать лишь в определенном диапазоне концентраций, про который говорят, что в нем соблюдается закон Ламберта–Бера.

Если в растворе имеются непрозрачные частицы, рассеивающие свет, он выглядит мутным. В этом случае фотометрия невозможна, так как трудно узнать, сколько света поглотилось, а сколько рассеялось. Существуют разные способы уменьшить ошибку, вызванную мутностью, но все они эффективны лишь в известной мере. В то же время рассеивание света может быть использовано для определения количества рассеивающих частиц, а также их размеров, такой анализ называется *нефелометрией*, или *турбидиметрией*.

Основные положения и законы абсорбции излучения справедливы для всех областей спектра – от рентгеновского до радиоизлучения. Количественно поглощение излучения системой описывается *законами Бугера–Ламберта–Бера* и *аддитивности*.

При прохождении излучения через раствор светопоглощающего вещества поток излучения ослабляется. Понижение интенсивности зависит от концентрации поглощающего вещества и длины пути, проходимого потоком. Эта зависимость выражается законом Бугера–Ламберта–Бера. Чтобы учесть потери света, прошедшего через раствор, на отражение и рассеяние, сравнивают интенсивности света, прошедшего через исследуемый раствор и растворитель. При одинаковой толщине слоя в кюветах из одного материала, содержащих один и тот же растворитель, потери на отражение и рассеяние света будут примерно одинаковы у обоих пучков света, и уменьшение интенсивности будет зависеть от концентрации вещества.

Обозначим интенсивность падающего потока света как I_0 , I – интенсивность потока света, прошедшего через раствор. Величину I/I_0 называют *пропусканием* и обозначают T ($0 \leq T \leq 1$).

Взятый с обратным знаком логарифм T называют *оптической плотностью* A :

$$A = -\lg T = -\lg \frac{I}{I_0} = \lg \frac{I_0}{I}$$

Для абсолютно прозрачного раствора $A = 0$, для абсолютно непрозрачного $A \rightarrow \infty$.

Уменьшение интенсивности излучения при прохождении его через раствор подчиняется закону Бугера–Ламберта–Бера:

$$\frac{I}{I_0} = 10^{-\varepsilon \ell C} \text{ или } -\lg T = A = \varepsilon \ell C$$

где ε – молярный коэффициент поглощения, l – толщина поглощающего слоя, см; C – концентрация раствора, моль/л.

Физический смысл молярного коэффициента поглощения становится ясен, если принять $l = 1$ см, $C = 1$ моль/л, тогда $A = \varepsilon$. Следовательно, молярный коэффициент поглощения равен оптической плотности одномолярного раствора с толщиной слоя 1 см. *Молярный коэффициент поглощения* – индивидуальная характеристика вещества, зависит от природы вещества и длины волны и не зависит от концентрации и длины кюветы. Поскольку размерность величины ε однозначно задана л/моль.см, то ее обычно не указывают, а приводят численное значение. Значение ε отражает способность вещества поглощать свет; максимально возможное значение ε составляет $\approx 10^5$.

Концентрацию растворов веществ с неизвестными молярными массами обычно выражают в массовых долях (%). В этом случае коэффициент поглощения называют *удельным коэффициентом поглощения* и обозначают символом $E_{1\text{см}}^{1\%}$. Последний численно равен оптической плотности 1 %-ного раствора при $l = 1$ см. При другом способе выражения концентрации раствора (например, г/мл или др.) коэффициент поглощения обозначают символами a или k и указывают размерность.

Экстинкция раствора (величина оптической плотности) – произведение концентрации на толщину слоя раствора. Поэтому не имеет значения, фотометрируется данный раствор в кювете с длиной оптического пути 1 см или тот же раствор, разведенный в два раза, но в кювете с длиной оптического пути 2 см и т. д. Удлинение оптического пути приводит к повышению чувствительности лишь в тех случаях, если объем раствора остается прежним, и сокращается поперечное сечение кюветы. Но возможности тут ограничены, чем уже и длиннее кювета, тем большие требования предъявляются к фокусировке и юстировке пучка света. Поэтому большинство биохимических методик рассчитано так, чтобы фотометрия проводилась в кювете

с длиной оптического пути 1 см, значительно реже используются кюветы с длиной оптического пути 0,5 см, а кюветы с длиной оптического пути 2 см – практически никогда.

В литературе имеется много описаний различных микросистем, в которых повышение чувствительности фотометрии достигается путем использования узких и длинных кювет и значительного сокращения объема фотометрируемого раствора. Но надо иметь в виду, что если объем раствора меньше 0,5 мл, точность отмеривания падает, возрастают ошибки в результате испарения растворов в ходе анализа и т. д., поэтому надо принимать специальные меры предосторожности. Опыт работы показывает, что оптимальными в смысле чувствительности, точности и удобства работы оказываются объемы 0,5–1 мл при длине оптического пути кюветы 1 см. Эти параметры и реализованы в большинстве современных прецизионных приборов.

Точность фотометрии значительно возрастает, если нет необходимости каждый раз вынимать кювету для заполнения ее новой порцией исследуемого раствора. Существуют различные конструкции проточных кювет, из которых исследуемый раствор отсасывают после окончания измерения и заполняют кювету новой порцией, не вынимая ее из гнезда прибора. Выполнять серийные анализы на таких приборах проще и быстрее, чем при использовании съемных кювет. Но надо помнить, что количество раствора должно быть достаточным, чтобы промыть кювету.

Фотометрические приборы делятся на две большие группы: фотометры и спектрофотометры. В фотометрах нужные спектральные диапазоны выделяются при помощи светофильтров, поэтому число участков спектра, в котором может проводиться измерение, равно числу светофильтров. В спектрофотометре участки спектра выделяются при помощи призм или дифракционных решеток, поэтому можно установить любую длину волны в заданном диапазоне. Обычно спектрофотометры – это приборы более высокого класса, чем фотометры, в них можно выделить более узкий (более монохроматический) участок спектра, однако все зависит от конкретной конструкции прибора.

Чаще всего в клинической биохимии фотометрия проводится в области 400–700 нм – видимая область спектра. Свет с большей длиной волны относится к ближней инфракрасной области, измерения в которой приходится делать чрезвычайно редко. Свет с длиной волны короче 400 нм относится к ультрафиолетовому диапазону, причем различают ближнюю область с длиной волны 300–400 нм и коротковолновый диапазон 220–300 нм.

Для фотометрических измерений в видимой и ближней инфракрасной области пригодны кюветы из обычного стекла; для ближней ультрафиолетовой области нужны кюветы из специальных

сортов стекла, так называемые увиолевые, в коротковолновой ультрафиолетовой области пригодны только кюветы из кварца и сапфира. По внешнему виду они плохо различимы, поэтому узнать, из какого материала изготовлена кювета, можно только после определения диапазона длин волн, которые она пропускает.

Щелью спектрофотометра выделяется определенный интервал длин волн: чем шире щель, тем шире и спектральный интервал. Если измерение делается в той области, где чувствительность прибора или прозрачность кювет мала, чтобы вывести прибор на нуль, необходимо увеличить ширину щели. При этом может возникнуть ошибка, когда свет проходит с длинами волн, соседними с выбранной. Если исследуемый объект для них прозрачен, то результаты измерений оказываются ошибочными, так как фактически регистрируется сила света не на избранной длине волны, а на соседней.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Все ли цветные реакции пригодны для аналитических целей?
2. Сформулируйте закон Бугера–Ламберта–Бера.
3. Физический смысл молярного коэффициента поглощения.
4. К чему приводит удлинение оптического пути?

ЛИТЕРАТУРА

1. Назаренко Г. И., Кишкун А. А. Лабораторные методы диагностики неотложных состояний / Г. И. Назаренко, А. А. Кишкун. – М.: Медицина, 2002.
2. Лившиц В. М., Сидельникова В. И. Медицинские лабораторные анализы / В. М. Лившиц, В. И. Сидельникова. – М.: ТРИАДА-Х, 2000.
3. Медицинская лабораторная диагностика: программы и алгоритмы / под ред. А. И. Карпищенко. – СПб.: Интермедика, 1997.
4. Клиническая биохимия / под ред. В. А. Ткачука. – М.: Геотар-Мед, 2004.
5. Медицинские лабораторные технологии / под ред. А. И. Карпищенко. – СПб.: Интермедика, 1990.
6. Камышников В. С. Клинико-биохимическая лабораторная диагностика: справочник / В. С. Камышников. – в 2-х т. – Минск: Интерпрессервис, 2003.

ХОД РАБОТЫ

Задание I. Определение наиболее важных параметров для введения программы в автоматизированный биохимический анализатор для определения концентрации общего белка в сыворотке крови.

Принцип метода

Метод анализа основан на образовании комплексов, окрашенных в фиолетовый цвет (биуретовый реактив), при взаимодействии белков с ионами меди.

Порядок выполнения работы

1. Определить наиболее важные параметры для ввода в автоматический анализатор из инструкций к наборам для определения концентрации общего белка в сыворотке крови биуретовым методом:

2. Вести адекватный объем сыворотки (в мкл).

3. Ввести соответствующий объем реагента (биуретового реактива) (в мкл).

4. Ввести значение длины волны (λ), характерное для данного типа реакции.

5. Указать время реакции, необходимое для осуществления полного окрашивания комплекса – в мин.

6. Определить тип реакции, характерный для данного набора (конечная точка, кинетика).

7. Дополнительно определить свободное место на карусели реагентов для установки нового реагента.

8. Результаты программирования предоставить в печатном виде.

Задание II. Определение наиболее важных параметров для введения программы в автоматизированный биохимический анализатор для определения активности аланинаминотрансферазы (АЛТ) кинетическим методом.

Принцип метода

Кинетический метод определения каталитической активности АЛТ основан на последовательности ферментативных реакций, в результате которых из L-аланина и 2-оксоглутарата образуются глутамата и пирувата (под действием АЛТ). Далее из пирувата и НАДН + H^+ под действием ЛДГ образуется лактат и НАД⁺.

Порядок выполнения работы

1. Определить наиболее важные параметры для ввода в автоматический анализатор из инструкций к наборам для определения активности АЛТ в сыворотке крови кинетическим методом:

2. Вести адекватный объем сыворотки (в мкл).
3. Ввести соответствующий объем реагента (в мкл).
4. Ввести значение длины волны (λ , в нм), характерное для данного типа реакции.
5. Указать время реакции, необходимое для осуществления полного окрашивания комплекса (в мин).
6. Определить тип реакции, характерный для данного набора (конечная точка, кинетика).
7. Дополнительно определить свободное место на карусели реагентов для установки нового реагента.
8. Результаты программирования предоставить в печатном виде.

ОФОРМЛЕНИЕ РАБОТЫ

1. Кратко записать теоретические данные.
2. Описать ход работы.
3. Сделать выводы по работе.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 6.

КЛИНИЧЕСКАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ

Цель: количественное определение активности аспартат-аминотрансферазы и аланин-аминотрансферазы в сыворотке крови с использованием тест-наборов, применяющихся в клинической практике.

Оборудование и материалы: спектрофотометр «Solar», кюветы стеклянные, пробирки, штативы для пробирок, колбы на 100–250 мл, автоматические микропипетки, термостат, палочки стеклянные.

Реактивы: субстраты для определения активности АСТ (буферный раствор, pH 7,4); L-аспарагиновая кислота; α -кетоглутаровая кислота; субстраты для определения АЛТ (буферный раствор, pH 7,4): L-аланин; α -кетоглутаровая кислота; 2,4-динитрофенилгидразин (2,4-ДНФГ), раствор; пируват натрия, стандартный раствор; физиологический раствор (NaCl, 0,9 % раствор); вода дистиллированная.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Промежуточный обмен аминокислот

В результате комбинированного действия всего комплекса протеолитических ферментов желудочно-кишечного тракта осуществляется полный гидролиз пищевых белков до свободных аминокислот. Обычная диета включает большой избыток данных соединений. Это означает, что количество поступающих с пищей аминокислот значительно превышает потребности в них клеток для биосинтеза собственных специфических белков и многих важных интермедиатов. Поскольку сами аминокислоты, как и белки, не накапливаются и не запасаются в тканях, их избыточное количество либо окисляется до CO_2 и H_2O с образованием энергии, либо после отщепления аминокрупп запасается в виде гликогена и жиров (рис. 6.1).

Из кишечника аминокислоты всасываются в кровь и через порталную вену транспортируются в печень, а также разносятся кровью по всему организму. В печени аминокислоты используются для синтеза собственных белков гепатоцитов и белков плазмы крови, а также для синтеза биологически активных веществ (гормонов, биогенных аминов, пептидов) и специфических азотсодержащих соединений (гема, нуклеотидов, кофакторов, креатина и др.). Именно печень ответственна за регуляцию пула свободных аминокислот организма. Основные направления метаболических путей, связанных с превращениями аминокислот, показаны на схеме, приведенной на рис. 6.1.

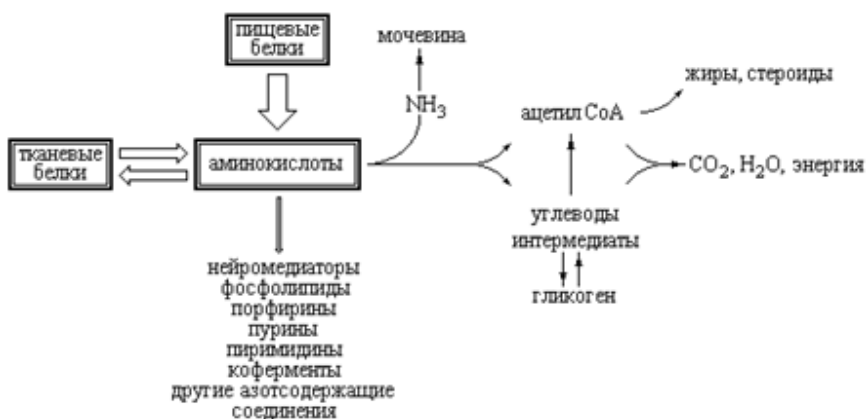


Рис. 6.1. Схема основных направлений метаболических путей, участвующих в формировании пула свободных протеиногенных аминокислот

Аминокислоты, не используемые непосредственно для ресинтеза тканевых белков, подвергаются дальнейшим превращениям, совокупность которых описывается как промежуточный обмен аминокислот. Условно промежуточный обмен этих соединений подразделяют на *общие пути обмена аминокислот* и *специфические пути распада и синтеза индивидуальных аминокислот*. К общим путям обмена относят метаболические пути, включающие реакции *декарбоксилирования*, *переаминирования*, *окислительного дезаминирования*, а также реакции, приводящие к образованию конечных продуктов распада аминокислот в организме человека.

Реакции трансаминирования, катализируемые ферментами *семейства трансаминаз*, называемых также *аминотрансферазами*, являются общими реакциями, как для катаболических, так и анаболических путей промежуточного обмена аминокислот. Принцип реакций трансаминирования состоит в переносе аминогруппы от α -аминокислоты (без промежуточного образования свободного аммиака) на α -кетокислоту с образованием новой α -кето- и новой α -аминокислоты. В количественном отношении перенос аминогрупп на α -кетокислоты является наиболее важной реакцией метаболизма аминокислот. Трансаминирование обнаружено *in vivo* для всех основных аминокислот за исключением *лизина*, *треонина* и *пролина*. Большинство ферментов семейства трансаминаз специфичны к α -кетоглутаровой или глутаминовой кислотам в качестве одного из субстратов реагирующей пары. Специфичность различных трансаминаз

к другому субстрату (другой аминокислоте или кетокислоте) может быть строгой или широкой. Та или иная аминокислота и соответствующая ей кетокислота находятся в равновесии с α -кетоглутаратом и глутаминовой кислотой (рис. 6.2):

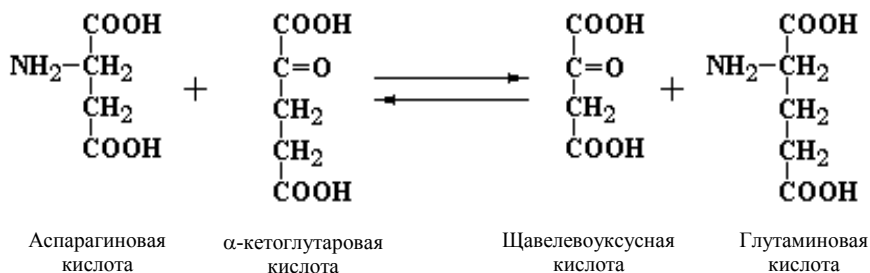


Рис. 6.2. Схема реакции трансаминирования аспартата

Константа равновесия для большинства реакций переаминирования близка к 1, поэтому фактическое равновесие реакции определяется реальными концентрациями пары субстратов, которые зависят от клеточных процессов продукции или расхода соответствующих аминокислот.

Активность любой трансаминазы зависит от присутствия в активном центре фермента кофактора, представленного *пиридоксальфосфатом*.

Кофермент связан с белком ионными взаимодействиями, вдобавок альдегидная группа пиридоксальфосфата образует Шиффово основание с ϵ -аминогруппой лизина белковой молекулы.

Механизм реакции переаминирования отражает схема (рис. 6.3), которая показывает первую стадию реакции трансаминирования – образование интермедиата, представленного Шиффовым основанием кофактора и аминокислоты-субстрата. В результате внутримолекулярной перестройки интермедиата происходит освобождение кетокислоты и образование, связанного с ферментом пиридоксаминфосфата. При взаимодействии пиридоксаминфосфата с другой кетокислотой, за счет обращения реакции, образуется новая аминокислота. Таким образом, в процессе переаминирования кофермент выполняет функцию переносчика аминогруппы.

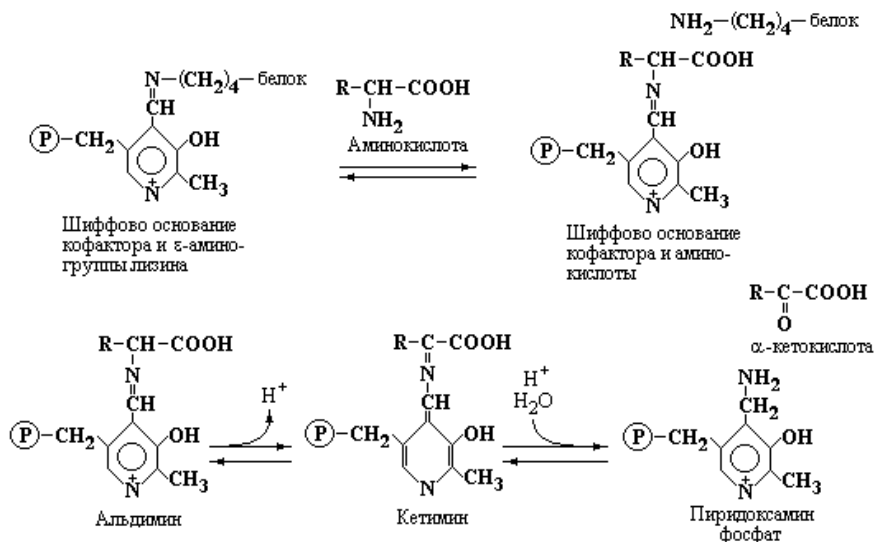


Рис. 6.3. Механизм реакции трансаминирования, предложенный А. Браунштейном и Э. Снеллом

Клиническое значение определения активности трансаминаз

Реакции трансаминирования наиболее эффективно протекают в цитозоле клеток печени, мышц, мозга и других тканей. Однако, отдельные трансаминазы содержатся в различных органах в неодинаковых количествах.

Для клинических целей наиболее важным является определение активностей аспартат-аминотрансферазы (АСТ) и аланин-аминотрансферазы (АЛТ). Особое значение для диагностики имеют ситуации, когда активность трансаминаз оказывается повышенной в плазме крови. Это свидетельствует об усиленных процессах цитолиза в том или ином органе. Трансаминазный тест используется не только для постановки диагноза заболевания, но и для прогноза и контроля эффективности лечения.

В сыворотке крови здоровых людей активность АСТ и АЛТ в тысячи раз ниже, чем в клетках паренхиматозных органов. В результате органических поражений клеток при острых и хронических заболеваниях происходит повреждение последних и, соответственно, обеспечивает выход трансаминаз в кровь из очага поражения. Наибольшая активность аспартат-аминотрансферазы отмечена в кардиомиоцитах, в то время как аланин-аминотрансфераза в наибольших количествах присутствует в гепатоцитах. На различиях в уровнях активностей разных ферментов семейства трансаминаз в различных органах и основаны физиологические тесты:

- при инфаркте миокарда уровень АСТ в сыворотке крови резко повышается (в 20–30 раз) уже через 3–4 часа после наступления инфаркта. Максимум активности приходится на конец 1-х суток, а через 2–3 дня при благоприятном исходе болезни уровень сывороточных трансаминаз возвращается к норме;

- при остром инфекционном гепатите активность АЛТ обычно повышена в большей степени, чем АСТ;

- при циррозе печени активность АСТ повышается больше, чем активность АЛТ;

- при метастазах в печени или первичной опухоли печени активность АСТ выше активности АЛТ;

- при гипоксии тканей активности АЛТ и АСТ повышаются одновременно;

- при стенокардии активности АСТ и АЛТ остаются в норме.

Снижение активностей АСТ и АЛТ может иметь место в случае недостаточности пиридоксина (витамина В₆), часто в результате повторных процедур гемодиализа, при почечной недостаточности и при беременности.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Пути утилизации всосавшихся аминокислот в организме человека.

2. Сущность реакций трансаминирования, ферменты, участвующие в переаминировании аминокислот.

3. Биолоическое значение реакций трансаминирования.

4. Окислительное дезаминирование аминокислот.

5. Оксидазы D- и L-аминокислот.

6. Клиническое значение определения активности трансаминаз.

7. Принцип метода определения каталитической активности трансаминаз.

ЛИТЕРАТУРА

1. Клиническая биохимия / под ред. Ткачука В. А. – Москва: Изд. дом «ГОЭТАР – МЕД», 2004. – 506 с.

2. *Ройтберг Г. Е., Струтынский А. В.* Лабораторная и инструментальная диагностика заболеваний внутренних органов. – Москва: БИНОМ, 1999. – 621 с.

3. *Камышников В. С.* Карманный справочник врача по лабораторной диагностике – Москва: «МЕДпресс-информ», 2007.

4. Руководство к практическим занятиям по клинической лабораторной диагностике / под ред. проф. М. А. Базарновой, проф. В. Т. Морозовой. – Киев: «Вища школа», 1988.

5. Патофизиология крови / Фред Дж. Шиффман. пер. с англ. – СПб.: «Невский Диалект», 2000.

6. Исследование системы крови в клинической практике / под ред. Г. И. Козинца, В. А. Макарова. – Москва: Триада-Х, 1997.

7. *Первушин Ю. В.* Гематологические исследования в клинической лабораторной диагностике: учебное пособие / Ю. В. Первушин. – Ставрополь, 2006.

ХОД РАБОТЫ

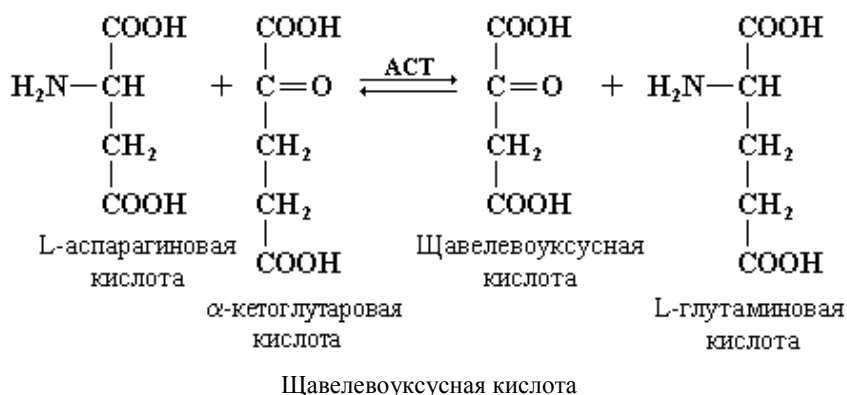
Задание. Определить активности аспартат-аминотрансферазы и аланин-аминотрансферазы в сыворотке крови человека с использованием тест-наборов, применяющихся в клинической практике.

Принцип метода

В результате реакций переаминирования, происходящих под действием аланин-аминотрансферазы или аспартат-аминотрансферазы образуются пировиноградная или щавелевоуксусная кислоты, соответственно.



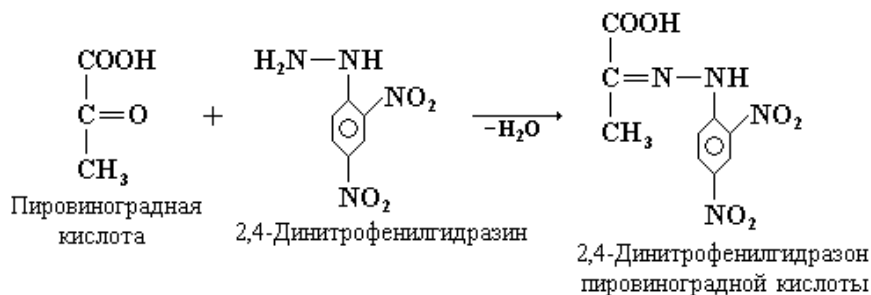
Пировиноградная кислота



Впоследствии, в процессе ферментативного декарбоксилирования щавелевоуксусная кислота способна превращаться в пировиноградную кислоту.



При добавлении 2,4-динитрофенилгидразина (2,4-ДНФГ) последний в щелочной среде образует с пировиноградной кислотой окрашенный продукт – 2,4-динитрофенилгидразон пировиноградной кислоты, интенсивность окраски которого пропорциональна количеству образовавшейся пировиноградной кислоты:



Порядок выполнения работы

1. В соответствии с табл. 6.1 готовят опытную и холостую пробы для определения активности трансаминаз:

Таблица 6.1

Ингредиенты	Опытная проба, мл		Холостая проба, мл
	АСТ	АЛТ	
Субстратный раствор (прогретый при температуре 37 °С)	0,5	0,5	0,5
Сыворотка крови	0,1	0,1	–

2. Опытные пробы перемешивают стеклянной палочкой и инкубируют в течение 1 часа в суховоздушном термостате при 37 °С.

3. Далее во все пробы добавляют по 0,5 мл 2,4-ДНФГ (к холостой пробе – также 0,1 мл сыворотки крови).

4. Пробы перемешивают и выдерживают 10 мин при комнатной температуре.

5. Оптическую плотность в опытных пробах определяют спектрофотометрически при длине волны 540 нм против холостой пробы.

6. Для расчета активностей трансаминаз производят построение калибровочных графиков. Для построения калибровочных графиков готовят ряд разведений субстратов (по 5 проб для АСТ и для АЛТ) в соответствии с приведенной табл. 6.2.

Таблица 6.2

№ пробирки	Физиологический раствор, мл	Стандартный раствор пирувата натрия, мл	Субстратный раствор для АСТ или АЛТ соответственно, мл
1	0,1	0,05	0,45
2	0,1	0,10	0,40
3	0,1	0,15	0,35
4	0,1	0,20	0,30
5	0,1	0,25	0,25

Во все пробирки вносят по 0,5 мл раствора 2,4-ДНФГ и далее пробы обрабатывают, как опытные (п. 4–5).

На основании выполненных измерений оптической плотности заполняют табл. 6.3 и, по полученным численным значениям, строят калибровочные графики.

Таблица 6.3

№ пробирки	АСТ		АЛТ	
	Активность, ммоль/ч.л	A ₅₄₀	Активность, ммоль/ч.л	A ₅₄₀
1	0,5		1,0	
2	1,0		2,0	
3	1,5		3,0	
4	2,0		4,0	
5	2,5		5,0	

7. По графикам определяют активности трансаминаз в опытных пробах.

Норма активности трансаминаз в сыворотке крови: АСТ – 0,1–0,45 ммоль/ч.л, АЛТ – 0,1–0,68 ммоль/ч.л.

ОФОРМЛЕНИЕ РАБОТЫ

1. Кратко записать теоретические данные.
2. Описать ход работы.
3. Сделать выводы по работе.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 7.

ХРОМАТОГРАФИЯ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

Цель: применение метода жидкостной хроматографии для анализа активности ферментов деградации нуклеиновых кислот.

Оборудование и материалы:

- жидкостный хроматограф «ÄKTA prime plus GE General Electric» (Швеция);
- хроматографическая колонка «Pharmacia» размером 1,6 × 60 см;
- рН-метр «Hanna»;
- фильтрующие элементы для образцов и растворителей фирмы «Nalgene»;
- весы аналитические;
- автоматические микропипетки;
- камеры для тонкослойной хроматографии;
- баня водяная;
- лампа «UV-240 Lamp» фирмы «Merck» (Германия);
- эппендорфы;
- штатив для эппендорфов;
- цилиндры мерные на 250 мл и 100 мл.

Реактивы:

- ДНК (натриевая соль);
- смола для гельфильтрации «Toyopearl HW-55 Toyosoda» (Япония);
- культуральная жидкость *Spicaria violaceae* (КЖ);
- тригидроксиметиламинометан (Трис);
- пластины для тонкослойной хроматографии Silufol UV254 «Merck»;
- гексагидрат хлорида магния ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$);
- HCl , конц.;
- калий фосфорнокислый однозамещенный (KH_2PO_4);
- гидроксид калия (KOH);
- дигидроортофосфат аммония ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$);
- метанол (этанол);
- дистиллированная вода.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Определение типа активности нуклеаз с использованием хроматографического метода

Одним из методов определения типа активности, проявляемой нуклеазами, является метод колоночной гель-хроматографии. При нанесении на колонку высокополимерной ДНК она элюируется в свободном объеме острым пиком (рис. 7.1).

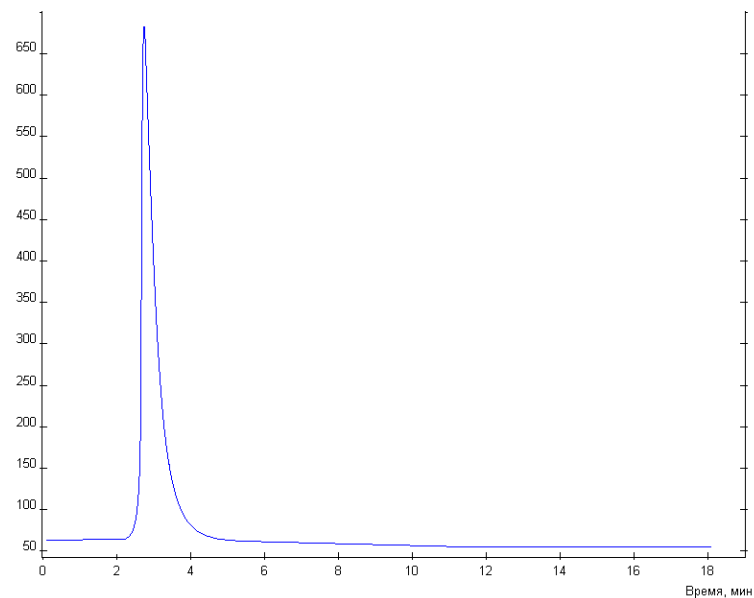


Рис. 7.1. Профиль элюции высокополимерной ДНК. Гель-фильтрационная колоночная хроматография на Toyopearl HW-55

Обработка препарата ДНК эндонуклеазами приводит к резкому снижению молекулярной массы ДНК, что отражается на характере хроматографического поведения, а именно – отдельные фрагменты ДНК элюируются в виде серии близкорасположенных пиков, которые на хроматограмме имеют вид широкого уплощенного суммарного пика (рис. 7.2).

При обработке ДНК экзонуклеазами происходит последовательное отщепление нуклеотидов от 5- или 3-концов молекулы, поэтому через некоторое время кроме ДНК раствор будет содержать четыре фракции канонических нуклеотидов (dAMP, dTMP, dCMP, dGMP), и на хроматограмме появляются четыре небольших (по сравнению с пиком ДНК) пика, соответствующих каждому из четырех продуктов гидролиза (рис. 7.3).

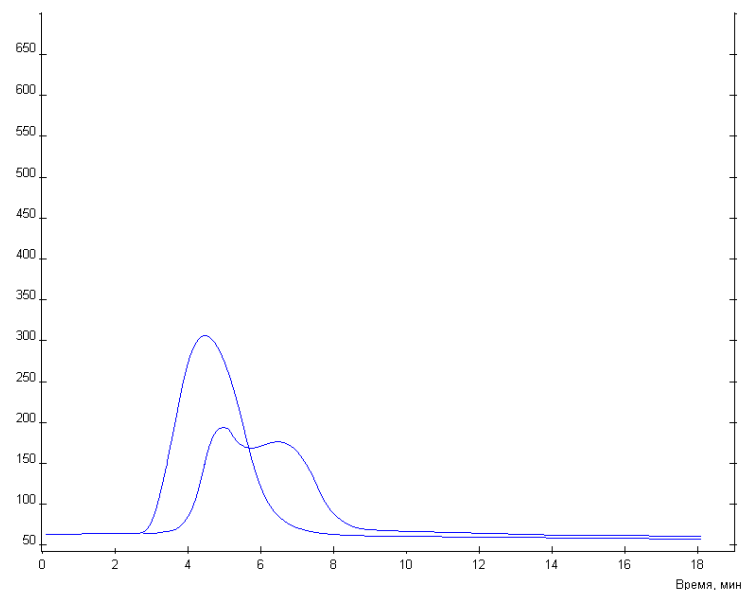


Рис. 7.2. Профиль элюции фрагментов ДНК с близкой молекулярной массой.
Хроматографическое разделение методом колоночной гель-фильтрации

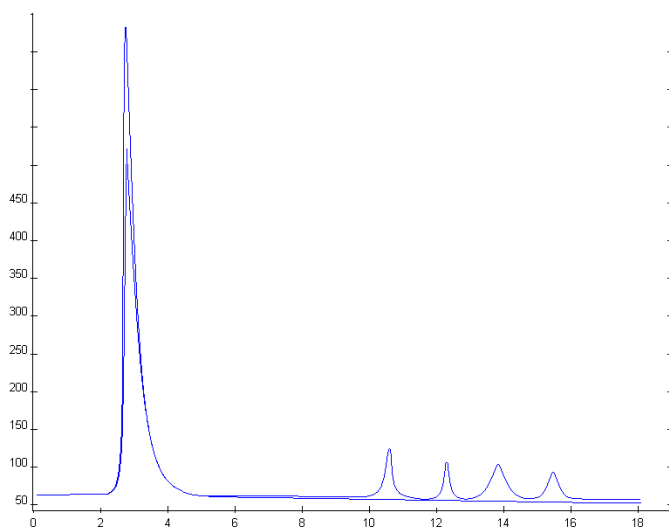


Рис. 7.3. Хроматограмма разделения высокополимерной ДНК, подвергшейся экзонуклеолитической деградации. На хроматограмме отчетливо видны пики, соответствующие индивидуальным дезоксинуклеозидмонофосфатам

Ферментативный гидролиз ДНК, с последующим дефосфорилированием нуклеозидмонофосфатов, нашел применение как способ получения нуклеозидов. Данный подход в получении нуклеозидов оказался намного более эффективным, чем химический гидролиз нуклеиновых кислот или химический синтез нуклеозидов.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Нуклеазы.
2. Классификация нуклеаз.
3. Эндонуклеазы. Рестриктазы как группа специфических эндонуклеаз.
4. Хроматографическое определение активности эндонуклеаз. Колоночная хроматография, используемая для определения специфичности нуклеаз.
5. Экзонуклеазы.
6. Хроматографическое определение активности экзонуклеаз. Колоночная хроматография, позволяющая идентифицировать действие экзонуклеаз.
7. Основные этапы биотехнологического получения нуклеотидов и нуклеозидов.
8. Ферменты, используемые для получения нуклеотидов и нуклеозидов.
9. Причины двухстадийности гидролиза ДНК.
10. Разделение нуклеотидов методом ТСХ. Принцип разделения.
11. Поведение нуклеозидов в условиях хроматографирования на пластинах Silufol UV₂₅₄.

ЛИТЕРАТУРА

1. Клиническая биохимия / под ред. В. А. Ткачука– Москва: Изд. дом «ГООТАР – МЕД», 2004. – 506 с.
2. *Ройтберг Г. Е., Струтынский А. В.* Лабораторная и инструментальная диагностика заболеваний внутренних органов. – Москва: БИНОМ, 1999. – 621 с.
3. *Камышников В. С.* Карманный справочник врача по лабораторной диагностике – Москва: «МЕДпресс-информ». – 2007.
4. Руководство к практическим занятиям по клинической лабораторной диагностике / под ред. проф. М. А. Базарновой, проф. В. Т. Морозовой. – Киев: «Вища школа», 1988.
5. Патология физиологии крови / Фред Дж. Шиффман. пер. с англ. – СПб.: «Невский Диалект», 2000.

6. Исследование системы крови в клинической практике / под ред. Г. И. Козинца, В. А. Макарова. – Москва: Триада-Х, 1997.

7. *Первушин Ю. В.* Гематологические исследования в клинической лабораторной диагностике: учебное пособие / Ю. В. Первушин. – Ставрополь, 2006

ХОД РАБОТЫ

Задание I. Подготовка буферных растворов, сорбента Toyopearl HW-55 для колоночной хроматографии и выполнение гидролиза ДНК ферментами мицелия *Spicaria violaceae*.

Приготовление 250 мл 10 mM калий-фосфатного буферного раствора pH 6,30 для элюции нуклеотидов.

Порядок выполнения:

1. Рассчитать навеску KH_2PO_4 (М.м. = 136,08 г/моль).
2. Растворить ее в ~200 мл воды.
3. С помощью pH-метра гидроксидом калия довести значение pH раствора до 6,30.
4. Перенести в мерную колбу и довести объем до 250 мл.
5. Полученный буферный раствор профильтровать.

Приготовление 250 мл 0,4 М раствора однозамещенного фосфата аммония, содержащего 4 % метанола (этанола) для элюции нуклеозидов:

Порядок выполнения:

1. Рассчитать навеску $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (М.м. = 115,03 г/моль).
2. Растворить ее в ~200 мл воды.
3. Добавить 4 % метанола (этанола).
4. Перенести в мерную колбу и довести объем до 250 мл.
5. Полученный раствор профильтровать.

Приготовление 100 мл 20 mM ТрисHCl буфера pH 7,0, содержащего 1 mM MgCl_2 для гидролиза ДНК.

Порядок выполнения:

1. Рассчитать навеску Трис (М.м. = 121,14 г/моль).
2. Приготовить навеску $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (М.м. = 203,31 г/моль).
3. Растворяют в ~ 80 мл воды.
4. С помощью pH-метра разбавленным раствором HCl довести значение pH буфера до 7,0.
5. Перенести в мерную колбу и довести объем до 100 мл.

Подготовка сорбента Toyopearl HW-55 и набивка хроматографической колонки.

1. Требуемое количество сорбента Toyopearl HW-55 перенести в химический стакан, добавить воду и стеклянной палочкой перемешать суспензию.

2. Не допуская полного оседания сорбента верхний слой декантировать для удаления мелких частиц.

3. Операцию повторить 2–3 раза.

4. Суспензию Toyopearl HW-55 перенести в колонку используя дополнительный резервуар, прикрепляемый сверху хроматографической колонки. Следует помнить, что скорость оседания сорбента в колонке должна быть выше скорости последующей элюции колонки.

5. Колонку уравновесить 10 мМ калий-фосфатным буфером pH 6,30.

Гидролиз ДНК

Гидролиз проводят в 20 мМ ТрисHCl-буфере pH 7,0, содержащем 1 мМ MgCl₂.

Объем реакционной смеси составляет 1,5 мл.

А. Гидролиз ДНК до 5-моновуклеотидов:

1. Приготовить навеску ДНК (натриевая соль) массой 7,5 мг.

2. Растворить ДНК в 1,5 мл ТрисHCl-буфера pH 7,0, содержащего 1 мМ MgCl₂.

3. Полученную реакционную смесь поместить в водяную баню при температуре 65 °С.

4. Добавить 0,4 мл культуральной жидкости (КЖ), содержащей ферменты мицелия *Spicaria violaceae*.

Реакцию проводят при температуре 65 °С.

5. Через 15 мин (образец № 1) и 30 мин (образец № 2) отбирают по 0,5 мл смеси. Образцы фильтруют и замораживают для последующего анализа методами колоночной и тонкослойной хроматографии.

Б. Гидролиз ДНК до нуклеозидов:

1. После гидролиза А оставшуюся часть реакционной смеси охлаждают до 50 °С.

2. Дополнительно добавляют в нее еще 200 мкл КЖ и дальнейшую реакцию проводят в водяной бане при 50 °С.

3. Через 20 мин (образец № 3) и 40 мин (образец № 4) отбирают 0,5 мл смеси, фильтруют и замораживают для последующего анализа методами колоночной и тонкослойной хроматографии с целью идентификации и определения содержания нуклеозидов.

Задание II. Анализ состава гидролизатов ДНК методами колоночной и тонкослойной хроматографии.

Хроматографический анализ

А. Анализ образцов реакционной смеси № 1 и № 2 на содержание нуклеотидов.

Колонка: гель-фильтрационная колонка «Pharmacia» размером $1,6 \times 60$ см.

Условия: элюция 10 мМ калий-фосфатным буфером pH 6,30; скорость тока 0,2 мл /мин/см²; детектирование при длине волны 260 нм.

1. Устанавливают колонку.
2. Промывают колонку водой.
3. Уравновешивают 10 мМ калий-фосфатным буфером pH 6,30.
4. Наносят 500 мкл образца № 1.
5. За ходом элюции нуклеотидов следят с помощью UV-детектора хроматографа при длине волны 260 нм.

6. Дополнительно проводят анализ смеси методом тонкослойной хроматографии на пластинах Silufol UV254 «Merck» или пластинах TLC-Card Silica gel254 «Fluka» используя систему растворителей диоксан–вода–аммиак (6 : 6 : 1).

7. Идентификацию разделяемых компонентов реакционной смеси в УФ-свете с использованием лампы «UV-240 Lamp» фирмы «Merck» (Германия)

8. Аналогично анализируют образец № 2.
9. После окончания работы колонку промывают водой.

Б. Анализ образцов реакционной смеси № 3 и № 4 на содержание нуклеозидов.

Колонка: гель-фильтрационная колонка «Pharmacia» размером $1,6 \times 60$ см.

Условия: элюция 10 мМ калий-фосфатным буфером pH 6,30; скорость тока 0,2 мл /мин/см²; детектирование при длине волны 260 нм.

1. Устанавливают колонку.
2. Анализ проводят в соответствии с пунктами 2–7 предыдущего раздела.

ОФОРМЛЕНИЕ РАБОТЫ

1. Кратко записать теоретические данные.
2. Описать ход работы.
3. Сделать выводы по работе.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 8.

ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА

Цель: исследование фракций липопротеинов сыворотки крови методом зонального электрофореза.

Оборудование и материалы: денситометр, аппликаторы на 7 проб – 10 шт., фильтровальная бумага – 10 шт.

Реактивы: набор реагентов для электрофоретического исследования липопротеинов «Hydragel Lipoprotein (c) К 20», производства SEBIA (Франция).

Состав набора:

1. Агарозные гели – 10 шт.
2. Трис-барбиталовый буфер (концентрат) 3 флакона по 100 мл в каждом.
3. Краситель судан черный (концентра) – 1 флакон, 20 мл.
4. Промывающий раствор – 1 флакон, 80 мл.

Совместно могут использоваться только реагенты и комплекующие, находящиеся в данной упаковке.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Электрофорез (от электро- и греч. phoresis – несение, перенесение) – направленное движение коллоидных частиц или макроионов под действием внешнего электрического поля. Электрофорез был открыт Ф. Рейссом в 1807 г. и считается важнейшей разновидностью электрокинетических явлений. Скорость ϑ движущихся частиц приближенно связана с напряженностью электрического поля E уравнением Смолуховского:

$$\vartheta = \frac{DE\xi}{4\pi\eta}$$

где η – вязкость среды, D – диэлектрическая проницаемость, ξ – электрокинетический потенциал.

Электрофорез используют в электрохимии для изучения двойного электрического слоя, адсорбции ионов на поверхности, в медицине. В промышленности электрофорез используют для выделения каучука из латекса, очистки воды, отделения каолина от песка и др. В биохимии электрофорез служит для анализа, разделения и очистки биополимеров (главным образом белков), бактериальных клеток, вирусов, а также

аминокислот, витаминов и др. Практическое применение электрофореза началось после создания шведским учёным А. Тиселиусом специального аппарата для фронтального (или свободного) электрофореза белков в растворе (1937). Наиболее широкое распространение нашли электрофоретические методы с использованием инертных носителей (бумаги, гелей и др.), получившие общее название зонального электрофореза, т. к. фракции разделяемых веществ образуют в толще носителя отдельные, несмешивающиеся зоны. Электрофорез часто сочетают с другими методами разделения биоорганических соединений (например, с хроматографией). Разработана техника концентрирования электрофоретических зон биополимеров в гелях, значительно повышающая разрешающую способность метода (диск-электрофорез). Применение реакции антиген-антитело в сочетании с электрофорезом послужило основой для создания метода иммуно-электрофореза. Электрофоретический анализ биологических жидкостей, например сыворотки крови для исследования главным образом белков, широко используют в диагностике многих заболеваний.

Электрофорез – процесс направленного движения частиц, диспергированных в жидкости в постоянном электрическом поле. Частицы одного и того же вещества несут одинаковые по знаку заряды. В электрическом поле положительно заряженные частицы перемещаются к отрицательному электроду – катоду, отрицательно заряженные частицы к положительному электроду – аноду. Движение частиц к катоду иногда называют катафорезом, к аноду – анафорезом. Скорость движения зависит от массы частиц, и их заряда в данных условиях, благодаря чему электрофорез позволяет разделять смеси веществ на составляющие их компоненты.

Электрофоретическая подвижность – это скорость движения частицы (обычно выражаемая в см/с) при напряженности электрического поля в 1 В/см. Эта величина имеет размерность $\text{см}^2 \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{В}^{-1}$, а её знак совпадает со знаком суммарного заряда макромолекулы.

Различают следующие виды электрофореза.

1. *Свободный* (фронтальный) электрофорез. В этом случае электрофорез проводят в приборах, существенной частью которых является U-образная трубка (рис. 8.1).

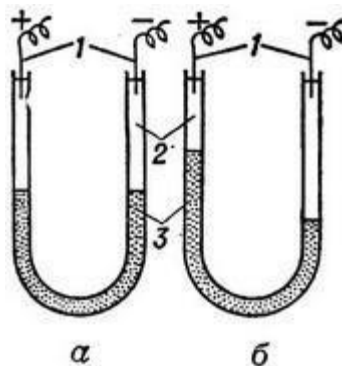


Рис. 8.1. Схема свободного (фронтального) электрофореза.
Положение границ раздела: а – до опыта; б – после опыта.
1 – электроды; 2 – растворитель; 3 – раствор белка

Нижнюю часть трубки заполняют испытуемым объектом, например раствором белка, на который наслаивают растворитель. В растворитель погружают электроды, соединенные с источником постоянного тока. При этом электрически заряженные частицы белка перемещаются к одному из электродов, вследствие чего граница раздела между раствором и растворителем в одном колене поднимается (восходящая граница), а в другом опускается (нисходящая граница). Приборы для свободного электрофореза, снабженные устройством автоматической регистрации перемещения каждого компонента в исследуемом объекте, применяют при анализе дисперсных систем, выделении из них отдельных компонентов, а также при клиническом исследовании сыворотки крови.

2. Электрофорез на носителях (*зональный электрофорез*). В качестве носителей используют бумагу, гели крахмала, агара, полиуретанов и др. В клинических лабораториях особо широкое распространение для исследования сыворотки крови получил электрофорез на бумаге, который проводится следующим образом: на полоску специального сорта бумаги, пропитанной соответствующим буферным раствором (см.), наносят капельку сыворотки крови. Концы полоски опускают в чашечки, заполненные данным буферным раствором и снабженные электродами. При пропускания постоянного электрического тока отдельные белки сыворотки перемещаются вдоль полоски с разными скоростями, а иногда и в разных направлениях. По истечении определенного времени пропускание тока прекращают, полоску бумаги подсушивают и обрабатывают реактивом на белок. При этом на бумажной электрофореграмме выявляются окрашенные пятна. По числу пятен судят о количестве белковых фракций, а по

интенсивности окраски пятен – о количественном содержании каждой белковой фракции в исследуемой сыворотке.

В последнее время широкое применение в исследовательской работе и в клинической диагностике находит электрофорез в тонких слоях гелей, нанесенных на стеклянные пластинки (дисковый электрофорез), а также помещенных в стеклянные трубочки.

Электрофоретические исследования

В клинической практике применяется зональный электрофорез для исследования белкового состава жидкостей организма. Чаще используют электрофорез на бумаге как наиболее простой по технике выполнения. Электрофорез в агаровом и крахмальном гелях используется в медицинской практике преимущественно в научных исследованиях.

При помощи электрофореза на бумаге разделяют в крови фракции белков, липопротеидов, глюкoпротеидов, а также белковые фракции мочи, желудочного сока, экссудатов и т. и. В крови электрофорез выявляет 5 основных фракций белка: альбумины, альфа-1 (α_1) альфа-2(α_2)-, бета(β)- и гамма(γ)-глобулины. В норме их соотношение более или менее постоянно. При некоторых заболеваниях эти соотношения меняются, что может иметь диагностическое и прогностическое значение. Так, например, при острых воспалительных процессах увеличивается содержание в крови α_2 -глобулинов; в период выработки иммунитета нарастает содержание γ -глобулинов; при поражениях печени снижается содержание альбуминов и т. и. При некоторых заболеваниях (например, при миеломной болезни) в плазме крови появляются патологические белки (парапротеины), которые могут быть выявлены с помощью методов электрофореза, что имеет большое диагностическое значение.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Основной принцип электрофоретического разделения.
2. Фракционный состав типичной электрофореграммы протеинов.
3. Основная цель электрофореза с иммуннофиксацией.
4. Характеристика электрофореграмм при гиперлипидемиях.
5. Клиническое значение электрофореза изоферментов креатинфосфокиназы.
6. Основные точки приложения электрофореза в диагностике гемоглобинопатии.
7. Наиболее современные направления технологий электрофореза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Назаренко Г. И., Кишкун А. А. Лабораторные методы диагностики неотложных состояний / Г. И. Назаренко, А. А. Кишкун. – М.: Медицина, 2002.
2. Лившиц В. М., Сидельникова В. И. Медицинские лабораторные анализы / В. М. Лившиц, В. И. Сидельникова. – М.: ТРИАДА-Х, 2000.
3. Медицинская лабораторная диагностика: программы и алгоритмы / под ред. А. И. Карпищенко. – СПб.: Интермедика, 1997.
4. Клиническая биохимия / под ред. В. А. Ткачука. – М.: Геотар-Мед, 2004.
5. Медицинские лабораторные технологии / под ред. А. И. Карпищенко. – СПб.: Интермедика, 1990.
6. Камышников В. С. Клинико-биохимическая лабораторная диагностика: справочник / В. С. Камышников. – в 2-х т. – Минск: Интерпрессервис, 2003.

ХОД РАБОТЫ

Задание. Определить профиль липопротеинов в сыворотке крови человека.

Принцип метода

Липопротеины представляют собой циркулирующие комплексы липидов и протеинов. Посредством зонального (по заряду) электрофореза, также как и методами ультрацентрифугирования (по плотности) и методами молекулярной фильтрации или электрофореза в полиакриламидном геле (по размеру) выделяется 4 основных класса липопротеинов.

При разгонке на агарозных гелях в порядке возрастания подвижности выделяются следующие главные липопротеины:

- хиломикроны – это очень большие молекулы с высоким содержанием триглицеридов, присутствующие в качестве небольших частиц в сыворотке и создающие эффект опалесценции. Обычно они остаются в точке аппликации;

- β -липопротеины или липопротеины низкой плотности (LDL): обычно мигрируют в β -глобулиновой фракции;

- пре- β -липопротеины или липопротеины очень низкой плотности (vLDL): они имеют молекулярный вес выше, а плотность ниже, чем LDL-липопротеины. Они более подвижны, чем LDL-липопротеины и мигрируют впереди β -глобулиновой фракции;

– α -липопротеины или липопротеины высокой плотности (HDL): являются самой подвижной фракцией липопротеинов. Мигрируют в зоне $\alpha 2$ -глобулинов.

Электрофоретическое исследование липопротеинов является простой, практически полезной методикой выявления патологических изменений состава липопротеинов и, соответственно, факторов риска развития коронарной болезни. Распределение липопротеинов по их подвижности в зональном электрофорезе лежит в основе классификации гиперлипидемий Фридриксона. В соответствии с типом выявленной гиперлипидемии по классификации Фридриксона принимаются определенные или терапевтические мероприятия.

Агарозные гели

Они готовы к применению. Каждый гель содержит 0,8 г/дл агарозы, буфер pH $8,5 \pm 0,1$ и другие неопасные компоненты, необходимые для оптимальной постановки – электрофореза.

Применяется в качестве поддерживающей среды для электрофоретического разделения липопротеинов.

Хранение гелей должно осуществляться в горизонтальном положении в оригинальной упаковке при комнатной ($15-30\text{ }^{\circ}\text{C}$) или температуре холодильника ($2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$). Необходимо избегать резких перепадов температуры при хранении, не располагать гели вблизи окон и источников тепла. Не замораживать.

При соблюдении норм хранения гели стабильны в течение срока, указанного на упаковке.

Возможные причины порчи гелей при несоблюдении норм хранения:

- кристаллизация или преципитация на поверхности геля или в гелевой текстуре с размягчением геля в связи с замораживанием;
- бактериальное или плесневое загрязнение;
- высокое содержание жидкости в упаковке, как результат эксудации из геля при неправильном хранении.

Трис-барбиталовый буфер

Каждый флакон концентрированного буферного раствора разводится до 1л дистиллированной водой.

После проведения рабочий раствор содержит трис-барбиталовый буфер при pH $8,5 \pm 0,3$ азид натрия и другие неопасные компоненты, необходимые для оптимальной электрофоретической разгонки.

Внимание! Каждый флакон концентрированного буфера содержит 0,92 % барбитала, 5,15 % барбитала натрия и 0,10 % азда натрия. Не брать в рот. Очень токсичен при проглатывании. При попадании в рот обратиться к врачу немедленно.

Не допускать контакта раствора со свинцом и медью, ввиду возможного образования с азидом натрия взрывчатых и токсичных веществ.

При пролитии раствора необходимо промыть поверхности большим количеством воды.

При попадании на кожу немедленно многократно промыть водой.

Используется в качестве буфера при электрофорезе.

Концентрированный буфер хранится при комнатной температуре или в холодильнике. Раствор стабилен в течение нескольких лет, и, по крайней мере, однозначно в соответствии с датой годности набора, указанной на упаковке.

Приготовленный раствор буфера стабилен в течение года при хранении при комнатной температуре в закрытой емкости.

При обнаружении микробного роста в приготовленном буфере, он расценивается как непригодный для применения.

Краситель «Судан черный»

Готовится рабочий раствор не более чем за 30 мин. перед использованием. при этом добавляются выверенные объемы компонентов в указанной последовательности при тщательном перемешивании:

1 вариант – чистый этанол (69 %), 80 мл, концентрат красителя (6,6г/дл в диметилформамиде), 1 мл. Подождите пока краситель полностью растворится, после чего необходимо добавить 70 мл дистиллированной или деионизированной воды.

2 вариант – чистый изопропанол (100 %) 57 мл, концентрат красителя, 1 мл. По окончании полного растворения красителя добавляется 93 мл дистиллированной или деионизированной воды.

В обоих вариантах, по завершению смешивания смесь тщательно перемешивается на протяжении минимум 30 мин.

Приготовленные растворы помещаются вдали от источников тепла.

Раствор используется только однократно, после использования уничтожается.

Использование других или денатурированных спиртов ведет к атипичным результатам. При использовании меньших концентраций спиртов необходимая концентрация спирта в итоговом рабочем растворе устанавливается путем вариации объема добавляемой воды.

Внимание! Концентрированный раствор «Судан черный» содержит диметилформамид. Токсичен при высыхании. В случае недостаточной вентиляции помещений, необходимо использовать соответствующие защитные средства. Не брать в рот. При попадании в рот, обратиться

к врачу немедленно. При попадании в глаза или на кожу, немедленно многократно промыть водой и проконсультироваться у врача.

Применяется для окраски гелей после электрофоретического разделения липопротеинов.

Концентрат красителя хранится при комнатной температуре или в условиях холодильника, в соответствии с указанными сроками годности. Приготовленный рабочий раствор красителя максимум пригоден к использованию в течение 12-ти часов при комнатной температуре при хранении в тщательно закрытом контейнере во избежание испарения.

Промывающий раствор

Флакон концентрата промывающего раствора разводится до 5 литров дистиллированной или деионизированной водой. Удобно также брать для разведения 16 мл концентрата и доводить до 1 л. После разведения рабочий раствор содержит щелочной буфер pH $8,8 \pm 0,3$, азид натрия.

Ввиду наличия в составе промывающего раствора азидата натрия необходимо применять те же меры предосторожности, что и в случае Трис-барбиталового буфера.

Используется для промывки гелей после фиксации.

Хранится концентрат промывающего раствора и приготовленный рабочий раствор при комнатной температуре или в условиях холодильника в закрытых контейнерах. Стабильны в соответствии со сроком, указанным на упаковках.

В случае прорастания микроорганизмов раствор становится мутным и подлежит уничтожению.

Аппликаторы

Используются для нанесения проб на гель. Хранятся в сухом месте при комнатной температуре или в холодильнике.

Тонкая фильтровальная бумага

Разового использования. Используется для удаления избытка влаги с поверхности геля перед нанесением проб.

Хранится в сухом месте при комнатной температуре или в условиях холодильника.

Дополнительные необходимые реагенты

1. Фиксирующий реагент

Готовится за 15 мин. до использования в объеме 150 мл, разведением до 45 % чистого эталона (96 %), 55 % дистиллированной или деионизированной воды или – до 33 % чистого изопропанола (100 %) 70 % дистиллированной или деионизированной воды.

Используется для удаления избытка красителя и его закрепления на окрашенных участках.

Фиксирующий раствор хранится при комнатной температуре тщательно закупоренным во избежание испарения. Стабилен в течение месяца. При микробной контаминации мутнеет и подлежит уничтожению.

Оборудование, необходимое для проведения исследования

1. Источник питания.
2. Камера увлажнения.
3. Электрофоретическая камера.
4. Держатели гелей.
5. Пипетки 10, 200 и 1000 мкл.
6. Инкубатор-сушилка.
7. Денситометр для сканирования гелей 62×51 мм при 570 нм.

Пробы для исследования

Оптимальным вариантом исследуемых проб являются свежеприготовленные пробы сыворотки крови – не более 12 ч от момента приготовления, хранящиеся в холодильнике.

В случае крайней необходимости допускается хранение проб сыворотки не более 3-х сут. при комнатной температуре и не более 10 сут. в условиях холодильника. Пробы не подлежат замораживанию. Не рекомендуется исследовать пробы плазмы крови, взятой на гепарине.

Наиболее чувствительна к процедуре хранения пре-бэта (vLDL) фракция. Хранение вызывает медленное снижение подвижности пре-бэта-липопротеинов, и, соответственно, кажущееся увеличение этой фракции. Этот феномен преимущественно имеет место у пациентов с низким уровнем vLDL (<10 %).

Порядок выполнения работы

1. Стадия миграции
 - 1.1. Поместить гелевую пластинку (гелевой стороной вверх) в рамку аппликатора, предварительно быстро промакнув фильтровальной бумагой.
 - 1.2. Внести по 10 мкл в лунки аппликатора. Выждать 2 мин.
 - 1.3. Привести аппликатор в контакт с гелевой поверхностью.
 - 1.4. Через 7 мин. и 30 с. поднять и удалить аппликатор.
 - 1.5. Поместить гель в электрофоретическую камеру в соответствии с полярностью, указанной на геле.
 - 1.6. Подсоединить камеру к источнику питания
- Рекомендуемые условия проведения электрофореза:

Общий объем буфера – 300 мл;
Время миграции – 45 мин.;
Постоянное напряжение – 60 В;
Начальный ток через гель – 11+2 мА

1.7. По завершении электрофореза достать гелевую пластинку.

1.8. Сушить гель при 60 °С в течение 1 ч.

2. Окраска и фиксация

2.1. Поместить гелевую пластинку в держатель и поместить в краситель на 15 мин.

2.2. Вынуть гель из раствора красителя и поместить в фиксирующий раствор на 5 мин.

3. Промывка и сушка

3.1. Поместить гель в промывающий раствор на 1 мин.

3.2. Быстро промыть гель дистиллированной или деионизированной водой.

3.3. Держать вертикально и сушить при 80 °С. При необходимости – протереть тыльную сторону (пластиковую подложку) хлопчатобумажной тканью, смоченной в 70 % спирте.

4. Денситометрия – осуществляется при 570 нм (желтый фильтр). Параллельно исследуемым пробам рекомендуется осуществлять разгонку контрольного материала.

Область ожидаемых нормальных значений

Она установлена компанией на совокупности здоровых лиц, мужчин и женщин, n = 97.

Бэта-липопротеины 42,3–69,5 %

Пре-бэта-липопротеины 2,0–31,2 %

Альфа-липопротеины 15,1–39,9 %

ОФОРМЛЕНИЕ РАБОТЫ

1. Кратко записать теоретические данные.

2. Описать ход работы.

3. Сделать выводы по работе.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 9.

КЛИНИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Цель: идентификация моноклональных белков методом иммунофиксации.

Оборудование и материалы: денситометр, аппликаторы на 7 проб – 10 шт., фильтровальная бумага – 10 шт.

Реактивы: диагностический набор для идентификации моноклональных белков методом иммунофиксации, раствор NaCl 0,9 % (0,15 ммоль/л).

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Принцип иммуноэлектрофореза: вначале проводят электрофоретическое разделение белков в забуференном агаровом геле. Затем в канавку, которая идет в направлении миграции белков, вносят преципитирующую иммунную сыворотку. Антиген и антисыворотка диффундируют в геле навстречу друг другу и в месте их взаимодействия возникают дуги (линии) преципитации. Число, положение и форма этих линий дает представление о составе исходной смеси антигенов.

Иммуноэлектрофорез – метод качественного анализа. С его помощью анализируют белки сыворотки крови, цереброспинальную жидкость, белки растительного и бактериального происхождения. Чаще всего в клинической практике используют при диагностике иммунодефицитов. Используется как метод последовательного контроля за процессом очистки белковых препаратов.

В настоящее время развит целый ряд модификаций метода как качественной, так и количественной аналитической направленности.

Ракетный иммуноэлектрофорез

Предложен Лореллом, К. Б. в 1966 г. Используют для количественного определения белка в жидкости организма.

Агарозу смешивают с моноспецифической антисывороткой и равномерным слоем распределяют по всей поверхности стекла. В полученном геле вырезают лунки и заполняют их исследуемым антигеном. При подаче напряжения молекулы антигена мигрируют в гель и взаимодействуют с антителами. По мере продвижения антигена его молекулы постепенно связываются антителами, образуя вытянутый в длину остроконечный преципитат. В стандартных условиях длина такого преципитата прямо пропорциональна концентрации антигена.

Перекрестный иммуноэлектрофорез

Выполняется в 2 этапа: 1) осуществляется разделение белков в геле агарозы; 2) незадействованный разгонкой гель заменяется на гель, содержащий антисыворотку и повторно производится электрофорез в перпендикулярном направлении. Антитела при этом образуют с исследуемыми белками преципитаты в форме пиков. Высота или площадь этих пиков прямо пропорциональна концентрации соответствующего антигена в исследуемой смеси. Площадь пиков зависит и от концентрации антител в геле.

Используется для количественного и качественного анализа состава антигенов.

Слитный ракетный иммуноэлектрофорез

Модификация ракетного варианта. Используется для обнаружения гетерогенности фракций, кажущихся гомогенными, собранных с колонки после гель-фильтрации или ионообменной хроматографии.

Линейный иммуноэлектрофорез

Также модификация ракетного варианта. Как и перекрестный иммуноэлектрофорез предназначен для качественного и количественного анализа состава антигена. Используется также для сравнительного анализа состава антисывороток.

Ракетный линейный иммуноэлектрофорез

Объединяет принципы линейного и ракетного иммуноэлектрофореза. Позволяет идентифицировать разнообразие антигенов в большом числе образцов, а также – определять концентрацию каждого антигена.

Перекрестный линейный электрофорез

Объединяет принципы перекрестного и линейного электрофореза. Используется для анализа качественного и количественного антигенного состава неизвестных образцов.

Тандемный перекрестный иммуноэлектрофорез

Используют по тому же назначению, что и предыдущий вариант иммуноэлектрофореза, а также для сравнительного анализа образцов. В литературе можно встретить также вариант с названием «метод иммуноэлектрофореза с введением промежуточного геля». Изначально был разработан для характеристики преципитатов сыворотки человека против *Candida albicans*. Затем было установлено, что метод является высокочувствительным и пригоден для характеристик сложных сывороток, дающих слабые преципитаты.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. В чем сущность феномена преципитации?
2. Какова техника постановки кольцевой РП (реакции преципитации) и РДП (реакции диффузионной преципитации)?
3. Для каких целей применяют метод иммуноэлектрофореза?

ЛИТЕРАТУРА

1. Назаренко Г. И., Кишкун А. А. Лабораторные методы диагностики неотложных состояний / Г. И. Назаренко, А. А. Кишкун. – М.: Медицина, 2002.
2. Лившиц В. М., Сидельникова В. И. Медицинские лабораторные анализы / В. М. Лившиц, В. И. Сидельникова. – М.: ТРИАДА-Х, 2000.
3. Медицинская лабораторная диагностика: программы и алгоритмы / под ред. А. И. Карпищенко. – СПб.: Интермедика, 1997.
4. Клиническая биохимия / под ред. В. А. Ткачука. – М.: Геотар-Мед, 2004.
5. Медицинские лабораторные технологии / под ред. А. И. Карпищенко. – СПб.: Интермедика, 1990.
6. Камышников В. С. Клинико-биохимическая лабораторная диагностика: справочник / В. С. Камышников. – в 2-х т. – Минск: Интерпрессервис, 2003.

ХОД РАБОТЫ

Задание. Провести электрофорез и иммунофиксацию моноклональных белков (иммуноглобулинов, легких цепей каппа или ламбда).

Принцип метода

Набор предназначен для идентификации моноклональных белков (как иммуноглобулинов, так и легких цепей каппа и ламбда) и должен применяться после выявления в электрофорезе сывороточных белков увеличения фракции гамма- или бета-глобулинов. Иммунофиксация, которая успешно заменяет применяемый прежде метод иммуноэлектрофореза, состоит из 4-х этапов:

- электрофорез белков сыворотки крови на агарозном геле;
- иммунопреципитация разделенных белков специфическими антителами;
- вымывание всех белков, которые не подверглись преципитации;
- окрашивание иммунопреципитатов.

На одной пластинке агарозового геля можно провести идентификацию моноклонального белка одной сыворотки.

Порядок выполнения работы

1. Влить по 150 мл разбавленного буфера в каждую часть камеры.
2. Осторожно вынуть гель из упаковки, не дотрагиваясь его поверхности, и положить на бумагу.

Во избежание пересушки геля и связанных с этим аналитических проблем рекомендуется вскрыть фольговую упаковку непосредственно перед употреблением, когда аппаратура уже подготовлена к работе, а сыворотки соответствующим образом разбавлены.

3. Осушить место нанесения проб путем быстрого приложения бумажной полоски. Влажную бумагу тут же осторожно удалить.

4. На осушенном месте расположить фольгу для нанесения проб, легко прижимая ее к основанию и выглаживая пальцем. Фольга должна плотно прилегать к гелю!

5. Отпипетировать 5 мкл разбавленной сыворотки в каждый вырез фольги и оставить на 5 мин., считая с момента нанесения последней пробы.

6. Удалить избыток сыворотки полоской бумаги.

7. Осторожно снять фольгу и бумагу.

8. Согнуть пластинку с агарозой и поместить ее в камеру с гелем вдоль, чтобы места нанесения сывороток находились со стороны катода (-).

9. Закрыть камеру крышкой.

10. Проводить электрофорез 30 мин. при напряжении 80 В.

После окончания электрофореза вынуть пластинку. Голубая отметка должна находиться около 2–5 мм. от окончания рамки обозначенной на пластинке со стороны анода. Положить пластинку на бумагу гелем вверх, затем удалить избыток буфера, приложив тонкую бумагу ко всей поверхности пластинки. Влажную бумагу удалить. На гель положить матрицу из фольги, так чтобы она плотно прилегала к основанию, и поместить пластинку в сосуд для инкубации. Затем на контрольный участок нанести 35 мкл фиксажа. На остальные – только соответствующие антисыворотки, в таком же количестве – 35 мкл. Инкубировать пластинку в закрытом сосуде в течение 5 мин. при комнатной температуре. После инкубации вынуть пластинку из сосуда и осушить ее, приложив тонкую бумагу ко всей поверхности пластинки. Затем удалить фольговую матрицу и вымыть все белки, которые не подверглись преципитации, по следующей процедуре:

1. Погрузить пластинку в вертикальном положении в 0,9 % раствор NaCl на не менее 10 мин.

2. Вынуть пластинку и приложить к ее поверхности одну тонкую бумагу, пропитанную 0,9 % NaCl. Поверх положить две толстые бумаги и нагрузить грузом 1–2 кг на 20 мин.

3. Снять груз и бумагу. Погрузить пластинку в вертикальном положении в раствор NaCl на не менее 5 мин.

4. Вынуть пластинку и приложить к ее поверхности одну тонкую бумагу, пропитанную 0,9 % NaCl. Поверх положить две толстые бумаги и нагрузить грузом 1–2 кг на 20 мин.

5. Сушить пластинку в струе жаркого воздуха до полного осушения.

Расшифровка результатов

Расшифровка результатов заключается в визуальной оценке присутствия полосок, расположение которых соответствует расположению моноклонального белка при контрольном разделении белков сыворотки крови. Обычно одному моноклональному белку соответствует один тип тяжелой цепи и один тип легкой. Может случиться, что одному белку будет соответствовать только легкая цепь (заболевание легких цепей) или только тяжелая цепь (заболевание тяжелых цепей).

ОФОРМЛЕНИЕ РАБОТЫ

1. Кратко записать теоретические данные.
2. Описать ход работы.
3. Сделать выводы по работе.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 10.

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ

Цель: определение содержания ПСА и РЭА иммуноферментным методом в сыворотке крови.

Оборудование и материалы: иммуноферментный анализатор «Cobas e 411»; термостат, поддерживающий температуру 37 ± 1 °С; встряхиватель для планшетов; вихревой смеситель; магнитная мешалка; пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющими отбирать объемы жидкостей 100–500 и 1000 мкл; пипетки полуавтоматическиен многоканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей 50–200 мкл; пробирки пластмассовые с пробками вместимостью 3–5 мл; стакан стеклянный вместимостью 500 мл, 1 шт.; химически чистый флакон из темного стекла вместимостью 20 мл с завинчивающейся крышкой; флаконы вместимостью 10 мл; перчатки резиновые или пластиковые; вода дистиллированная; бумага фильтровальная.

Реактивы: набор реагентов для иммуноферментного определения общего специфического антигена предстательной железы (ИФА-ПСА) и раково-эмбрионального антигена (ИФА-РЭА) в сыворотке крови.

Состав набора ИФА-ПСА:

- конъюгат – моноклональные антитела к ПСА, меченые пероксидазой хрена, жидкий препарат, 1 флакон, 22 мл;

- иммуносорбент – 96-луночный планшет (12 стрипов по 8 лунок) с иммобилизованными моноклональными антителами к ПСА, готов к использованию, 1 шт.;

- шесть калибровочных проб ПСА на основе буферной системы, соответствующих следующим концентрациям ПСА: 0 нг/мл (С 0), 1 нг/мл (С 1), 3 нг/мл (С 2), 10 нг/мл (С 3), 30 нг/мл (С 4), 100 нг/мл (С 5) (точные значения концентраций ПСА указываются на этикетках флаконов), жидкие препараты, готовые к использованию, калибровочные пробы С 0–С 5 – 6 флаконов по 0,5 мл. Калибровочные пробы ПСА откалиброваны относительно международного стандарта ВОЗ общего ПСА (код 96/670), включающего 90 % связанного с 1-антихимотрипсином ПСА и 10 % свободного ПСА;

- КС – контрольная сыворотка, содержащая известное количество ПСА, лиофилизированный препарат, 1 флакон;

- буферный раствор, 1 флакон, 22 мл;

- субстратный буферный раствор (СБР), 1 флакон, 20 мл;

- раствор-ТМБ, 1,2 мл, 1 флакон;
- концентрат раствора для промывания планшета (КРП), 1 флакон, 20 мл;
- стоп-реагент – раствор для остановки ферментативной реакции, готов к использованию, 1 флакон, 11 мл.

Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 неизвестной пробы, 6 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки, всего 96 определений.

Продолжительность анализа 3,5 ч. Диапазон определяемых концентраций ПСА (0–100) нг/мл.

Набор ИФА-ПСА обеспечивает эквимоллярное определение свободной и связанной форм ПСА.

Состав набора ИФА-РЭА:

- конъюгат антител к РЭА с пероксидазой: 2 флакона по 0,6 мл (концентрированный препарат). Концентрированный раствор должен быть разведен перед использованием розовым буфером для разбавления конъюгата;
- буфер для разбавления конъюгата (розовая жидкость): 4 флакона по 12 мл (готов к использованию);
- аналитический буферный раствор (голубая жидкость): 4 флакона по 12 мл (готов к использованию) Препарат содержит азид натрия (<0,1 %; см. п. Меры предосторожности);
- калибровочные пробы: 5 флаконов по 0,5 мл и 1 флакон с 6 мл «нулевой» калибровочной пробы (готовы к использованию). Калибровочные пробы содержат РЭА в диапазоне концентраций от 0 до 400 нг/мл в буфере с азидом натрия (<0,1 %);
- контрольная сыворотка: 2 флакона (лиофилизированные препараты). Флаконы содержат лиофилизированную сыворотку крови человека с известным содержанием РЭА.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Маркеры злокачественного роста

К маркерам злокачественного роста относятся вещества разной природы: антигены, гормоны, ферменты, гликопротеины, липиды, белки, метаболиты. Синтез маркеров обусловлен особенностями метаболизма раковой клетки, которые обеспечивают ее автономность, агрессивность роста, способность к метастазированию. Анормальная экспрессия генома – один из основных механизмов продукции маркеров опухолевыми клетками, который обуславливает синтез эмбриональных, плацентарных и эктопических ферментов, антигенов и гормонов. Известен широкий спектр маркеров при различных

локализациях рака, однако лишь единичные могут в какой-то мере соответствовать понятию «идеальный маркер».

Диагностическая значимость опухолевого маркера зависит от его чувствительности и специфичности. Пока не существует опухолевых маркеров, отвечающих определению идеальных, т. е. маркеров с почти 100 % специфичностью (не обнаруживаемых при доброкачественных заболеваниях и у здоровых людей) и 100 % чувствительностью (обязательно выявляемых даже на ранних стадиях развития опухоли). При исследовании онкомаркеров большое значение имеет такое понятие, как Cut-off (отсекающий уровень). Cut-off представляет собой допускаемую верхнюю границу концентрации опухолевого маркера у здоровых людей и у пациентов с доброкачественными опухолями. Cut-off не имеет фиксированного значения и может изменяться в соответствии с назначением теста. Если ставится задача выявить как можно больше пациентов с опухолями, Cut-off должен быть установлен на низком уровне для увеличения чувствительности, ценой неизбежного увеличения процента ложноположительных результатов (уменьшения специфичности). Если необходимо увеличить вероятность соответствия положительного результата теста наличию опухоли, Cut-off следует установить на высоком уровне для увеличения специфичности за счет увеличения процента ложноотрицательных результатов (уменьшения чувствительности).

Для большинства онкомаркеров установлены унифицированные значения Cut-off, которых придерживаются наиболее авторитетные исследователи и производители соответствующих реагентов.

Раково-эмбриональный антиген (РЭА) в сыворотке

Содержание РЭА в сыворотке в норме составляет 0–5 нг/мл; у страдающих алкоголизмом – 7–10 нг/мл; у курящих – 5–10 нг/мл.

РЭА – гликопротеин, формируемый при эмбриональном развитии в желудочно-кишечном тракте. На уровень РЭА влияют курение и в меньшей степени прием алкоголя. Небольшое повышение уровня РЭА наблюдается у 20–50 % больных с доброкачественными заболеваниями кишечника, поджелудочной железы, печени и легких. Основное применение РЭА – мониторинг развития заболевания и эффективности терапии у больных с колоректальной карциномой.

Чувствительность теста составляет при:

- колоректальном раке – 50 % при концентрации более 7,0 нг/мл;
- раке печени – 33 % при концентрации более 7,0 нг/мл;
- раке молочной железы – 28 % при концентрации более 4,2 нг/мл;

- раке желудка – 27 % при концентрации более 7,0 нг/мл;
- раке легких – 22 % при концентрации более 7,4 нг/мл.

Уровень РЭА в сыворотке крови больных раком толстой кишки коррелирует со стадией заболевания и служит показателем эффективности оперативного вмешательства, химио- и лучевой терапии. РЭА может использоваться в качестве раннего индикатора рецидивов и метастазов. При нелеченных злокачественных опухолях уровень РЭА постоянно увеличивается, причем в начальной стадии его рост имеет выраженный характер.

Повышенный уровень РЭА может сопровождать рак поджелудочной железы. Чувствительность и специфичность РЭА для диагностики рака поджелудочной железы составляют соответственно 63,3 и 81,7 %. Однако содержание РЭА увеличивается у части больных при панкреатите, что снижает ценность использования этого маркера при раке поджелудочной железы.

Повышенный уровень РЭА выявляется у 30–50 % больных раком молочной железы, у 33–36 % больных раком легкого. Уровень РЭА может повыситься при хронических заболеваниях легких, аутоиммунных заболеваниях, но после выздоровления этот уровень нормализуется.

Содержание РЭА в сыворотке:

- мониторинг течения и лечения рака прямой кишки (повышение концентрации до 20 нг/мл – диагностический признак злокачественных опухолей различной локализации);
- мониторинг опухолей желудочно-кишечного тракта, опухолей легких, опухолей молочной железы;
- ранняя диагностика рецидивов и метастазов рака;
- мониторинг в группах риска (цирроз, гепатит, панкреатит).

Простатический специфический антиген (ПСА) в сыворотке

Содержание ПСА в сыворотке в норме: у мужчин до 40 лет – до 2,5 нг/мл, после 40 лет – до 4,0 нг/мл.

ПСА – гликопротеид, выделяемый клетками эпителия канальцев предстательной железы. В связи с тем, что ПСА образуется в парауретральных железах, только очень малые количества его могут обнаруживаться у женщин. Период полужизни ПСА составляет 2–3 дня.

Значительное повышение уровня ПСА в сыворотке иногда обнаруживается при гипертрофии предстательной железы, а также при воспалительных ее заболеваниях. При уровне Cut-off 10 нг/мл специфичность по отношению к доброкачественным заболеваниям предстательной железы составляет 90 %. Пальцевое ректальное

исследование, цистоскопия, колоноскопия, трансуретральная биопсия, лазерная терапия, задержка мочи также могут вызвать более или менее выраженный и длительный подъем уровня ПСА. Влияние этих процедур на уровень ПСА максимально выражено на следующий день после их проведения, причем наиболее значительно – у больных с гипертрофией железы. Исследование ПСА в таких случаях рекомендуется проводить не ранее чем через 7 дней после проведения перечисленных процедур.

Исследование ПСА применяют для диагностики и мониторинга лечения рака предстательной железы, при котором его концентрация увеличивается, а также для мониторинга состояния пациентов с гипертрофией железы в целях как можно более раннего обнаружения рака этого органа. Уровень ПСА выше 4,0 нг/мл обнаруживается примерно у 80–90 % больных раком и у 20 % больных аденомой предстательной железы. Таким образом, повышение уровня ПСА в крови не всегда свидетельствует о наличии злокачественного процесса. В нашей стране у 50 % больных доброкачественная гиперплазия предстательной железы сопровождается хроническим простатитом. Увеличение уровня ПСА в крови у больных раком этого органа происходит быстрее, чем у больных с доброкачественной гиперплазией. Уровень общего ПСА более 50 нг/мл указывает на экстракапсулярную инвазию в 80 % случаев и поражение региональных лимфатических узлов у 66 % больных раком предстательной железы. Имеется корреляция между уровнем ПСА в крови и степенью злокачественности опухоли. В настоящее время считается, что увеличение ПСА до 15 нг/мл и выше вместе с низко-дифференцированным типом опухоли в 50 % случаев указывает на экстракапсулярную инвазию и должно приниматься во внимание при определении объема оперативного вмешательства. При значениях ПСА от 4 до 15 нг/мл частота выявления рака составляет 27–33 %. Значения ПСА выше 4 нг/мл отмечаются у 63 % больных раком предстательной железы стадии T1 и у 71 % больных – стадии T2.

Мониторинг концентрации ПСА обеспечивает более раннее обнаружение рецидива и метастазирования, чем прочие методы. При этом изменения даже в пределах границ нормы являются информативными. После тотальной простатэктомии ПСА не должен выявляться, его обнаружение свидетельствует об остаточной опухолевой ткани, региональных или отдаленных метастазах. Следует учитывать, что уровень остаточной концентрации лежит в пределах от 0,05 до 0,1 нг/мл, любое превышение этого уровня указывает на рецидив. Уровень ПСА определяют не ранее чем через 60–90 дней после операции в связи с возможными ложноположительными

результатами из-за незавершенного клиренса ПСА, присутствовавшего в крови до простатэктомии.

При эффективной лучевой терапии уровень ПСА должен снижаться в течение первого месяца в среднем на 50 %. Его уровень снижается и при проведении эффективной гормональной терапии. Контроль за уровнем ПСА у больных с леченым раком предстательной железы следует проводить каждые 3 мес., что позволяет своевременно выявить отсутствие эффекта от проводимой терапии.

Определение уровня ПСА в сыворотке применяют для диагностики и мониторинга лечения рака предстательной железы, а также в качестве диспансерного теста у всех мужчин старше 50 лет.

Свободный простатический специфический антиген (сПСА) в сыворотке

Содержание сПСА в сыворотке в норме составляет более 15 % от общего ПСА.

Клиническая ценность определения ПСА в крови значительно возрастает при определении различных его форм, соотношение которых соответствует виду патологического процесса, протекающего в предстательной железе. В сыворотке крови ПСА содержится в двух формах: свободной и связанной с различными антипротеазами. Большая часть ПСА находится в комплексе с α -1-антихимотрипсином. Незначительная часть ПСА связана с α -2-макроглобулином и не определяется обычными ИФА методами. Уровень свободного ПСА меняется в зависимости, как от индивидуальных особенностей организма, так и от вида заболевания предстательной железы. При раке железы в клетках опухоли не только повышается продукция ПСА, но и значительно возрастает синтез α -1-антихимотрипсина, в результате чего увеличивается количество связанной и снижается содержание свободной фракции ПСА при увеличении общей концентрации этого антигена. В результате содержание свободной фракции ПСА в сыворотке крови при раке предстательной железы значительно ниже, чем в норме и при доброкачественном процессе. На этом основана дифференциальная диагностика рака и гиперплазии этого органа.

Сущность исследования заключается в параллельном определении общего ПСА и свободной фракции ПСА и расчете процента их соотношения:

Определение свободной фракции ПСА показано при увеличении общего ПСА. При значениях этого соотношения ниже 15 % требуется проведение УЗИ и биопсии. Если этот показатель выше 15 %, необходимы наблюдение и повторное обследование через 6 мес.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Что относится к онкомаркерам?
2. Диагностическая значимость опухолевых маркеров.
3. Понятие «Cut-off».
4. Диагностическое значение РЭА.
5. Диагностическое значение ПСА.

ЛИТЕРАТУРА

1. Назаренко Г. И., Кишкун А. А. Лабораторные методы диагностики неотложных состояний / Г. И. Назаренко, А. А. Кишкун. – М.: Медицина, 2002.
2. Лившиц В. М., Сидельникова В. И. Медицинские лабораторные анализы / В. М. Лившиц, В. И. Сидельникова. – М.: ТРИАДА-Х, 2000.
3. Медицинская лабораторная диагностика: программы и алгоритмы / под ред. А. И. Карпищенко. – СПб.: Интермедика, 1997.
4. Клиническая биохимия / под ред. В. А. Ткачука. – М.: Геотар-Мед, 2004.
5. Медицинские лабораторные технологии / под ред. А. И. Карпищенко. – СПб.: Интермедика, 1990.
6. Камышников В. С. Клинико-биохимическая лабораторная диагностика: справочник / В. С. Камышников. – в 2-х т. – Минск: Интерпрессервис, 2003.

ХОД РАБОТЫ

Задание I. Определение ПСА иммуноферментным методом в сыворотке крови.

Принцип метода

Принцип работы набора состоит в следующем: на внутренней поверхности лунок при добавлении исследуемого образца сыворотки крови и буферного раствора во время первой инкубации происходит связывание эндогенного ПСА сыворотки крови с иммобилизованными моноклональными антителами к ПСА. При удалении содержимого из лунок происходит разделение свободного и связанного антителами ПСА. Во время второй инкубации конъюгат связывается с ПСА, иммобилизованным в ходе первой инкубации. При удалении содержимого из лунок происходит удаление избытка конъюгата. Во время инкубации с хромоген-субстратным раствором происходит окрашивание раствора в лунках. Пероксидазную реакцию останавливают путем добавления стоп-реагента, содержащего 0,5 М серную кислоту. Интенсивность окрашивания раствора в лунках измеряют на

спектрофотометре как величину оптической плотности (ОП) при длине волны 450 нм. Величина ОП прямо пропорциональна количеству ПСА в образце сыворотки крови. На основании калибровочной кривой рассчитывается концентрация ПСА в определяемых образцах.

Порядок выполнения работы

1. Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы сыворотки крови необходимо выдержать при температуре 18–25 °С в течение 1 ч. Во флакон с КС внести 0,5 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать, избегая образования пены.

2. Подготовка промывочного раствора: в стакан вместимостью 500 мл внести 400 мл дистиллированной воды, добавить содержимое флакона (20 мл) с КРП и тщательно перемешать на магнитной мешалке. В случае использования неполного набора стрипов, смешать 1 объем КРП с 19 объемами дистиллированной воды.

При выпадении осадка солей в концентрате раствора для промывания планшета его необходимо прогреть при температуре 30–40 °С до полного растворения осадка.

Промывочный раствор, подготовленный к использованию, может храниться в течение 4 недель при температуре 2–8 °С.

3. Подготовка хромоген-субстратного раствора: в химически чистый флакон из темного стекла вместимостью 20 мл внести содержимое флакона с субстратным буферным раствором 16 мл и содержимое флакона с раствором ТМБ 0,8 мл, тщательно перемешать. В случае использования неполного набора стрипов, расчет объема осуществлять из следующего соотношения: на 2 мл субстратного буферного раствора добавить 0,1 мл раствора ТМБ.

Хромоген-субстратный раствор хранению не подлежит.

Посуду и наконечники пипеток, контактирующие с раствором ТМБ, нельзя мыть синтетическими моющими средствами, так как даже их следы ведут к неконтролируемому разложению ТМБ в ходе реакции.

4. Определить количество лунок, необходимых для проведения контроля. Поместить стрипы в рамку. Неиспользованные стрипы хранить в тщательно закрытом пластиковом пакете.

5. Составить протокол маркировки лунок.

Лунки в дубликатах промаркировать следующим образом:

С0–С5 – калибровочные пробы; СК – контрольная сыворотка; СХ – исследуемые пробы сыворотки крови.

6. Проведение анализа

6.1. Схема анализа приведена в табл. 10.1.

Последовательность проведения операций анализа не нарушать!

Таблица 10.1

Схема проведения анализа

Этапы проведения анализа	Проведение анализа
1. Внесение реагентов	Во все лунки внести по 0,05 мл (50 мкл) калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых проб. Внести во все лунки по 0,15 мл (150 мкл) буферного раствора
2. Инкубация 1, промывка	Закрыть планшет крышкой или липкой лентой, встряхнуть в течение 30 с и инкубировать при температуре 18–25 °С в течение 1 ч. Промыть все лунки 4 раз по 0,3 мл (300 мкл) промывочным раствором
3. Внесение конъюгата	Во все лунки внести по 0,2 мл (200 мкл) раствора конъюгата
4. Инкубация 2, промывка	Закрыть планшет крышкой или липкой лентой, встряхнуть в течение 30 с и инкубировать при температуре 18–25 °С в течение 1 ч. Промыть все лунки 4 раз по 0,3 мл (300 мкл) промывочным раствором
5. Завершение реакции, измерение	Внести во все лунки по 0,15 мл (150 мкл) свежеприготовленного хромоген-субстратного раствора. Инкубировать планшет в течение 20–30 мин. в темноте при температуре 18–25 °С, в зависимости от степени развития окраски. Остановить реакцию внесением во все лунки по 0,1 мл (100 мкл) стоп-реагента. Встряхнуть планшет и измерить на спектрофотометре ОП раствора во всех лунках при длине волны 450 нм

6.2. Отобрать из каждого флакона по 0,05 мл (50 мкл) и внести в соответствующие лунки:

С0–С5 – соответствующие калибровочные пробы; КС – соответствующую контрольную сыворотку; СХ – исследуемые пробы сыворотки крови.

6.3. Внести во все лунки по 0,15 мл (150 мкл) буферного раствора.

6.4. Закрыть планшет крышкой или липкой лентой, встряхнуть в течение 30 с и инкубировать при температуре 18–25 °С в течение 1 ч.

6.5. После окончания инкубации удалить жидкость из всех лунок.

Во все лунки внести по 0,3 мл промывочного раствора (п. 2). Сразу после внесения удалить промывочный раствор. Повторить стадию промывки еще три раза. Промокнуть планшет, опрокинув его на фильтровальную бумагу и слегка постучав им. После промывки в нем не должно оставаться жидкости.

Для промывки лунок можно использовать автоматические промывающие устройства.

6.6. Внести во все лунки по 0,2 мл раствора конъюгата.

6.7. Закрыть планшет крышкой или липкой лентой, встряхнуть в течение 30 с и инкубировать при температуре 18–25 °С в течение 1 ч.

6.8. После окончания инкубации удалить жидкость из всех лунок.

Во все лунки внести по 0,3 мл промывочного раствора (п. 2). Сразу после внесения удалить промывочный раствор. Повторить стадию промывки еще три раза. Промокнуть планшет, опрокинув его на фильтровальную бумагу и слегка постучав им. После промывки в нем не должно оставаться жидкости.

6.9. За 10–15 мин. до окончания инкубации приготовить хромоген-субстратный раствор (п. 3).

6.10. Сразу после промывки внести во все лунки по 0,15 мл (150 мкл) свежеприготовленного хромоген-субстратного раствора (п. 3).

Время добавления хромоген-субстратного раствора не должно превышать 2 мин.

6.11. Инкубировать планшет в течение 20–30 мин. при температуре 18–25 °С в темноте, в зависимости от степени развития окраски.

6.12. Остановить реакцию добавлением во все лунки по 0,1 мл (100 мкл) стоп-реагента.

Добавлять стоп-реагент во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и хромоген-субстратный раствор.

6.13. Встряхнуть планшет и измерить на спектрофотометре оптическую плотность (ОП) раствора во всех лунках при длине волны 450 нм.

Измерения провести не позднее 20 мин. после остановки реакции.

7. Учет результатов анализа.

7.1. Рассчитать средние арифметические значения ОП для каждой пары лунок.

7.2. Построить калибровочную кривую в линейных координатах, откладывая на оси ординат значения оптической плотности (ОП), а по оси абсцисс – значения концентраций ПСА в нг/мл в соответствующих калибровочных пробах.

7.3. Определить по калибровочной кривой концентрацию ПСА в нг/мл в контрольных и исследуемых сыворотках крови.

При использовании набора ИФА-ПСА концентрация ПСА в сыворотке крови здоровых лиц находится в диапазоне (0–4) нг/мл. Концентрации ПСА от 4 до 10 нг/мл характерны для больных с доброкачественной гиперплазией и доброкачественной опухолью простаты, концентрации ПСА выше 10 нг/мл – для больных со злокачественными опухолями простаты.

Задание II. Определение РЭА иммуноферментным методом в сыворотке крови.

Принцип метода

Иммунолюцинометрическое определение раково-эмбрионального антигена относится к анализам типа «сэндвич», в котором используется два вида мышиных моноклональных антител к различным эпитопам его молекулы. Исследуемые образцы, контрольные и калибровочные пробы инкубируют в лунках микропланшета, покрытых одним видом моноклональных антител. Затем лунки промывают и проводят вторую инкубацию с другим видом антител, меченных пероксидазой хрена (конъюгатом). Для удаления несвязанного конъюгата лунки промывают, а затем вносят в них сигнальный реагент. Интенсивность люминесцентного сигнала, катализируемого пероксидазой, определяют с помощью люцинометра LIANA, или другого подходящего прибора. Концентрацию РЭА в исследуемых образцах определяют методом интерполяции по калибровочной кривой.

Порядок выполнения работы

1. Подготовка и хранение реагентов. Довести все реагенты до комнатной температуры.

1.1. Лунки. Определить количество лунок, необходимое для проведения анализа и поместить их в рамку для стрипов. Следить, чтобы дно лунок находилось на одном уровне с основанием рамки. Если последний ряд лунок оказался неполным, необходимо завершить его чистыми прозрачными лунками. Неиспользованные лунки хранить в тщательно закрытом пластиковом пакете. Не прикасаться к верхним краям лунок.

1.2. Конъюгат. Во флакон с розовым буферным раствором внести 250 мкл концентрированного препарата конъюгата. Аккуратно перемешать, избегая образования пены. Полученного количества реагента достаточно для заполнения 4 стрипов. Перелить подготовленный раствор в специальный флакон для разведенного конъюгата, который может соединяться с диспенсером и входит в комплект поставки. Если используется другое количество лунок, то для заполнения одного стрипа (12 лунок) необходимо смешать 60 мкл концентрированного раствора конъюгата с 3 мл розового буферного раствора. Для приготовления рабочего раствора можно использовать специальный флакон для разведенного конъюгата. Подготовленный к работе раствор конъюгата можно хранить при 2–8 °С в течение 2 недель.

1.3. Сигнальный реагент. Сигнальные растворы можно хранить при 2–8 °С до окончания срока их годности. Смешать сигнальные

растворы А и В в соотношении 1:1. Для приготовления сигнального реагента нужно использовать только специальный флакон емкостью 30 мл, который может непосредственно соединяться с диспенсером. Подготовленный к работе сигнальный реагент должен быть использован в тот же день и может храниться до 10 ч при комнатной температуре без доступа света.

1.4. Контрольные сыворотки. В каждый флакон с контрольной сывороткой внести по 1 мл дистиллированной воды. Через 10 мин. аккуратно перемешать содержимое, избегая образования пены. Подготовленные к работе контрольные сыворотки можно хранить при $<-18^{\circ}\text{C}$ до окончания срока годности набора.

1.5. Промывочный раствор. Приготовить промывочный раствор разведением концентрата в 20 раз, например, смешать 25 мл концентрата и 475 мл дистиллированной воды. Этого количества достаточно для обработки одного планшета. Подготовленный к работе промывочный раствор можно хранить при $2-8^{\circ}\text{C}$ в течение 10 недель.

2. Схема проведения анализа.

1 стадия. Внесение реагентов	2 стадия. Инкубация	3 стадия. Промывка
Поместить необходимое количество лунок в рамку для стрипов и дополнить последний ряд чистыми прозрачными лунками. В лунки последовательно внести: – 50 мкл калибровочных, контрольных и анализируемых проб – 150 мкл аналитического буфера	Заклеить лунки изолирующей пленкой и инкубировать их в течение 2 часов при 37 °С и постоянном встряхивании	Промыть лунки 4 раза с использованием промывающего устройства*

4 стадия. Внесение реагентов	5 стадия. Инкубация	6 стадия. Промывка и измерение
Немедленно внести в лунки 200 мкл рабочего раствора конъюгата. Этот процесс должен занимать не более двух минут	Заклеить лунки изолирующей пленкой и инкубировать в течение 1 часа при 37 °С и постоянном встряхивании	Промыть лунки 4 раза с помощью промывающего устройства.* Немедленно внести в лунки по 250 мкл сигнального реагента. Этот процесс должен занимать не более двух минут. Измерить интенсивность излучаемого света в лунках в интервале между 5 и 15 мин. после внесения сигнального реагента

3. Учет результатов анализа.

3.1. Рассчитать средние арифметические значения ОП для каждой пары лунок.

3.2. Построить калибровочную кривую в линейных координатах, откладывая на оси ординат значения оптической плотности (ОП), а по оси абсцисс – значения концентраций РЭА в нг/мл в соответствующих калибровочных пробах

3.3. Определить по калибровочной кривой концентрацию РЭА в нг/мл в контрольных и исследуемых сыворотках крови.

ОФОРМЛЕНИЕ РАБОТЫ

1. Кратко записать теоретические данные.

2. Описать ход работы.

3. Сделать выводы по работе

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 11.

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

Цель: изучение и применение методов идентификации и количественного определения нуклеиновых кислот в биологических препаратах.

Оборудование и материалы: спектрофлуориметр; кюветы полистирольные; центрифуга К-24; весы центрифужные; пробирки центрифужные; водяная баня; плитка электрическая; колба круглодонная с обратным холодильником; ступка с пестиком; воронка стеклянная для фильтрации; пипетки стеклянные на 1 мл и 5 мл; микропипетки автоматические; пробирки химические; штативы для пробирок; цилиндры мерные на 50–250 мл; стеклянные палочки; фильтр бумажный.

Реактивы: трис-(оксиметил)-аминометан, NaOH, HCl, KCl, NaCl, этилендиаминотетрауксусная кислота (ЭДТА), K_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , CH_3COOH , этанол, глицин, диметилсульфоксид (ДМСО), трихлоруксусная кислота (ТХУ), НАДФН восстановленный, 7-этоксирезорурфин, 7-гидроксирезорурфин, 7-этоксикумарин, 7-гидроксикумарин, бенз(а)пирен (B[a]P) эфир, вода дистиллированная, гексан.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Одним из путей биотрансформации экзо- и эндогенных веществ в организме человека являются окислительные процессы. Они катализируются группой ферментов системы цитохрома P450 (I фаза биотрансформации) – (микросомальной системой метаболизма или монооксигеназной системой). Цитохром P450-зависимые монооксигеназы представляет первую линию защиты против токсических липофильных химических веществ, катализируя реакции окисления. Окислительные процессы с участием ферментов системы цитохрома P450 часто рассматриваются как процессы гидроксилирования (рис. 11.1).

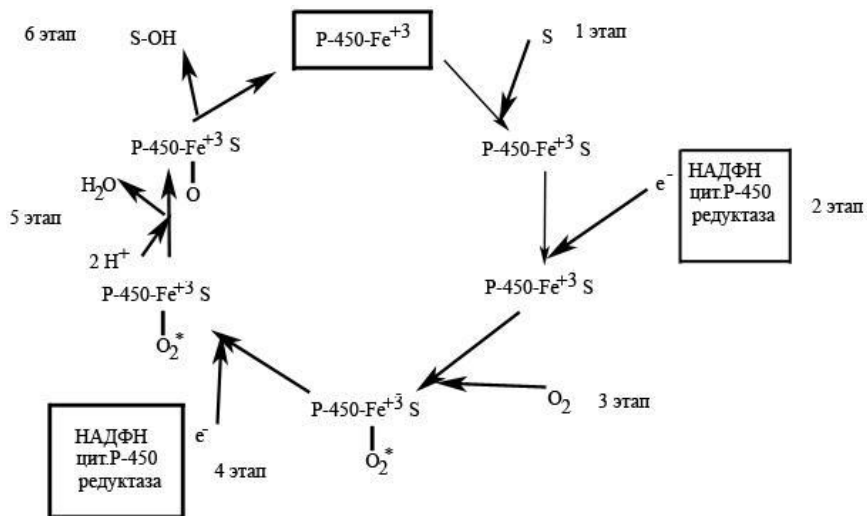


Рис. 11.1. Схема превращений субстрата-ксенобиотика (S) при участии ферментного комплекса цитохром P450-оксидоредуктаза микросом печени млекопитающих

Ключевыми компонентами монооксигеназных систем являются ферменты суперсемейства цитохромов P450. Цитохром P450 – зависимые монооксигеназы – мультиферментная электрон-транспортная система, состоящая из двух типов встроенных в мембраны эндоплазматического ретикулума белков: одной или более изоформ гемопroteина P450, ответственных за каталитическую активность, и формы флавопротеина НАДФН-P450 оксидоредуктазы, который переносит электроны на цитохром P450.

Считается, что цитохромы P450 существуют уже более чем 3,5 млрд. лет, но изоформы, ответственные за метаболизм ксенобиотиков, возникли около 400–500 млн. лет назад. Предполагают, что в процессе эволюции эти ферменты появились как механизм конверсии инертных углеводов окружающей среды до продуктов, используемых с энергетической или пластической целью.

Альтернативной точкой зрения считается, что первоначальной функцией цитохрома P450 могла быть детоксикация растительных токсинов животными организмами. В результате процессов дупликации, конверсии, мутации генов в процессе эволюционного развития образовалось множество изоформ цитохрома P450, осуществляющих окислительный, восстановительный метаболизм стероидов, жирных

кислот, ретиноидов, желчных кислот, биогенных аминов, лейкотриенов, а также экзогенных соединений, в том числе лекарств, загрязняющих агентов из окружающей среды, химических канцерогенов.

У человека в большинство реакций биотрансформации ксенобиотиков вовлечено 3 семейства: цитохром P450 1,2 и 3. Ферменты, входящие в подсемейство CYP3A, наиболее часто встречаются в организме человека и составляют 30 % всех цитохромов печени и 70 % – кишечника. Цитохром P4503A4 является самой распространенной формой цитохрома P450 в печени взрослых и метаболизирует около 60 % поступающих в организм лекарственных веществ. Показано, что низкая активность CYP3A4 является статистически существенным фактором риска развития агрессивного рака мочевого пузыря. Низкая активность CYP3A4 связана со сверхэкспрессией онкогена p53, что указывает на то, что CYP3A4 принимает участие в детоксикации некоего проканцерогенного вещества, которое вызывает мутации гена p53. В настоящее время показано, что CYP3A4, наряду с CYP1A2 принимает участие в активации и детоксикации афлатоксина B1.

Цитохром P450 1A1 – один из трех энзимов семейства CYP1 преимущественно внепеченочной локализации, который участвует в метаболизме большого числа ксенобиотиков и ряда эндогенных субстратов. В исследованиях показано, что некоторые ферменты семейства цитохрома P450 1A, метаболизирующие канцерогенные составляющие табака (ПАУ) и стероидные гормоны, связаны с повышенным риском злокачественных новообразований легких, пищевода, головы и шеи, раком молочной железы. Среди различных реакций, катализируемых CYP1A1, следует отметить гидроксилирование ароматического кольца в свободном положении, что, как полагают, может являться условием инициирования канцерогенеза путем формирования различных реакционноспособных конверсионных соединений, которые могут вызывать онкогенные мутации.

Следует отметить, что основное внимание исследователей сосредоточено на изучении гена CYP1A1 у больных раком легкого. Однако, канцерогенный эффект реактивных метаболитов, образующихся с участием цитохрома P4501A1, может проявляться и в других органах и тканях, являющихся «входными воротами» для ксенобиотиков, и в которых есть экспрессия этого цитохрома.

В настоящее время CYP1A1 обнаружен в 40 из 107 аденокарцином легкого человека, в 21 из 57 бронхоальвеолярных карцином. Кроме того, существует корреляция между экспрессией CYP1A1 и курением. Так, доказана взаимосвязь между курением и экспрессией CYP1A1

в двенадцатиперстной кишке человека, что также свидетельствует о повышенной активности CYP1A1 в организме курильщиков.

Уровень экспрессии CYP1A1 при мелкокзернистой карциноме легкого является диагностическим маркером и положительно коррелирует с интенсивностью курения заболевших.

Кроме того, реактивные метаболиты могут мигрировать из тканей, в которых они образовались, например клеток печени, где происходит основной метаболизм ксенобиотиков, и оказывать влияние на другие органы и ткани. Желудок и кишечник являются органами, подвергающимися контакту с поступающей водой и пищей. Кроме того, они являются также интенсивно перфузируемыми органами. Поэтому эпидемиологическое значение цитохрома P4501A1 для рака этих локализаций может быть весьма существенным.

Во многих тканях злокачественных новообразований также широко распространен CYP1B1. Показана повышенная экспрессия данного фермента P450 в опухолях и специфическая экспрессия в опухолевых клетках. Кроме того, показано, что уровень экспрессии CYP1B1 повышен и при метастазах.

CYP2E1 имеет критическое значение при метаболической активации многих низкомолекулярных канцерогенных веществ, включая галогенизированные и негалогенизированные алкины и алкены, N-нитрозамины, которые повсеместно распространены в окружающей среде, присутствуют в табачном дыме, и даже эндогенно образуются в желудке. Показано, что курение сигарет является главным невирусным фактором риска развития карциномы печени, и здесь важную роль играет CYP2E1.

Установлено, что высокий уровень экспрессии CYP3A4/5 наблюдается в первичных остеосаркомах с метастатическим потенциалом, показано, что этот фермент можно использовать в качестве маркер метастазов остеосарком. Фермент CYP3A4/5 ответственен за метаболизм нескольких противоопухолевых средств, включая используемые при лечении остеосарком (изофламид, винбластин, этопозид и доксорубицин), следовательно, этот фермент может также оказывать влияние на резистентность остеосарком к химиотерапии.

Установлена повышенная экспрессия как мРНК CYP27B1, так и белка при раке толстого кишечника. Следует отметить, что рак толстого кишечника является в целом резистентным к современным антираковым средствам, результатом чего является низкий уровень 5-летней выживаемости (40-50%) людей с данным заболеванием. Повышенная экспрессия как мРНК CYP27B1, так и белка при раке толстого кишечника могут стать основными мишенями при терапии данной

опухоли. Данные о проканцерогенной активности некоторых цитохромов P450 приведены в табл. 11.1.

Таблица 11.1

Проканцерогенные свойства некоторых цитохромов P450

Цитохром P450	Субстрат	Ассоциированная опухоль
1A1	ПАУ	Плоскоклеточная карцинома, рак легкого, печеночноклеточная карцинома
1B1	ПАУ	Рак молочной железы
1A2	PhIP, афлатоксин B1, пропанолаол, верапамил	Рак прямой кишки, рак молочной железы, печеночноклеточная карцинома
2D6	Нейролептики, β -блокаторы, никотин	Плоскоклеточная карцинома, рак груди, печеночноклеточная карцинома
2E1	Галогенизированные и негалогенизированные алкины и алкены, N-нитрозамины	Печеночноклеточная карцинома
3A4	Циклоспорин, лидокаин, нифедипин, эритромицин	Рак мочевого пузыря, печеночноклеточная карцинома

Таким образом, следует отметить, что существует взаимосвязь между некоторыми цитохромами P450 и восприимчивостью к определенным раковым новообразованиям. Присутствие CYP450 в опухолевых клетках может быть частью плейотропного ответа на развитие опухоли (например, ферменты цитохрома P450 могут осуществлять свою естественную функцию в опухолевых клетках или инактивируя противоопухолевые средства типа 2-метоксиэстрадиола или активизируя соединения, способствующие развитию опухоли, типа 4-гидроксиэстрадиола.

До настоящего времени не найдено ни одного эффективного биомаркера CYP450 для какой-нибудь опухоли. Это связано с тем, что образование опухоли – многоступенчатый процесс, в который вовлечено множество факторов риска, и неправомерно говорить о причинной роли CYP450 в канцерогенезе. С другой стороны, так как рассмотренные цитохромы P450 могут превращать ксенобиотики в канцерогенные продукты, поиск их эффективных ингибиторов в конечном счете может привести к развитию механизмов предотвращения и лечения новообразований

В качестве модельных объектов используют монооксигеназные ферментные системы микросом клеток печени крыс. Для повышения

в составе микросомальной фракции клеток печени крыс изоэнзимов цитохрома P450 (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1), обладающих повышенной активностью в отношении полиароматических соединений и способных превращать последние в мощные канцерогены, животным предварительно вводят 20-метилхолантрен, являющийся индуктором перечисленных выше изоэнзимов цитохрома P450.

Для более точного вычленения изоэнзимов цитохрома P450, максимально чувствительных к действию брассиностероидов используют несколько субстратов – 7-этоксикумарин, 7-этоксирезорифин и бенз(а)пирен.

Первый из них применяется для характеристики лекарственно-метаболизирующей функции печени и, в первую очередь, отражает каталитическую активность таких изоэнзимов в организме человека, как CYP3A4, CYP2E1 и CYP2D6. По отношению ко второму высокой каталитической активностью обладают все индуцируемые 20-метилхолантеном изоформы цитохрома P450. Третий служит для оценки детоксицирующей функции монооксигеназной системы с помощью, так называемого, Ahh-теста. В этом случае регистрируется скорость превращения B[a]P в его гидроксипроизводные, которые после конъюгации выводятся из клетки. Очевидно, что ингибирование этого процесса является нежелательным для нормального функционирования организма.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Фазы и ферменты биотрансформации ксенобиотиков?
2. Роль ферментов CYP450 в канцерогенезе?
4. Охарактеризуйте основные семейства изоферментов цитохрома P450.
4. Какие субстраты используются для характеристика активности изоферментов CYP450?

ЛИТЕРАТУРА

1. Назаренко Г. И., Кишкун А. А. Лабораторные методы диагностики неотложных состояний / Г. И. Назаренко, А. А. Кишкун. – М.: Медицина, 2002.
2. Лившиц В. М., Сидельникова В. И. Медицинские лабораторные анализы / В. М. Лившиц, В. И. Сидельникова. – М.: ТРИАДА-Х, 2000.
3. Медицинская лабораторная диагностика: программы и алгоритмы / под ред. А. И. Карпищенко. – СПб.: Интермедика, 1997.
4. Клиническая биохимия / под ред. В. А. Ткачука. – М.: Геотар-Мед, 2004.

5. Медицинские лабораторные технологии / под ред. А. И. Карпищенко. – СПб.: Интермедика, 1990.

6. Камышников В. С. Клинико-биохимическая лабораторная диагностика: справочник / В. С. Камышников. – в 2-х т. – Минск: Интерпрессервис, 2003.

ХОД РАБОТЫ

Задание I. Определение каталитической активности цитохрома P450 по отношению к 7-этоксикумарину.

Окислительное деалкилирование 7-этоксикумарина проводят при 37 °С в 1 мл 0,1 М трис-НСl буферном растворе (рН 7,4), содержащем микросомы печени интактных животных (концентрация цитохрома P450 составляла 150 пмоль/мл).

Реакцию начинают добавлением НАДФН и проводят в течение 10 мин. на шейкере. Начальная концентрация 7-этоксикумарина составляет 140 мкМ. Останавливают реакцию добавлением 0,5 мл 0,3 М раствора трихлоруксусной кислоты.

Концентрацию продукта (7-гидроксикумарина) определяют на спектрофлуориметре при длине волны возбуждения 375 нм и длине волны испускания 455 нм при ширине щелей 12 нм в глицин-NaOH буферном растворе (1,6 М, рН 10,3).

Определение концентрации 7-гидроксикумарина, являющегося продуктом реакции О-деэтилирования 7-этоксикумарина, осуществляют на основании калибровки, построенной по экспериментальным данным (примерный вид калибровки приведен на рис. 11.2).

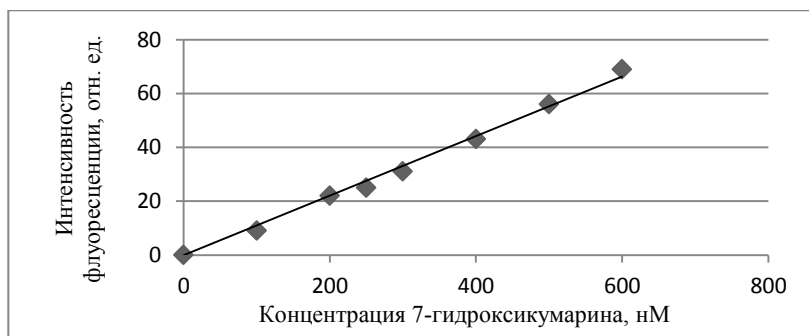


Рис. 11.2. Калибровочная зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации 7-гидроксикумарина

Задание II. Определение каталитической активности цитохрома P450 по отношению к 7-этоксирезорифину.

Окислительное деэтилирование 7-этоксирезорифина (ЭРОД) проводят при 37 °С в 1 мл 0,05 М буферном растворе (50 мМ Трис-НСl, 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, рН 7,4), содержащем микросомальную фракцию печени животных. Концентрация цитохрома P450 составляет 27,5 пмоль/мл. Начальная концентрация субстрата составляет 0,5 мкМ. Реакцию начинают добавлением НАДФН, проводят в течение 10 мин. и останавливают добавлением 1 мл ацетона, охлажденного до 4 °С. Концентрацию продукта (7-гидроксирезорифин) определяют спектрофлуориметрически при длине волны возбуждения 530 нм, длине волны испускания 590 нм и ширине щелей 2 нм на спектрофлуориметре.

Определение концентрации продукта реакции превращения 7-этоксирезорифина в 7-гидроксирезорифин осуществляют на базе калибровки, построенной по экспериментальным данным (примерный вид калибровки приведен на рис. 11.3).

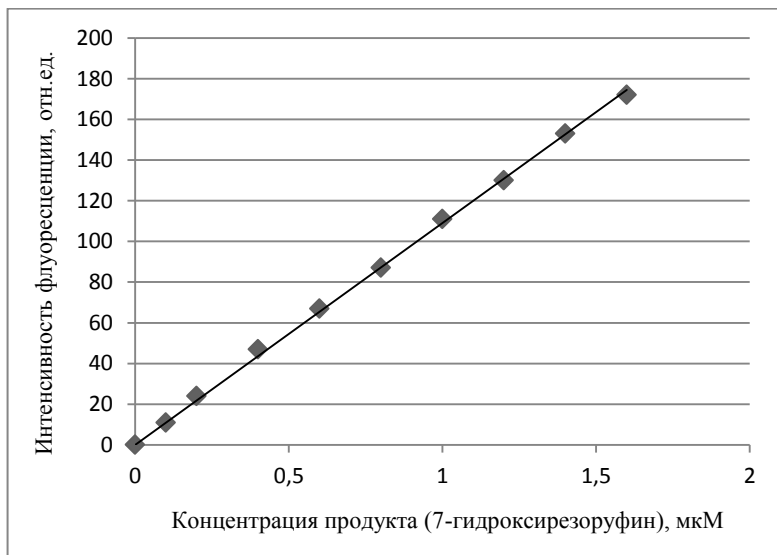


Рис. 11.3. Калибровочная зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации 7-гидроксирезорифина

Задание III. Определение каталитической активности цитохрома P450 по отношению к бенз(а)пирену (B[a]P).

Окисление B[a]P осуществляют при 37 °С в 1 мл буфера (50 мМ Трис-НСl, 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, рН 7,5), содержащим микросомы животных.

Концентрация цитохрома P450 составляет 55 пмоль/мл. Реакцию начинают добавлением НАДФН и проводят в течение 20 мин. Начальная концентрация В[а]Р составляет 1,0 мкМ. Останавливают реакцию добавлением 1 мл холодного ацетона (4 °С). После добавления ацетона вносят 3,25 мл гексана и экстрагируют смесь в течение 1 мин. с использованием шейкера. Из органической фазы отбирают 1 мл образца и экстрагируют 2 мл 1 Н раствора NaOH.

Концентрацию 3-гидрокси-В[а]Р (продукт реакции) в щелочной фазе определяют спектрофлуориметрически при длине волны возбуждения 396 нм, длине волны испускания 533 нм и ширине щелей 2 нм на спектрофлуориметре.

ОФОРМЛЕНИЕ РАБОТЫ

1. Кратко записать теоретические данные.
2. Описать ход работы.
3. Сделать выводы по работе.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 12.

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ (ПЦР)

Цель: дифференциальная диагностика культур *E. coli* содержащих плазмиды *pET16b* и *pET22b* и их количественное сравнение с использованием метода полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Оборудование и материалы: спектрофотометр «Solar», кюветы полистирольные, термостат, автоматические микропипетки, пробирки, штативы для пробирок, колбы на 100–250 мл, цилиндры мерные на 50–100 мл, палочка стеклянная.

Реактивы:

- среда Лурия–Бертрани (LB) следующего состава (г/л): бактотриптон – 10 г/л, дрожжевой экстракт – 5 г/л, хлорид натрия – 5 г/л, гидроокись натрия – 0,008 М, рН 7,5, ампициллин – 100 мг/л. Среду стерилизуют автоклавированием при 105 °С в течение 1 ч;

- физиологический раствор – 0,9 % раствор NaCl;

- десятикратный концентрат (10X) буферного раствора для Taq-полимеразы – 100 mM трис-HCl, рН 8,3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂;

- водный раствор 8 mM дНТФ, содержащий 2 mM АТФ, 2 mM ТТФ, 2 mM ГТФ, 2 mM ЦТФ;

- раствор Taq-полимеразы в буфере для хранения (5 единиц активности в мкл).

- растворы 1 пМ олигонуклеотидов, служащих прямым (F) и обратным (R) праймерами. Олигонуклеотиды имеют следующие последовательности:

- T7 5'-ATgggTATTCAACATTTTC-3' – прямой (F) праймер;

- T7 5'-gTTACCAATgCTTAATCA-3' – обратный (R) праймер;

- интеркалирующего красителя SYBR Green (1000X) 0,5 мкл;

- дважды дистиллированная вода (2д. H₂O).

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Основы полимеразной цепной реакции

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе). Метод ПЦР широко используется во всех областях биологии и медицины: молекулярной диагностике (детекции микроорганизмов и вирусов, анализе экспрессии генов, выявлении индивидуальных генетических особенностей), а также

в молекулярном клонировании, секвенировании и в других молекулярно-генетических исследованиях.

В начале 1970-х гг. Х. Клеппе предложил способ амплификации ДНК с помощью пары коротких одноцепочечных молекул ДНК – праймеров. Однако в то время эта идея осталась нереализованной. ПЦР была изобретена в 1983 г. К. Муллисом, а в 1993 г. получена Нобелевская премия. Метод позволял амплифицировать ДНК в ходе многократных последовательных удвоений исходной молекулы ДНК с помощью фермента – ДНК зависимой ДНК-полимеразы. В 1980 г. Городецкий с коллегами выделил из термостабильных бактерий *Thermus aquaticus* ДНК полимеразу, названную *Taq*. В 1986 г. с использованием *Taq*-полимеразы было предложено проводить ПЦР.

ПЦР – это многократное повторение денатурации ДНК, отжига праймеров (затравок) и праймированного синтеза комплементарной цепи ДНК в условиях *in vitro*. Метод основан на способности термостабильных ДНК-полимераз выдерживать без ощутимой потери активности высокие температуры, необходимые для денатурации ДНК. ДНК-полимераза катализирует синтез длинных полинуклеотидных цепей из мономеров – дезоксинуклеозидтрифосфатов (дНТФ), используя одну из цепей ДНК в качестве матрицы для построения комплементарной цепи. Для начала синтеза новой цепи ферменту необходимы праймеры – синтетические олигонуклеотиды длиной 15–30 оснований, которые ограничивают синтезируемый фрагмент. Для синтеза одного фрагмента используют два олигонуклеотидных праймера – прямой и обратный, которые гибридизуются с противоположными цепями ДНК и ограничивают участок синтезируемой нуклеотидной последовательности. Работа полимеразы заключается в удлинении строящейся цепи путем добавления нуклеотидов, комплементарных последовательности матричной ДНК. Таким образом, в одном температурном цикле вновь синтезируется два новых фрагмента ДНК, а за 25–35 циклов в пробирке накапливаются миллиарды копий участка ДНК, ограниченного праймерами. Структура отдельного цикла ПЦР представлена на рис. 12.1.

Серия таких циклов позволяет получить экспоненциальное накопление фрагмента ДНК. В идеальном случае, наработка специфического фрагмента подчиняется закону 2^n , где n – число циклов, а 2 – количество исходной двуцепочечной ДНК. После проведения 25–30 циклов происходит увеличение фрагмента в 10^6 – 10^8 раз.

В техническом исполнении, ПЦР требует большого внимания, аккуратности и определенных навыков работы по дозированию микрообъемов. Готовят реакционную смесь, в состав которой входят: буферный раствор определенного состава, праймеры, смесь дНТФ, термостабильная ДНК-полимераза и образец ДНК. Для предотвращения

испарения реакционной смеси, добавляют небольшое количество минерального масла. Пробирку с полученным раствором помещают в программируемый термостат (ДНК-амплификатор) и выбирают необходимую программу циклической смены температуры и длительности каждого шага реакции. Общий объем реакционной смеси обычно составляет от 10 до 100 мкл. Выбор оптимального режима работы определяется длиной амплифицируемого участка ДНК, характеристиками олигонуклеотидных праймеров и свойствами используемой ДНК-полимеразы. К недостатку данного метода, относят высокую вероятность перекрестного загрязнения (контаминации) между исследуемыми образцами, что приводит к ложноположительным результатам.

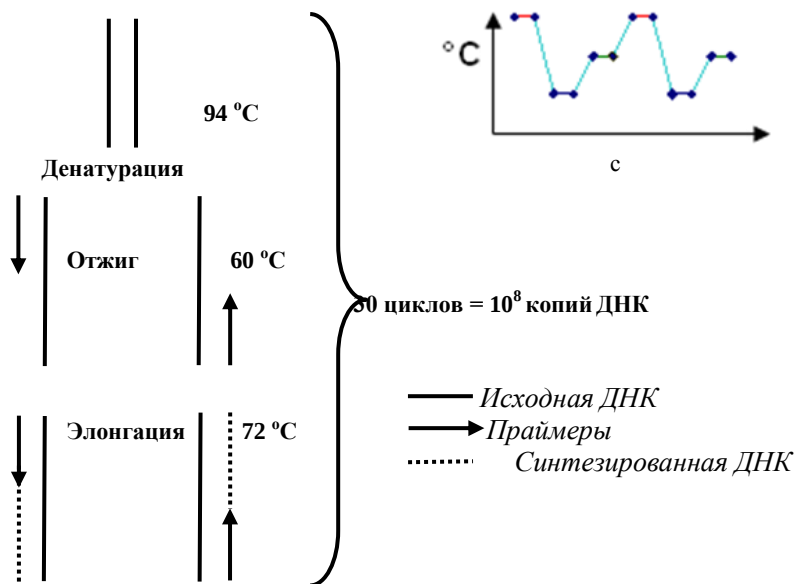


Рис. 12.1. Структура отдельного цикла ПЦР

Денатурация ДНК. На первом этапе проведения ПЦР исследуемая двунитевая ДНК переводится в одонитевую форму путем денатурации (плавления, расхождение цепей ДНК) при температуре $92\text{--}95^{\circ}\text{C}$ от 10 с. до 15 мин.

Отжиг праймеров. В молекулярной биологии гибридизацию праймеров на специфическом участке ДНК называют «отжигом». Гибридизация (отжиг) достигается понижением температуры реакционной смеси до $40\text{--}60^{\circ}\text{C}$. При этом происходит образование

двунитевого участка в той области, где праймеры комплементарны участку последовательности ДНК.

Элонгация (удлинение или развитие) цепи, включает синтез новой цепи ДНК начиная с 3' концевого нуклеотида праймера в направлении 5'→3'. При этом оптимальная температура работы термостабильной ДНК-полимеразы составляет 60–72 °С, а время зависит от длины синтезируемого фрагмента.

Для предотвращения контаминации соблюдают ряд требований:

- этапы очистки нуклеиновых кислот, приготовления реакционных смесей и анализа результатов реакции проводят в отдельных помещениях, с использованием отдельных комплектов автоматических дозаторов;
- используют одноразовые микропробирки и наконечники, желательно с аэрозольными фильтрами, не содержащие нуклеаз;
- все этапы проводят в новых одноразовых перчатках;
- в каждый эксперимент включают отрицательный и положительный контроли.

Компоненты реакционной смеси ПЦР

ДНК (кДНК). Для проведения специфической амплификации не требуется больших количеств ДНК и, в принципе, достаточно даже одной молекулы. Источником ДНК может служить любой биологический материал. В медицинской практике наряду с препаратами цельной крови, используют высушенные на фильтровальной бумаге пятна крови, небольшие кусочки тканей, смывы полости рта, других слизистых поверхностей и т. д. ДНК должна быть хорошо очищена от белков, липидов и растворена в воде или низкосолеовом буфере (рН 7,5–8,5). Количество ДНК (кДНК) для проведения ПЦР обычно составляет 0,1–100 пг ДНК в зависимости от длины фрагмента. Для амплификации уникальных последовательностей на сложных матрицах (геномная ДНК, первая цепь кДНК) требуется 10–200 нг ДНК, при этом ДНК рекомендуют прогреть при 65 °С в течение 2 мин. и хорошо перемешать перед добавлением в реакцию.

Праймеры. Специфичность метода достигается за счет использования искусственно синтезированных олигонуклеотидных праймеров длиной от 8 до 1000 оснований, (оптимально 20–30 оснований), комплементарных уникальным участкам нуклеотидной последовательности исследуемой ДНК. Выбор уникального участка осуществляют при сравнительном анализе нуклеотидной последовательности исследуемой ДНК с гомологичными последовательностями. Расстояние между выбранными уникальными участками нуклеотидной последовательности определяет длину синтезируемой молекулы.

Определение размера синтезируемой молекулы ДНК в последующем используют для подтверждения специфичности метода. Учитывают температуру плавления (T_m) обоих праймеров, которая должна быть сходной. Для олигонуклеотидов размером 15–30 оснований, T_m рассчитывают по формуле:

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = 2(A+T) + 4(G+C),$$

где A+T общее количество оснований аденина (A) и тимина (T) в олигонуклеотиде; G+C общее количество оснований гуанина (G) и цитозина (C) в олигонуклеотиде.

Данная формула дает приблизительное значение T_m ($^{\circ}\text{C}$), с погрешностью около 5 $^{\circ}\text{C}$. Точное значение подбирается эмпирически. Предпочтительная температура плавления праймеров 55–65 $^{\circ}\text{C}$, а содержание G+C оснований – около 50 %. Для праймеров с низким содержанием G+C используют более длинные последовательности, чтобы повысить температуру плавления. В реакцию добавляют обычно 20–500 нМ каждого праймера. Слишком низкая концентрация праймеров может снижать эффективность амплификации, а высокая – приводить к неспецифической амплификации.

Смесь дНТФ – дезоксинуклеотидтрифосфаты используются для достройки растущей цепи ДНК полимеразой. дНТФ обычно используют в концентрации 20–400 мкМ. Следует помнить, что избыток дНТФ приводит к возникновению ошибок при синтезе новой цепи, а недостаток снижает эффективность ПЦР. Чистота препарата дНТФ имеет критическое значение для эффективности ПЦР.

Реакционный буфер – создает оптимальные условия для работы термостабильной ДНК-полимеразы. В состав буфера в классическом варианте входят: компоненты, создающие буферную емкость раствора (Tris HCl, tricine и др. pH ~ 8,7); компоненты, формирующие ионную силу раствора – чаще других используют соли KCl или NH_4SO_4 (повышают активность полимеразы на 40–60 %); неионные детергенты, например, Tween 20 или Тритон X-100 (предотвращают адсорбцию ДНК-полимеразы на поверхности пробирки); ион Mg^{2+} – является кофактором ДНК полимеразы и образует комплексы с дНТФ. Концентрация Mg^{2+} влияет на специфичность и эффективность ПЦР. Повышение концентрации Mg^{2+} увеличивает эффективность ПЦР, но снижает специфичность. Оптимальная концентрация этого иона подбирается эмпирически (обычно в диапазоне 1–3 мМ) и во многом зависит от первичной структуры исследуемой ДНК и олигонуклеотидных праймеров.

Термостабильные ДНК полимеразы – белки, по молекулярной массе приближающиеся к 90–95 кДа, температурный оптимум работы которых составляет 72–84 °С. Обнаружены в термофильных бактериях. Первая термостабильная ДНК-полимераза была обнаружена и выделена из штамма бактерии *Thermus aquaticus* YTI (*Taq* ДНК-полимераза), обитающей в гейзерах (7). Использование рекомбинантного белка позволило упростить и автоматизировать проведение ПЦР. В настоящее время в молекулярной диагностике используется множество модификаций *Taq* ДНК-полимеразы, полученных с использованием генной инженерии. В экспериментах по молекулярному клонированию использование *Taq* ДНК-полимеразы имеет ограничение. Недостатком *Taq* ДНК-полимеразы является высокая вероятность внесения ошибочного нуклеотида в растущую цепь ДНК. Это связано с отсутствием 3'→5' экзонуклеазной активности, которая позволяет удалять ошибочный нуклеотид. Такой активностью обладают ДНК полимеразы *Pfu*, *Vent* и др. Их использование значительно уменьшает число ошибочных нуклеотидов в растущей цепи ДНК, однако они более требовательны к условиям реакции. При амплификации фрагментов ДНК с целью молекулярного клонирования, применяют смеси *Taq* и *Pfu* ДНК полимераз, чтобы добиться одновременно высокой скорости и точности копирования.

Вода является компонентом всех реакционных смесей. От степени ее чистоты зависит эффективность реакции. В ПЦР используют дважды дистиллированную воду свободную от нуклеаз.

Дополнительные компоненты ПЦР. В реакционную смесь часто вносят дополнительные компоненты, повышающие или понижающие эффективность отдельных стадий реакции. Для повышения эффективности гибридизации ДНК (РНК) и праймера используют тетраметиламмонийхлорид (ТМАК), при этом ингибирование ДНК-полимеразы не наблюдается. Амплификацию GC-богатых матриц рекомендуется проводить с добавлением диметилсульфоксида (ДМСО) или формамида в концентрации 3–5 %, при этом снижают температуру отжига праймеров на 2–3 °С. Добавление ДМСО или формамида приводит к снижению эффективности спаривания молекул праймера и ДНК тем самым, уменьшая количество не специфических спариваний.

Модификации ПЦР

Обратная транскрипция – ПЦР (*Reverse transcription PCR*) – применяется для исследования РНК. ПЦР способна проходить только на матрице ДНК. Для исследования РНК перед ПЦР проводят реакцию обратной транскрипции (ОТ), которая представляет собой метод синтеза

комплементарной ДНК (кДНК) на матрице РНК. В ходе ОТ-ПЦР одноцепочечная молекула РНК превращается в комплементарную одноцепочечную ДНК, которую затем амплифицируют, используя традиционную ПЦР. Такой синтез возможен с участием фермента РНК-зависимой ДНК-полимеразы, которую также называют обратной транскриптазой или ревертазой. Ревертаза кодируется геномами некоторых РНК-содержащих вирусов и подвижных генетических элементов генома высших организмов. Наиболее часто для ОТ-ПЦР используют ревертазу вируса мышинного лейкоза Молони (M-MLV от англ. *Moloney Murine Leukemia Virus*) или вируса птичьего миелобластоза (AMV от англ. *Avian myeloblastosis virus*). Ниже приведен пример проведения реакции обратной транскрипции с использованием M-MLV ревертазы: смешивают 4,5 мкл очищенной РНК с 0,5 мкл (0,2 мкМ) праймера. РНК денатурируют в амплификаторе при 70 °С в течение 2 мин. и охлаждают до комнатной температуры. В пробирку вносят 5 мкл реакционной смеси содержащей: 2 мкл × 5 буферного раствора для M-MuLV, 0,5 мкл 8 mM dNTP, 0,2 мкл (40 единиц активности) ревертазы M-MuLV. Полученную смесь инкубируют 30 мин. при 42 °С. Реакцию останавливают нагреванием при 94 °С в течение 5 мин.

ПЦР в два раунда используется для детекции нуклеиновых кислот в следовых количествах (1–100 копий на пробу). Этот вариант ПЦР также получил название «гнездовая» ПЦР (от англ. *nested PCR*), из-за расположения праймеров, которые формируют на схематическом рисунке структуру похожую на гнездо (рис. 12.2). Праймеры подбираются таким образом, чтобы места их гибридизации во втором раунде ПЦР находились внутри участка ДНК, ограниченного праймерами для первого раунда ПЦР. При таком проведении ПЦР ДНК, синтезируемая в первом раунде, служит матрицей для второго раунда реакции. ПЦР в два раунда позволяет добиться повышения чувствительности реакции, за счет увеличения числа циклов ПЦР, и повышения специфичности, за счет использования комбинации из четырех праймеров. Следует отметить, что при использовании ПЦР в два раунда повышается вероятность контаминации между исследуемыми образцами.

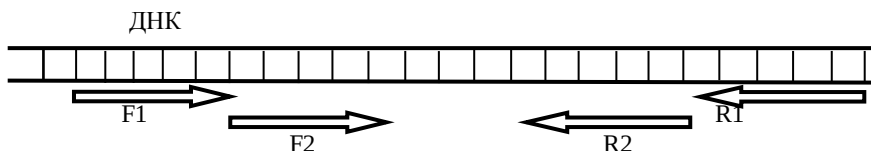


Рис. 12.3. Схема расположения праймеров (F1, F2, R1, R2) на ДНК мишени при проведении ПЦР в два раунда («гнездовой ПЦР»)

ПЦР с горячим стартом («Hot start» PCR) – применяется для уменьшения неспецифического отжига праймеров в ходе приготовления реакционной смеси при комнатной температуре. В классическом варианте ПЦР с горячим стартом один из критических для реакции компонентов добавляют к реакционной смеси при температуре 80 °С. Описаны методы, в которых между компонентами создают механическую преграду (например, восковую). После нагревания преграда расплавляется и компоненты смешиваются. Альтернативным подходом является использование химически модифицированных ДНК полимераз или полимераз связанных с моноклональными антителами. Прогрев реакционной смеси, содержащий такие ДНК полимеразы, при повышенной температуре приводит к их активации.

ПЦР с плавным снижением температуры отжига праймеров («Touch down» PCR) – применяется для повышения специфичности реакции. В первых циклах ПЦР температура отжига праймеров превышает расчетную, что снижает вероятность неспецифического отжига праймеров. Последовательное снижение температуры отжига праймеров в каждом цикле приводит к увеличению доли специфического фрагмента ПЦР.

Протяженный ПЦР («Long» PCR) – применяется для амплификации протяженных участков ДНК (от 5 до 15–20 тыс. п.о.). Обычно используют смесь ДНК-полимераз, например смесь *Taq* и *Pfu* полимераз в соотношении 10:1. Также существенно увеличивается время элонгации.

ПЦР в ткани («In situ» PCR) – проводится в образцах тканей фиксированных на предметном стекле. Позволяет изучать процессы внутриклеточного размножения и развития вирусов, экспрессии генов в различных клетках ткани. Регистрация результатов реакции обычно проводится методом гибридизации с использованием флуоресцентных меток.

ПЦР в одной клетке («Singl-cell» PCR) – это ПЦР, в которой в качестве матрицы используется нуклеиновая кислота, полученная из одной клетки. Применяется в экспериментах по генетике человека и животных, в перинатальной диагностике.

Множественная ПЦР (multiplex PCR) – это ПЦР, в которой одновременно используют более одной пары олигонуклеотидных праймеров, что приводит к одновременной амплификации нескольких фрагментов ДНК. Такая реакция позволяет экономить время и реактивы. В молекулярной диагностике наиболее часто применяется для проведения ПЦР с внутренним положительным контролем. Широко используется для экспресс-идентификации инфекционных агентов или для исследования состояния нескольких аллельных генов у эукариотических организмов.

ПЦР в реальном времени (Real-time PCR) – метод позволяет регистрировать накопление ДНК ПЦР в реальном времени с использованием флуоресценции и количественно оценить ДНК в образце. Для этой цели применяют флуоресцентные метки (флуорофоры) двух видов:

1. **Интеркалирующие флуорофоры** – соединения, которые встраиваются в любые двуцепочечные молекулы нуклеиновой кислоты и повышают интенсивность флуоресценции. Примерами таких красителей может служить SYBR Green или SYBR Gold. Интеркалирующие красители широко используются в научных исследованиях, однако обладают существенным ограничением, поскольку регистрируют все двуцепочечные ДНК, включая неспецифичные продукты реакции.

2. **Флуорофоры для меченья олигонуклеотидов** – это соединения, интенсивность флуоресценции которых не зависит от связывания с ДНК и регулируется так называемыми гасителями (темновыми или флуоресцирующими).

Олигонуклеотиды меченные парой флуорофор–гаситель, используют в качестве праймеров или зондов (пробы) для гибридизации со специфическим участком молекулы ДНК. К настоящему времени разработано множество вариантов структуры меченных парой флуорофор – гаситель олигонуклеотидов. Ниже приведены наиболее часто используемые зонды.

Линейные разрушаемые зонды (TaqMan) – представляют собой олигонуклеотид (25–30 н.о.), в котором 5'-концевой нуклеотид содержит флуорофор, а 3'-концевой нуклеотид – гаситель. В растворе и при отжиге на ДНК такой зонд не флуоресцирует, за счет гасителя. Во время элонгации ДНК полимеразы, обладающая 5'-3'-экзонуклеазной активностью, гидролизует зонд на нуклеотиды. В результате этого флуорофор и гаситель попадают в раствор, где вероятность нахождения этих веществ рядом будет небольшой, и флуоресценция восстановится. Накопление флуоресценции детектируется прибором при каждом цикле ПЦР. В одной реакции можно использовать несколько зондов, у которых флуорофоры имеют разные спектры испускания.

«Молекулярные маячки» (beacons) – зонд представляет собой небольшую одноцепочечную молекулу ДНК, которая в свободном состоянии способна образовывать пространственную структуру – шпильку. На одном конце олигонуклеотида располагают флуорофор, а на втором – гаситель. Последовательность зонда комплементарна ДНК-мишени, которую нужно детектировать. В такой структуре молекулы зонда, находясь в растворе, не флуоресцируют. При отжиге

олигонуклеотида на молекуле ДНК мишени, происходит пространственное разнесение флуорофора от гасителя и восстановление флуоресценции.

Примыкающие пробы (Light cycler) – в этом варианте используют два зонда, которые связывают ДНК-мишень на небольшом расстоянии друг от друга. 5'-конец одного зонда и 3'-конец второго содержат флуорофор-донор и флуорофор-акцептор, соответственно. При их близком расположении флуорофор-донор поглощает свет определенной длины волны и переносит энергию на флуорофор-акцептор, по флуоресценции которого детектируют продукты амплификации. Применение примыкающих проб также позволяет использовать несколько флуорофоров, с разными спектрами испускания и детектировать в одной пробирке сигнал от разных молекул ДНК.

Анализ данных ПЦР в реальном времени позволяет судить как о присутствии или отсутствии искомой НК, так и оценить ее изначальное количество, за счет регистрации накопления продуктов амплификации в течение всей реакции. Количество исследуемой НК выражают в абсолютных или относительных значениях. Определение абсолютных значений применяют для расчета количества копий НК в пробирке. Для этого необходим внешний контроль с известной концентрацией НК-мишени. Относительные количества определяют для ответа на вопрос: во сколько раз концентрация НК в одном образце больше (или меньше) чем в другом? Для коррекции массы образца, числа клеток, сохранности и количества общей НК проводят нормировку (выравнивание) результатов. Нормировку проводят по числу клеток, по суммарной ДНК, РНК, рибосомальной РНК и др. В исследованиях по определению уровня представленности транскриптов наибольшее распространение получило использование так называемых генов «домашнего хозяйства» (*housekeeping genes*). Они экспрессируются на постоянном уровне и слабо реагируют на внешние воздействия, поскольку необходимы для поддержания важнейших жизненных функций клетки. При выборе гена домашнего хозяйства, следует учитывать, что уровень их экспрессии может меняться в разных типах клеток.

Расчеты результатов ПЦР в реальном времени достаточно сложны и проводятся в автоматическом режиме с использованием компьютерных программ. Одной из программ для расчета относительного количества ДНК-мишени, находящейся в свободном доступе в сети Интернет, является REST2009. Расчеты основаны на связи интенсивности флуоресцентного сигнала с концентрацией ДНК в пробирке. Сравнивают число циклов амплификации, необходимых для нарастания сигнала флуоресценции в образцах до одной и той же величины. Теоретически концентрация ампликонов при многократном

повторении цикла должна возрастать экспоненциально и описывается формулой:

$$C_n = C_0 \times 2^n,$$

где C_0 – исходное количество ДНК-мишени; C_n – концентрация ампликонов после n циклов.

На практике, синтез ампликонов постепенно замедляется по мере истощения компонентов реакционной смеси. Накопление ДНК в ходе ПЦР описывают кривой (рис. 12.3) и делят на четыре стадии: линейная фоновая фаза, стадия раннего экспоненциального роста количества ампликона, стадия линейного логарифмического роста, стадия выхода на плато.

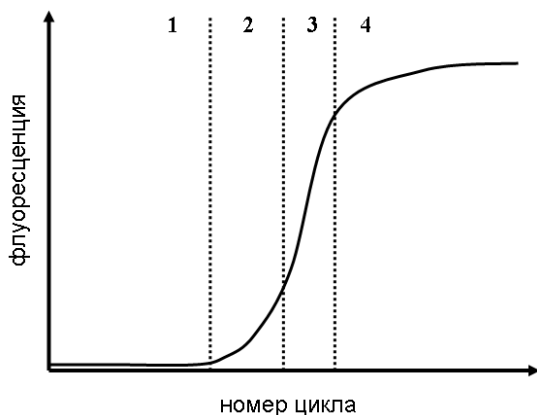


Рис. 12.3. Зависимость флуоресценции от номера цикла:
1 – линейная фоновая фаза; 2 – ранний экспоненциальный рост;
3 – линейный логарифмический рост; 4 – плато

На стадии раннего экспоненциального роста эффективность амплификации максимальна в сравнении с другими стадиями. Накопление ДНК в ходе ПЦР описывается формулой:

$$C_n = C_0 \times (1 + E)^n,$$

где C_n – количество продуктов реакции на цикле n ; C_0 – изначальное количество исследуемой ДНК на первом цикле; E – эффективность амплификации. Значение E находится в пределах от 0 до 1, что соответствует удвоению исходного количества ДНК за цикл, а при $E = 0$ образование продукта не происходит.

Для сравнения данных между образцами используют один из двух методов. В первом, для расчета величины n используют значение

порогового цикла (Ct – от англ. *threshold cycle*) – точки пересечения кривой накопления флуоресценции и одинаковой для всех образцов пороговой линии. Значение Ct определяется автоматически программным обеспечением к прибору или задается вручную в пределах стадии раннего экспоненциального роста накопления флуоресценции. Во втором, используют метод прямого сравнения графиков. Для определения величины n на кривой находят точку, положение которой отражает форму кривой (Cp – от англ. *crossing point*). Обычно рассчитывают максимумы первой и второй производных графиков накопления флуоресценции. Значение эффективности амплификации подбирается эмпирически путем последовательных разбавлений образца.

ПЦР в реальном времени обладает рядом преимуществ, за счет которых с его помощью, например, выявляют и идентифицируют полиморфные локусы HLA, проводят мониторинг посттрансплантационных взаимодействий, генотипируют (выявляют аллели), проводят количественный микросателлитный анализ и пренатальную диагностику генетических заболеваний и т. д.

ЛИТЕРАТУРА

1. Назаренко Г. И., Кишкун А. А. Лабораторные методы диагностики неотложных состояний / Г. И. Назаренко, А. А. Кишкун. – М.: Медицина, 2002.
2. Лившиц В. М., Сидельникова В. И. Медицинские лабораторные анализы / В. М. Лившиц, В. И. Сидельникова. – М.: ТРИАДА-Х, 2000.
3. Медицинская лабораторная диагностика: программы и алгоритмы / под ред. А. И. Карпищенко. – СПб.: Интермедика, 1997.
4. Клиническая биохимия / под ред. В. А. Ткачука. – М.: Геотар-Мед, 2004.
5. Медицинские лабораторные технологии / под ред. А. И. Карпищенко. – СПб.: Интермедика, 1990.
6. Камышников В. С. Клинико-биохимическая лабораторная диагностика: справочник / В. С. Камышников. – в 2-х т. – Минск: Интерпрессервис, 2003.

ОФОРМЛЕНИЕ РАБОТЫ

1. Кратко записать теоретические данные.
2. Описать ход работы.
3. Сделать выводы по работе.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 13.

АВТОМАТИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Цель: составление программ для автоматизированных биохимических анализаторов на приме общего белка (методом конечной точки) и аланин-аминотрансферазы (кинетическим методом).

Оборудование и материалы: автоматизированный биохимический анализатор АВБОТТ Architect с8000, автоматические микропипетки, пробирки, штативы для пробирок.

Реактивы: субстраты для определения АЛТ (буферный раствор, рН 7,4); L-аланин, α -кетоглутаровая кислота, биуретовый реактив.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Принцип действия автоматических биохимических анализаторов

Лабораторные исследования крови невозможны без биохимических анализаторов. Принцип их работы основан на компьютерных, оптических и механических технологиях. С помощью такого прибора выполняются различные тесты, определяющие биохимический состав крови и наиболее важные значения ее параметров.

Высокая производительность анализаторов крови играет чрезвычайно важную роль в здравоохранении. Благодаря такому оборудованию успешно решаются задачи всеобщей диспансеризации населения и обследования пациентов с различными заболеваниями. В настоящее время производители выпускают огромное количество аппаратов для биохимического анализа крови. Они отличаются друг от друга набором опций, однако принцип работы у них один и тот же.

Прибор для биохимического анализа крови – это устройство, способное подсчитывать количество импульсов, возникающих при прохождении клетки крови через специальное отверстие с очень маленьким диаметром (апертуру) и определять характер этих импульсов. Принцип работы биохимического анализатора довольно прост. С обеих сторон отверстия находятся два независимых друг от друга электрода. Когда клетка проходит через апертуру, образуется электрический импульс, регистрируемый специальным датчиком. Для определения степени концентрации тестируемых клеток через апертуру прогоняют через канал нужный объем пробы и выполняют подсчет образованных при этом импульсов.

Иногда при подсчете импульсов происходит сбой и устройство выдает ошибочный результат. Это происходит, например, когда в одно и то же время в апертуре находится сразу две клетки. В этом случае анализатор регистрирует их как один электрический импульс. Чтобы

избежать подобной ошибки, делают разведение тестируемой пробы посредством изотонического раствора определенной концентрации. Это позволяет добиться присутствия в канале устройства в нужный момент только одной клетки. Тем не менее при недостаточном перемешивании дозы крови перед тестированием ошибка не исключается даже при верном разведении пробы.

Результат анализа, выполненный биохимическим анализатором, выдается в виде цифровых значений (абсолютных и относительных) и дополнительного графического изображения – гистограммы распределения тестируемых клеток крови по их объему. Анализируют оба вида полученной информации параллельно.

В процессе лабораторных исследований используют как простые полуавтоматические приборы для биохимического анализа крови, так и сложные полностью автоматизированные устройства. Каждый анализатор предполагает, как правило, использование определенной реагентной среды.

К основным составляющим комплектов реагентов для анализаторов относятся:

- изотонический разбавитель;
- очищающий состав (применяется после каждой пробы);
- лизирующий раствор;
- состав для глубокой очистки устройства;
- состав для быстрой очистки датчика (применяется также в процессе сервисного обслуживания).

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Что представляет собой биохимический анализатор и на чем основан принцип его работы?
2. Перечислите реагенты для биохимических анализаторов.
3. Физический смысл молярного коэффициента поглощения.
4. К чему приводит удлинение оптического пути?

ЛИТЕРАТУРА

1. *Назаренко Г. И., Кишкун А. А.* Лабораторные методы диагностики неотложных состояний / Г. И. Назаренко, А. А. Кишкун. – М.: Медицина, 2002.
2. *Лившиц В. М., Сидельникова В. И.* Медицинские лабораторные анализы / В. М. Лившиц, В. И. Сидельникова. – М.: ТРИАДА-Х, 2000.

3. Медицинская лабораторная диагностика: программы и алгоритмы / под ред. А. И. Карпищенко. – СПб.: Интермедика, 1997.

4. Клиническая биохимия / под ред. В. А. Ткачука. – М.: Геотар-Мед, 2004.

5. Медицинские лабораторные технологии / под ред. А. И. Карпищенко. – СПб.: Интермедика, 1990.

6. Камышников В. С. Клинико-биохимическая лабораторная диагностика: справочник / В. С. Камышников. – в 2-х т. – Минск: Интерпрессервис, 2003.

ХОД РАБОТЫ

Задание I. Определение наиболее важных параметров для введения программы в автоматизированный биохимический анализатор для определения концентрации общего белка в сыворотке крови.

Принцип метода

Метод анализа основан на образовании комплексов, окрашенных в фиолетовый цвет (биуретовый реактив), при взаимодействии белков с ионами меди.

Порядок выполнения работы

1. Определить наиболее важные параметры для ввода в автоматический анализатор из инструкций к наборам для определения концентрации общего белка в сыворотке крови биуретовым методом:

2. Вести адекватный объем сыворотки (в мкл).

3. Ввести соответствующий объем реагента (биуретового реактива) (в мкл).

4. Ввести значение длины волны (λ), характерное для данного типа реакции.

5. Указать время реакции, необходимое для осуществления полного окрашивания комплекса – в мин.

6. Определить тип реакции, характерный для данного набора (конечная точка, кинетика).

7. Дополнительно определить свободное место на карусели реагентов для установки нового реагента.

8. Результаты программирования предоставить в печатном виде.

Задание II. Определение наиболее важных параметров для введения программы в автоматизированный биохимический анализатор для определения активности аланинаминотрансферазы (АЛТ) кинетическим методом.

Принцип метода

Кинетический метод определения каталитической активности АЛТ основан на последовательности ферментативных реакций, в результате которых из L-аланина и 2-оксоглутарата образуются глутамат и пируват (под действием АЛТ). Далее из пирувата и НАДН + H^+ под действием ЛДГ образуется лактат и НАД⁺.

Порядок выполнения работы

1. Определить наиболее важные параметры для ввода в автоматический анализатор из инструкций к наборам для определения активности АЛТ в сыворотке крови кинетическим методом:
2. Вести адекватный объем сыворотки (в мкл).
3. Ввести соответствующий объем реагента (в мкл).
4. Ввести значение длины волны (λ , в нм), характерное для данного типа реакции.
5. Указать время реакции, необходимое для осуществления полного окрашивания комплекса (в мин).
6. Определить тип реакции, характерный для данного набора (конечная точка, кинетика).
7. Дополнительно определить свободное место на карусели реагентов для установки нового реагента.
8. Результаты программирования предоставить в печатном виде.

ОФОРМЛЕНИЕ РАБОТЫ

1. Кратко записать теоретические данные.
2. Описать ход работы.
3. Сделать выводы по работе.

Учебное издание

Сыса Алексей Григорьевич,
Стельмах Виктор Александрович,
Власенко Евгений Константинович,
Бакунович Андрей Валерьевич

МЕТОДЫ КЛИНИЧЕСКОЙ
БИОХИМИИ
И БИОФИЗИКИ

Лабораторный практикум

Редактор *А. В. Красуцкая*
Компьютерная верстка *А. В. Красуцкая*
Технический редактор *А. В. Красуцкая*

Подписано в печать 27.11.2018. Формат 60×90 1/16.
Бумага офсетная. Печать офсетная.
Усл. печ. л. 8,19. Уч.-изд. л. 5,59.
Тираж 100 экз. Заказ № 455.

Республиканское унитарное предприятие «Информационно-
вычислительный центр Министерства финансов Республики Беларусь».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий
№ 1/161 от 27.01.2014, № 2/41 от 29.01.2014.
ул. Кальварийская, 17, 220004, г. Минск.