

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Сибирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное учреждение
**«Томский национальный исследовательский медицинский центр
Российской академии наук»**

**Г.А. Суханова, Л.В. Спирина,
Д.И. Кузьменко, О.Е. Акбашева**

**Медицинская биохимия:
принципы измерительных технологий
в биохимии**

учебное пособие

Под редакцией В.Ю. Сереброва

Томск
Издательство СибГМУ
2018

УДК 577.1:616-098](075.8)
ББК 52.57я73+52.526я73
М 422

М 422 Медицинская биохимия: принципы измерительных технологий в биохимии: учебное пособие / Г.А. Суханова, Л.В. Спирина, Д.И. Кузьменко, О.Е. Акбашева; под ред. В.Ю. Сереброва. – Томск: Издательство СибГМУ, 2018. – 133 с.

Учебное пособие подготовлено в соответствии с Федеральным государственным образовательным стандартом высшего образования по специальности 30.05.01 – Медицинская биохимия.

В пособии представлены теоретические основы и практическое применение методов изучения химического состава биологических жидкостей. Каждая тема в пособии разделена на информационный и экспериментальный блок. В информационном блоке представлено обоснование, практическое применение биохимических методов в медицине. Экспериментальный блок состоит из лабораторных работ и семинаров, выполнение которых позволит сформировать необходимые компетенции для работы в биохимической лаборатории.

Полученные знания помогут найти правильные решения в условиях работы научной и клиничко-диагностической лабораторий, интерпретировать результаты исследований биохимических процессов в норме и патологии, планировать проведение экспериментального исследования, совершенствовать существующие и разрабатывать новые методы диагностики и лечения.

**УДК 577.1:616-098](075.8)
ББК 52.57я73+52.526я73**

Рецензент:

Медведев М.А. – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, заведующий кафедрой нормальной физиологии СибГМУ.

Учебное пособие утверждено и рекомендовано к печати Методической комиссией МБФ ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (протокол № 2 от 27.12.2016).

© Г.А. Суханова, Л.В. Спирина,
Д.И. Кузьменко, О.Е. Акбашева, 2018.
© Издательство СибГМУ, 2018.

СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений.....	5
Введение.....	6
ТЕМА 1. ЭТАПЫ ЛАБОРАТОРНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ.....	7
1.1. Преаналитический этап.....	7
1.2. Аналитический этап.....	18
1.3. Постаналитический этап.....	40
Семинар. Качество лабораторных исследований.....	40
ТЕМА 2. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ.....	42
Лабораторная работа. Техника безопасности при работе в лаборатории. Правила работы с лабораторным оборудованием.....	44
Семинар. Физико-химические методы исследования в биохимии.....	46
ТЕМА 3. ИММУННЫЕ И ИММУНОФЕРМЕНТНЫЕ МЕТОДЫ.....	49
Лабораторная работа № 1. Иммуноферментное определение содержания тропонина I в сыворотке крови.....	50
Лабораторная работа № 2. Иммуноферментное определение содержания С-реактивного белка в сыворотке крови.....	53
Семинар. Иммунохимические методы исследования в биохимии.....	56
ТЕМА 4. БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ.....	58
4.1. Прямое определение метаболитов в крови.....	61
Лабораторная работа. Определение содержания глюкозы в крови портативным экспресс-анализатором АССU-СНЕК АСТIVE.....	61
4.2. Абсорбционная фотометрия	63
Лабораторная работа. Определение содержания белка в сыворотке крови.....	64
4.3. Разделение фракций белков сыворотки крови.....	68
Лабораторная работа. Электрофоретическое разделение белков сыворотки крови на пленках из ацетата целлюлозы.....	69
4.4. Фотометрические методы. Турбидиметрия. Нефелометрия.....	71
Лабораторная работа. Тимоловая проба.....	71
4.5. Флуоресцентные методы.....	73
Лабораторная работа № 1. Определение содержания битирозина в плазме крови.....	74
Лабораторная работа № 2. Определение содержания окисленного триптофана в плазме крови.....	75
4.6. Фотометрические исследования по конечной точке.....	76

Лабораторная работа. Определение активности аланинаминотрансферазы в сыворотке крови.....	77
4.7. Автоматизированные биохимические исследования.....	82
Лабораторная работа № 1. Определение активности лактатдегидрогеназы кинетическим УФ-методом.....	82
Лабораторная работа № 2. Определение активности γ -глутамилтранспептидазы в сыворотке крови кинетическим методом.....	84
Лабораторная работа № 3. Определение активности креатинкиназы в сыворотке и плазме крови кинетическим УФ-методом.....	86
4.8. Сравнительный анализ эффективности методов	88
Лабораторная работа № 1. Определение содержания глюкозы в сыворотке крови.....	88
Лабораторная работа № 2. Определение активности α -амилазы сыворотки крови.....	91
Лабораторная работа № 3. Определение активности щелочной фосфатазы.....	95
4.9. Ферментативные методы определения содержания метаболитов.....	97
Лабораторная работа № 1. Определение содержания креатинина в сыворотке крови.....	97
Лабораторная работа № 2. Определение содержания холестерина в сыворотке крови.....	102
Лабораторная работа № 3. Определение содержания триацилглицеридов в сыворотке крови.....	106
Семинар. Биохимические исследования в медицине.....	108
Тестовые задания.....	110
Вопросы для подготовки к зачету.....	127
Ответы на тестовые задания.....	130
Рекомендуемая литература.....	132

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ	– антиген
АМФ	– аденозинмонофосфат
АТ	– антитело
АТФ	– аденозинтрифосфат
АХТ	– адъювантная химиотерапия
ГГТП	– γ -глутамилтранспептидаза
ИА	– индекс атерогенности
ИЛ	– интерлейкин
ИФА	– иммуноферментный анализ
КДЛ	– клиничко-диагностическая лаборатория
ЛДГ	– лактатдегидрогеназа
ЛПВП	– липопротеиды и высокой плотности
ЛПНП	– липопротеиды низкой плотности
ЛПОНП	– липопротеиды очень низкой плотности
НАДН	– никотинамидадениндинуклеотид восстановленный
НАДФ	– никотинамидадениндинуклеотидфосфат окисленный
НАДФН	– никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный
ОЦУ	– относительное центробежное ускорение или число g
ПОЛ	– перекисное окисление липидов
РИА	– радиоиммунный анализ
ТХУ	– трихлоруксусная кислота
ТБ	– техника безопасности
ФИТЦ	– флуоресцеинизотиоцианат
ФИФ2	– фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат
ФЛаза С	– фосфолипаза С
цАМФ	– циклический аденозинмонофосфат
цГМФ	– циклический гуанозинмонофосфат
ЦТФ	– цитидинтрифосфат
Е	– экстинкция (оптическая плотность) раствора
ELISA	– иммуноферментный анализ (enzyme linked immunosorbent assay)
K_i	– константа ингибирования фермента
K_m (K_m)	– константа Михаэлиса
V_{max}	– максимальная скорость ферментативной реакции
Y	– степень насыщения активных центров аллостерического белка по А. Хиллу

«Наша профессия находится на стыке фундаментальной науки и клинической медицины. Мы берем у науки знание и понимание и применяем их для сохранения хорошего здоровья и содействия постановке диагноза, правильному лечению и прогнозу».

M.G. McKwin, кафедра лабораторной
медицины колледжа Гамильтона,
Онтарио, Канада

ВВЕДЕНИЕ

Медицинская биохимия как учебная дисциплина включает в себя следующие разделы: принципы измерительных технологий; патохимия, диагностика; биохимия злокачественного роста.

Раздел «Принципы измерительных технологий» рассматривает теоретические основы и практическое применение методов изучения химического состава биологических объектов, знакомит студентов с методическими подходами, существующими в биохимии для работы с биологическим материалом в клинико-диагностической лаборатории. Изучение состава и структуры биомолекул и особенностей их обмена невозможно без использования сложных физико-химических методов и точных измерительных приборов. В этом плане разработаны физико-химические методы исследования: хроматография, электрофорез, спектрофотометрия.

В последние годы используются иммуноферментный и флуоресцентный анализ, масс-спектрометрия. В биохимических лабораториях широко представлены различные модели электрофотокolorиметров, спектрофотометров, флуориметров, а также аппаратов электрофореза, биохимических анализаторов. В пособии рассматриваются различные методы исследования с учетом их чувствительности и специфичности, что обеспечивает их адекватное применение.

В практической деятельности в области медицинской биохимии необходимо использовать унифицированные методы исследования биохимических показателей, знать правила работы с оборудованием и реактивами. При работе с современным оборудованием необходимо ориентироваться на критерии качества измерений: точность, погрешность, ошибку измерений, воспроизводимость, правильность, специфичность, чувствительность и диагностическую значимость лабораторных показателей.

ТЕМА 1. ЭТАПЫ ЛАБОРАТОРНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Информационный блок

Для биохимических анализов в клиничко-диагностических лабораториях чаще всего используют следующие биологические жидкости (биологический материал): цельную кровь, плазму или сыворотку крови, мочу. Точность биохимического анализа зависит от правильного отбора и условий хранения проб биологического материала.

Структура лабораторного исследования условно разделена на 3 этапа: преаналитический, аналитический, постаналитический. Это необходимо для стандартизации работы клиничко-диагностических лабораторий.

1.1. Преаналитический этап

Для получения результатов биохимического анализа, правильно отражающих происходящие в организме изменения, необходимо обеспечить соблюдение стандартных условий предлабораторного этапа. Основная цель – обеспечить стабильность компонентов биоматериала, взятых на исследование, и свести к минимуму влияние различных факторов, влияющих на полученный результат.

Части преаналитического этапа:

Внелабораторная: 1) составление заявки на лабораторное исследование и оформление бланка-направления; 2) подготовка пациента, основанная на знании биологических ритмов, особенностей проведения исследований и клинической интерференции – влияние лекарственных препаратов на результаты лабораторных исследований; 3) процедура взятия биологического материала для исследования; 4) хранение материала в процедурном кабинете и его доставка в лабораторию.

Внутрилабораторная: 1) регистрация и маркировка доставленного в лабораторию биоматериала; 2) пробоподготовка биоматериала к исследованиям (центрифугирование, аликвотирование, маркировка, доставка биоматериала на рабочие места).

Стандарты проведения преаналитического этапа

В соответствии с разделом ISO 15189 «Преаналитические процедуры» лаборатория обязана иметь разработанные:

- формы заявок на исследование;
- руководство по взятию и сбору проб;
- систему идентификации – описание прослеживаемости первичных и вторичных проб к определенному пациенту;
- систему слежения за транспортировкой образцов;

- записи о получении образцов;
- описание процесса приема срочных анализов;
- принципы выбраковки непригодных для анализа образцов.

В целом, клиническая лаборатория должна гарантировать выполнение «правильно и своевременно назначенного теста для нуждающегося в нем пациента».

По статистике от 56 % ошибок в лаборатории совершается на преаналитическом этапе. Ошибки на этом этапе неизбежно приводят к искажению результатов анализов. Помимо того, что лабораторные ошибки чреваты потерей времени и средств на проведение повторных исследований, их более серьезным следствием может стать неправильный диагноз и неправильное лечение. Правильности выполнения процедур преаналитического этапа следует уделять особое внимание, т. к. неправильно взятый биоматериал для исследования непригоден.

Подготовка пациента и взятие биоматериала

Врач должен обязательно объяснить пациенту необходимость лабораторных исследований и информировать пациента о том, как ему нужно подготовиться к исследованиям, провести устное инструктирование пациента или выдать памятки об особенностях назначенного ему исследования и соблюдении пациентом предписанного ему режима и правил сбора биоматериала (моча, кал и т. д.). Рекомендуется проводить биохимическое исследование до проведения рентгенографии, УЗИ, массажа, инструментального исследования, физиотерапевтических процедур.

Пациенту необходимо избегать физических нагрузок и изменения режима питания за 3 дня до исследования. За 2 часа воздержаться от курения; курение и прием алкоголя непосредственно перед исследованием исключаются. Соблюдать технику взятия венозной и капиллярной крови.

Оптимальные объемы пробы крови для взятия на лабораторные анализы:

- биохимические исследования: 4–5 мл крови (при использовании гепаринизированной плазмы – 3–4 мл);
- гематологические исследования (общий анализ крови): 2–3 мл крови с ЭДТА; коагулология: 2–3 мл цитратной крови;
- иммунологические исследования, включая белки, гормоны, онкомаркеры и т. д.: 1 мл цельной крови на 3–4 иммунологических анализа;
- СОЭ: 2–3 мл цитратной крови;
- газы крови: капиллярная кровь – 50 мкл; артериальная или венозная кровь – 1 мл гепаринизированной крови.

Правила взятия капиллярной крови

Капиллярная кровь собирается сотрудником лаборатории (фельдшером-лаборантом) в соответствии с инструкцией получения капиллярной крови, соблюдая правила асептики и антисептики. Стандартный прокол пальца должен проводиться при условии хорошего периферического кровообращения (согре-

тая рука, отсутствие грубых механических воздействий). Глубина прокола у взрослых 1,5 мм, у детей 1–1,5 мм.

Перед проколом кожа пальца пациента обрабатывается стерильным тампоном, смоченным 70 % спиртом. Кожа в месте прокола должна быть сухой, розовой и теплой, кровь – свободно вытекать из ранки. Нельзя давить на палец, так как при этом в кровь попадает тканевая жидкость. Кровь берут для анализа с помощью микропипетки, обычно предварительно смоченной антикоагулянтом. Кончиком микропипетки следует касаться каплей выступающей крови, избегая попадания в нее пузырьков воздуха. Взятую кровь хранят в холодильнике.

Правила взятия венозной крови

Взятие венозной крови осуществляет процедурная или дежурная медицинская сестра. Кровь забирается в вакуумные системы для взятия крови. Идентификация пациента и типа образца проводится, как правило, с помощью штрихкодирования. Время наложения жгута должно быть не более 1 мин; пациент не должен сжимать и разжимать пальцы. Не рекомендуется похлопывать ладонью по месту взятия крови с целью увеличения притока крови к нему.

Категорически запрещается забирать кровь шприцем и переливать в вакуумную систему для взятия крови в связи с опасностью возникновения гемолиза и активации факторов свертывания крови!

Вакуумные системы. Наиболее прогрессивным и современным методом получения венозной крови в настоящее время является использование вакутейнеров. Под действием вакуума кровь втягивается через иглу напрямую из вены в пробирку. Все вакуумные пробирки стерильные, предназначены для одноразового использования, выпускаются разных объемов и размеров от 1,8 до 10 мл. Объем пробы обеспечивается точно дозированным вакуумом, под действием которого кровь поступает в пробирку в процессе венопункции. Для обеспечения правильного соотношения кровь/антикоагулянт пробирка должна заполняться точно до указанного объема (+ 10 % от указанного на этикетке).

Процедура венопункции. На плечо накладывают «венозный» жгут. Тщательно обрабатывают кожу в месте взятия (обычно кубитальная вена на внутренней поверхности локтевого сгиба), 70 % этиловым спиртом или другим антисептическим раствором и пунктируют вену. Вставляют пробирку в держатель, и кровь под действием вакуума самостоятельно начнет набираться в пробирку. Тщательно дозированный уровень вакуума обеспечит получение необходимого объема крови и достижение точного соотношения кровь/антикоагулянт. Далее следует перемешать кровь в пробирке, плавно переворачивая пробирку до полного смешивания крови и наполнителя. Пробу нельзя трясти, чтобы избежать коагуляции и гемолиза.

Несмотря на то, что подготовку пациента и взятие материала на анализ, как правило, выполняет медицинская сестра, врач также несет ответственность за качество их проведения.

Антикоагулянты – это добавки, которые тормозят процесс свертывания крови и/или плазмы, что обеспечивает отсутствие существенных изменений исследуемых компонентов перед аналитическим процессом. Твердые или жидкие

антикоагулянты, находящиеся в вакуумных пробирках должны быть смешены с кровью немедленно после взятия проб крови.

В качестве антикоагулянтов могут быть использованы следующие вещества:

1. Этилендиаминтетраацетат (ЭДТА) связывает и эффективно удаляет ионы кальция, защищает клетки крови от разрушения. Его добавляют в кровь для выполнения гематологических исследований.
2. Гепарин (в виде натрий гепарина или калий гепарина) ингибирует превращение протромбина в тромбин. Его используют для получения плазмы крови для биохимических исследований.
3. Цитрат натрия связывает и эффективно удаляет ионы кальция. Его добавляют для получения плазмы необходимой для исследования процессов свертывания крови.
4. Оксалат натрия или оксалат аммония связывает и эффективно удаляет ионы кальция. Его добавляют (вместе с фторидом натрия) для получения крови и исследования в ней уровня глюкозы.
5. Фторид натрия предотвращает утилизацию глюкозы в крови после её сбора.

Кодирование пробирок

- Красный/белый – без добавок (сыворотка, клинико-химические исследования, серология).
- Зеленый – гепарин (плазма, клинико-химические исследования).
- Фиолетовый – ЭДТУК (плазма, гематологические исследования).
- Голубой – цитрат натрия (свертывающая система).
- Серый – фторид натрия (глюкоза, лактат).
- Желтый – кислота, цитрат, декстроза (для сохранения клеток).

Последовательность наполнения пробирок:

1. Кровь без добавок.
2. Кровь без гемокоагулянтов.
3. Кровь с цитратом.
4. Кровь с гепарином.
5. Кровь с ЭДТА.

Условия хранения материала

- Хранение до момента транспортировки – в холодильной камере (+4 °С – +8 °С).
- Доставка в лабораторию в день забора крови в сумках-холодильниках.
**Замораживание проб цельной крови с антикоагулянтом недопустимо!*

Правила подготовки пациента к исследованию мочи

- Сбор мочи осуществляется в стерильный контейнер.
- Перед сбором мочи необходимо провести тщательный туалет половых органов.
- Накануне сдачи анализа не рекомендуется употреблять овощи и фрукты, которые могут изменить цвет мочи.
- Не принимать диуретики.

Мочу чаще всего собирают в стеклянную или полиэтиленовую бутылку. Суточную мочу собирают порционно и хранят в холодильнике. Иногда анализируют отдельно ночную и дневную порции мочи. Бактериальные загрязнения обычно мало влияют на результаты исследования мочи, но если необходимо задержать рост микроорганизмов, то добавляют консервант, например, толуол. При определении ферментов целесообразно проводить анализ свежесобранной мочи.

Утренняя моча собирается в специальный контейнер для исследования мочи при свободном мочеиспускании (желательно, чтобы последнее мочеиспускание было не позже, чем в 2 часа ночи). Необходимо воздержаться от физических нагрузок, приема алкоголя и лекарственных веществ, особенно влияющих на цвет мочи (амидопирин, фуразолидон, ибупрофен, метронидазол и т. д.). Моча должна быть доставлена в лабораторию в течение одного часа.

Суточная моча собирается в течение 24 ч при обычном питьевом режиме. Утром в 6–8 ч пациент освобождает мочевой пузырь (эту порцию мочи выливают), а затем в течение суток собирает мочу в емкость. После завершения сбора мочи измеряется количество суточной мочи. Емкость перемешивают и переливают в контейнер для сбора мочи, который доставляется в лабораторию вместе с бланком-направлением. На бланке нужно указать суточный объем мочи (диурез) в миллилитрах. Если назначена проба Реберга (клиренс креатинина), отметить также рост и вес.

Суточную мочу используют для биохимических и иммунологических исследований. Все время сбора суточной мочи контейнер должен храниться в холодильнике при 4–8 °С. Доставка в лабораторию сразу по окончании сбора.

Транспортировка биологического материала

Требования к подготовке проб крови к транспортировке:

- Пробирки с красной/белой крышкой используются для биохимических, гормональных, серологических и иммунологических исследований сыворотки. При транспортировке таких пробирок необходимо дождаться полного свертывания крови в течение 60 минут при комнатной температуре (20–25 °С) и только потом центрифугировать.
- Пробирки с желтой крышкой содержат гель и применяются для биохимических, гормональных, серологических и иммунологических исследований сыворотки. Для их транспортировки необходимо дождаться полного свертывания крови в течение 30 минут при комнатной температуре (20–25 °С) и только потом центрифугировать.
- Пробирки с бледно голубой/зеленой крышкой используются для исследования системы гемостаза. Инкубировать их нет необходимости, поэтому сразу после взятия проб крови их центрифугируют.
- Пробирки с черной/розовато-лиловой крышкой для исследования СОЭ. Необходимым условием до их отправки в клиничко-диагностическую лабораторию (КДЛ) является хранение при комнатной температуре (20–25 °С).

- Пробирки с зеленой/оранжевой крышкой с гепарином используются для получения плазмы. Их также нет необходимости предварительно инкубировать. Центрифугирование таких пробирок осуществляют сразу после взятия проб крови.
- Пробирки с сиреневой/красной крышкой, которые необходимы для гематологического исследования, после взятия пробы крови следует поместить в холодильник (2–8°C).

Сроки транспортировки проб цельной крови и сроки их хранения совпадают при равных условиях. При транспортировке пробирки с образцами должны находиться строго в вертикальном положении. Для этого используются штативы, которые ставятся в специальные термоконтейнеры. При транспортировке контейнеры должны быть защищены от воздействия света (особенно яркого солнечного) и установлены вдали от нагревательных элементов. Действие света повышает активность щелочной фосфатазы и снижает уровень билирубина. Доставленный в лабораторию биологический материал должен быть немедленно передан специалистам лаборатории с указанием в журнале времени доставки проб. В таблице 1 представлены сроки доставки проб в клиничко-диагностическую лабораторию.

Таблица 1

Сроки доставки проб в клиничко-диагностическую лабораторию

Наименование исследования	Максимально допустимое время (с момента взятия крови)
Общеклиническое исследование крови	60 минут
Биохимия крови:	
– глюкоза	20 минут
– ферменты	30 минут
– К, Na, Cl	30 минут
Коагулологическое исследование	45 минут

Хранение биологического материала

Хранение биологического материала осуществляется в специальных холодильниках. Оптимальная температура хранения крови от +4 до +6 °С (30 дней). Допустимо хранение крови и при температуре от +8 до +12 °С, но в этих случаях срок годности сокращается соответственно на 5–10 суток.

Плазму и сыворотку при необходимости замораживают при -20 °С (возможна только однократная разморозка, поэтому необходимо разделение на порции).

Пробоподготовка

Лабораторная часть преаналитического этапа начинается с момента доставки пробы и заявки в лабораторию.

Выделяют следующие этапы: организация приема проб и заявок (регистрация проб пациента); идентификация проб, центрифугирование; при необходимости, хранение проб до анализа; выявление влияний (гемолиз, липемия) и примесей (метаболиты лекарств, загрязнения); распределение проб по рабочим местам, выполнение исследования.

Критерии для отказа в принятии лабораторией биоматериала на исследования

- Отсутствие маркировки на пробирке (фамилия, инициалы, отделение, номер палаты, дата взятия крови).
- Несоответствие маркировки бланка – направления и используемой пробирки.
- Неправильно заполненный бланк – направление (отсутствие сведений в некоторых графах).
- Несвоевременная доставка материала для плановых исследований в лабораторию.
- Несоблюдение сроков и условий хранения материала до момента доставки в лабораторию (замораживание, перегрев, утрата части материала при опрокидывании и т. д.).
- Взятый биоматериал находится в несоответствующей пробирке, т. е. материал взят не с тем антикоагулянтом, консервантом и т. д.
- Наличие сгустков в пробирках с антикоагулянтом.

Сотрудник лаборатории заносит информацию о причине отказа в выполнении исследования в журнал «Регистрация брака», информирует об этом лечащего врача по телефону и фиксирует это в бланке-направлении.

Обработка биологического материала

В зависимости от вида биохимического исследования полученный биологический материал обычно подвергают предварительной обработке.

Первый этап: центрифугирование, осуществляется непосредственно в лаборатории. На этапе подготовки материала решающую роль играют условия центрифугирования.

В лабораторной практике чаще всего применяют препаративное центрифугирование, основанное на различиях в скорости седиментации частиц, отличающихся друг от друга плотностью и размерами. Разделяемый материал (в лабораториях это чаще всего кровь) по мере увеличения скорости центробежного ускорения распределяется по плотности и размерам частиц вдоль пробирки. На дно пробирки осаждаются форменные элементы крови, в надосадочной жидкости – плазма или сыворотка крови.

Для разделения крови в лабораториях используют центрифуги общего назначения. Они обеспечивают центрифугирование со скоростью до

8000 об/мин, относительное центробежное ускорение до 6000 g. Отличаются друг от друга емкостью, рядом сменных роторов. Во всех центрифугах данного типа роторы жестко крепятся на вал привода, центрифужные пробирки должны быть вместе с находящимся в них биоматериалом тщательно уравновешены и различаться по весу не более чем на 0,25 г. При неполной загрузке ротора пробирки должны быть размещены симметрично, одна против другой. Таким образом обеспечивается равномерное распределение пробирок относительно оси вращения ротора. Например, мини-центрифуга СМ-6 со скоростью вращения ротора 1000, 1500, 2750 об/мин рассчитана на 12 пробирок в роторе, применяется для разделения растворов на фракции. Мини-центрифуга СМ-70 имеет счетчик определения гематокритного числа. Ее конический ротор рассчитан на 8 капилляров, помещаемых в съемные адаптеры. Система управления обеспечивает поддержание оборотов и автоматическое отключение через заданный интервал времени.

Требования к центрифугированию проб крови

Центрифугирование служит для отделения жидкой части крови от клеток. Перед проведением центрифугирования проверяют все ли вакуумные пробирки, стаканы для них, вкладыши одинаковы по весу, форме и величине. Это делается для того, чтобы «плечи» ротора центрифуги были уравновешены. Если количество крови в вакуумных пробирках разное, то подбирают одинаковые пары вакуумных пробирок и каждую из них устанавливают в симметричные противоположные гнезда ротора центрифуги. При необходимости соблюдения симметрии можно использовать пробирку с нужным количеством воды в противоположном гнезде.

Если центрифугирование выполнено с ошибками, то осаждение клеток будет неполным, объем плазмы или сыворотки, получаемой для анализа, уменьшится.

Центрифугирование с ошибками при использовании пробирок с гелем может быть, если количество об/мин меньше, чем необходимо. В этом случае гель не поднимется по стенкам пробирки и не будет выполнять роль разделительного элемента. Если при центрифугировании пробирок количество оборотов больше, чем необходимо, то это приводит к повреждению клеток крови и может исказить результаты анализа.

Номограмма

Условия центрифугирования должны определяться с учетом относительного центробежного ускорения (ОЦУ), времени и температуры центрифугирования.

Величину центробежного ускорения, действующего в области дна центрифугируемой пробирки, принято определять, как величину кратную ускорению свободного падения (g) и обычно обозначают ОЦУ (относительное центробежное ускорение или число g), которое можно рассчитать по формуле:

$$\text{ОЦУ} = 1,118 \cdot 10^{-5} \cdot r \cdot n^2,$$

где r – радиус (в см) от середины ротора до дна центрифугируемой пробирки на максимальном расстоянии от нее (при ее горизонтальном положении);

n – число оборотов ротора центрифуги в минуту (об/мин).

Пример расчета ОЦУ

Пусть радиус ротора центрифуги – 10 см, а предполагаемое число оборотов – 3 000 в минуту, тогда

$$\text{ОЦУ} = 1,118 \cdot 10^{-5} \cdot 10 \cdot 3\,000^2 = 1,118 \cdot 10^{-5} \cdot 10 \cdot 9\,000\,000 = 1,118 \cdot 900 = 1006,2 \text{ (g)}$$

Для удобства пользователя соотношение между числом оборотов центрифуги и относительным центробежным ускорением представляют в виде номограммы.

Для определения G соединяют прямой линией значения радиуса и скорости вращения ротора на крайних шкалах; точка пересечения этой прямой со средней шкалой дает искомую величину центробежного ускорения. Следует иметь в виду, что правая колонка цифр шкалы G соответствует правой колонке цифр шкалы скорости вращения ротора; левая – левой (рис. 1).

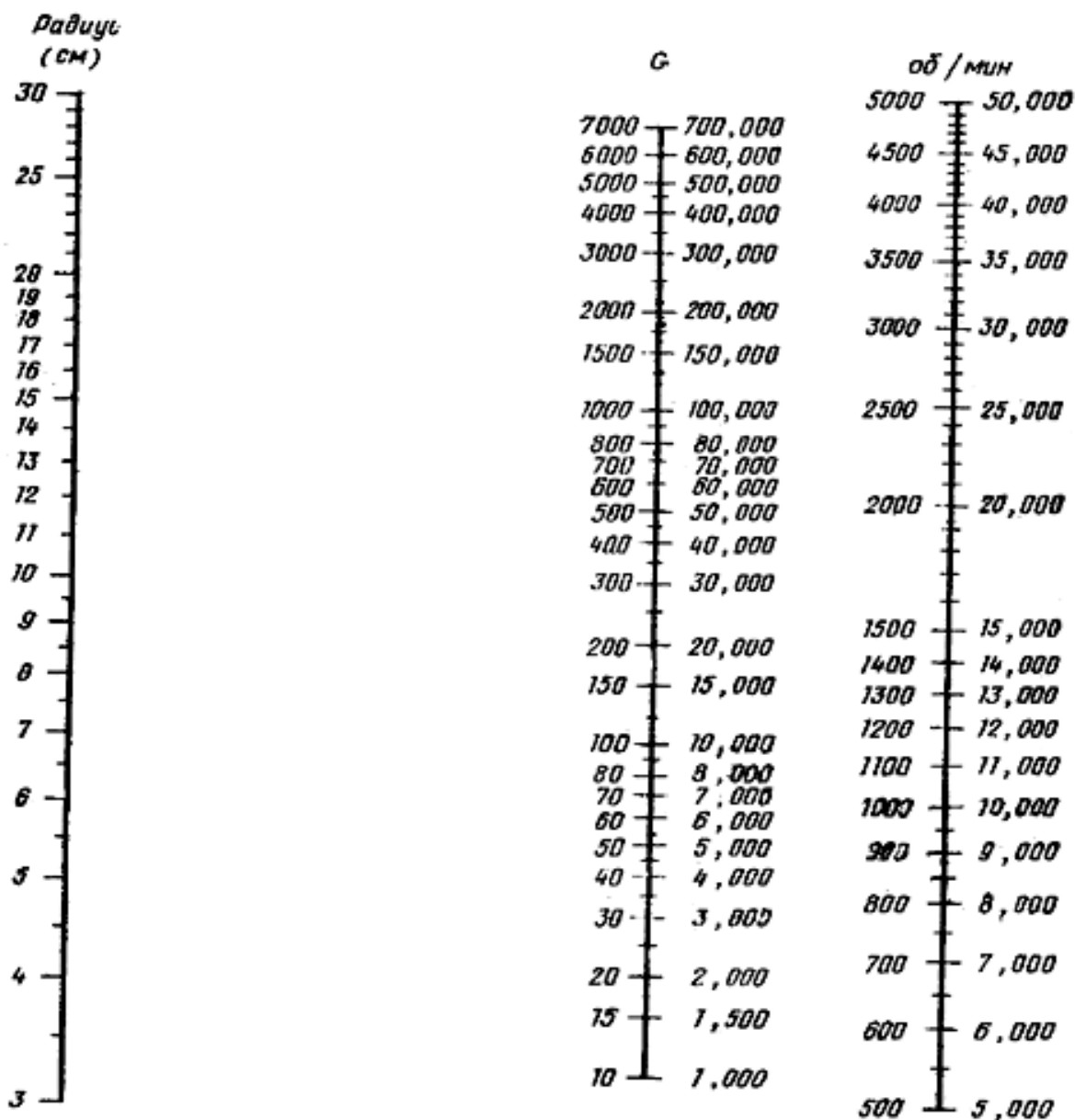
Средства подготовки проб

На качество проводимых в лаборатории исследований существенное влияние оказывает аккуратное и точное выполнение операций дозирования. Основными режимами дозирования являются: прямое дозирование, обратное дозирование, многократное дозирование, разведение. Лабораторные дозирующие устройства подразделяются на пипеточные, клапанные, перистальтические дозаторы.

Пипеточные дозаторы нашли самое широкое применение в работе клинико-диагностических лабораторий. Взятие дозируемой жидкости проводится в съемный наконечник. Для точности дозирования имеют значение материал, из которого изготовлен наконечник, и его форма.

По способу установки дозы используются дозаторы с фиксированным объемом дозы, дозаторы с регулируемыми переменными объемами; по количеству каналов дозирования: на одноканальные и многоканальные.

Особые виды дозаторов – специальные устройства, встроенные в автоматические анализаторы и робототехнические разливочные системы или дозирующие автоматы. Электронные дозаторы обладают более высокой точностью, чем механические. Это обеспечивается микропроцессорным управлением, жидкокристаллическим дисплеем, аккумуляторной батареей.



Номограмма для расчета числа оборотов по заданной величине g и величине g по заданному числу оборотов

В первом столбце цифр приведены величины радиуса ротора (от оси вращения ротора до основания центрифужного стакана или пробирки). Второй и третий столбцы — величины g . Четвертый и пятый столбцы — число оборотов в 1 мин. Пользуются номограммой следующим образом. Если, например, необходимо определить число оборотов по заданной величине g , то поступают так. Соединяют цифровое значение радиуса насадки (которое обычно дано в описании к центрифуге; в противном случае определяется самим экспериментатором) с цифровым значением величины g и в четвертой или пятой колонке (в зависимости от того, в какой колонке находится заданная величина g — во второй или в третьей) определяют количество оборотов, которое соответствует заданной величине g . Определение величины g по заданному числу оборотов проводят аналогичным образом.

Рис. 1. Номограмма для пересчета числа оборотов по величине g и величины g по числу оборотов

Получение плазмы крови

Плазма – это жидкая часть крови, лишенная форменных элементов. Если в вакуумную пробирку (вакутейнер) с пробой крови добавлен антикоагулянт, кровь остается жидкой и получаемая после центрифугирования жидкая часть, называется плазмой.

Венозную кровь смешивают в пробирке с антикоагулянтом, который предотвращает ее свертывание. В качестве антикоагулянта обычно используют 3,8 % раствор оксалата или цитрата натрия, который связывает ионы кальция в крови. Немедленно после взятия пробы перемешивают переворачиванием пробирок с кровью, закрытых крышками, не менее 5 раз. Перемешивание должно осуществляться без встряхивания и пенообразования. После уравнивания пробирок с кровью, их центрифугируют.

Получение сыворотки крови

Сыворотка – биологическая бесклеточная жидкость, не содержащая факторов свертывания крови и фибриногена. Для отделения сыворотки от клеток крови в пробе крови, взятой у пациента, вакуумную пробирку следует оставить при комнатной температуре на 30 мин.

Венозную кровь, полученную без антикоагулянтов, помещают в центрифужную стеклянную пробирку, отстаивают при комнатной температуре (15–20 °С) в течение 30 мин до полного образования сгустка. По окончании образования сгустка пробирку открывают и осторожно проводят тонкой стеклянной палочкой по внутренним стенкам пробирки для отделения столбика сгустка от стенок пробирки. Сыворотку отсасывают пипеткой и используют для анализа. Сыворотка отличается от плазмы тем, что в ней отсутствуют фибриноген и другие белки крови, участвующие в ее свертывании и вошедшие в сгусток.

Преимущества плазмы перед сывороткой: экономия времени (исключается ожидание свертывания крови, время центрифугирования может быть сокращено за счет увеличения скорости вращения ротора). Большой выход материала для исследования (из цельной крови может быть получено плазмы на 15–20 % больше, чем сыворотки). Практически отсутствует интерференция, связанная с последующим свертыванием (в сыворотке может произойти свертывание после центрифугирования, чего не происходит в плазме). Результаты исследования плазмы более точно отражают состояние *in vivo*, чем анализ сыворотки.

Недостатки плазмы по отношению к сыворотке. Картина разделения белков при электрофорезе будет изменена. Фибриноген появляется в виде пика в районе расположения гамма-глобулинов и может маскировать М-градиент. Антикоагулянты в качестве потенциальных комплексообразующих веществ и ингибиторов ферментов могут вызвать метод-зависимую интерференцию. Каждая новая методика должна быть изучена на предмет возможности интерференции антикоагулянта.

Плазма или сыворотка крови и другие биологические жидкости представляют собой смесь различных природных веществ, растворенных в водной сре-

де. При определении ферментов биологическую жидкость используют для исследования целиком, не подвергая какой-либо обработке. Лишь при высокой концентрации фермента в средах их перед определением разводят. В то же время присутствие ферментов часто мешает определению в биологических жидкостях тех веществ, превращение которых они катализируют. Поэтому полученный материал сразу обрабатывают реактивом, прекращающим действие ферментов и осаждающим как ферментные, так и любые другие белки. Для осаждения используют трихлоруксусную, хлорную, азотную, фосфорновольфрамовую, серную и другие кислоты или просто термическую обработку биологического материала.

Для работы в лаборатории необходимо знать специфические особенности анализа биологических проб, представленных в таблице 2.

Таблица 2

Характеристика биоматериала

Процедуры	Цельная кровь	Плазма	Сыворотка
Подготовка посуды	Обрабатывают антикоагулянтом	Должна быть сухая, чистая	Должна быть сухая, чистая
Использование специальных веществ	Антикоагулянты	Физиологический раствор, антикоагулянты	Нет
Отстаивание	Нет	30 мин	30-60 мин
Центрифугирование	Не используют	5 мин при 2000 об/мин	15 мин при 2000 об/мин
Условия хранения	Не хранят	3-7 сут при 0-4 °С 1-3 мес. при -20 °С	3-7 сут при 0-4 °С 1-3 мес. при -20°С
Исследование	В течение суток	В зависимости от исследуемого вещества и условий хранения – до 3-х мес.	В зависимости от исследуемого вещества и условий хранения – до 3-х мес.
Отличительные особенности	Можно исследовать все компоненты крови	Отсутствуют форменные элементы крови	Отсутствуют форменные элементы и факторы свертывания крови

1.2. Аналитический этап

Аналитический этап проходит непосредственно в лаборатории и состоит из следующих процедур: 1) подготовка анализаторов, реактивов, калибраторов к проведению исследований; 2) калибровка анализаторов; 3) проведение внутрилабораторного контроля качества; 4) непосредственно проведение исследований; 5) обработка полученных результатов, их регистрация; 6) написание заключения по результатам исследований.

На этом этапе важно:

- Правильно выбрать метод для исследования того или иного вещества. Важно чтобы метод был: чувствительным, специфичным, точным; воспроизводимым, обладал диагностической ценностью.
- Правильно подготовить оборудование, посуду и реактивы в соответствии с методикой.
- Точно выполнять исследование по методике.
- Правильно проводить расчеты и интерпретировать полученные результаты.

В последние годы в медицинской практике учреждений здравоохранения отмечается расширение спектра и объема выполнения клиничко-лабораторных исследований, что во многом обусловлено как повышением их диагностической значимости, так и совершенствованием методического обеспечения осуществления аналитических процедур.

Качество биохимических исследований

Оценка качества выполненных исследований позволяет предупредить и устранить возможные ошибки, повысить точность и диагностическую надежность результатов анализа. В современной лаборатории вклад аналитического этапа в количество ошибок минимален и составляет около 7 % от общего числа ошибок. Это связано с оснащением лаборатории высокоточными автоматическими анализаторами и современными аналитическими системами.

Для аналитического этапа существует система требований международных и отечественных стандартов, которая содержит оптимальные научно-обоснованные критерии выполнения анализов.

Стандартизация аналитического этапа

Рекомендации Международной организации стандартизации (ISO), национальные нормативные документы России (приказы МЗ РФ, Государственные стандарты в области лабораторной медицины) предусматривают стандарты и рекомендации по обеспечению качества всех этапов лабораторных исследований.

Для стандартизации качества медицинского обслуживания населения применяются:

- GLP надлежащая лабораторная практика.
- GCP надлежащая клиническая практика.

Стандарт GLP («Good Laboratory Practice», надлежащая лабораторная практика) – система норм, правил и указаний, направленных на обеспечение согласованности и достоверности результатов лабораторных исследований. Система является утвержденным национальным стандартом РФ с 1 марта 2010 года – ГОСТ Р-53434-2009. Главная задача GLP – обеспечить возможность полного прослеживания и восстановления всего хода исследования. Контроль качества призваны осуществлять специальные органы, периодически инспектирующие лаборатории по соблюдению нормативов GLP.

На аналитическом этапе качество результатов исследований зависит главным образом от организации работы внутри лаборатории и от функционирования системы внутрилабораторного и внешнего контроля качества. Контролируются: подготовка проб, дозирование, проведение реакции, учет продуктов реакции, возможность контаминации (перенос от пробы к пробе), расчет результатов. Основой элемент внутрилабораторной части аналитического этапа: проверка квалифицированным лабораторным специалистом результата анализа на предмет его достоверности, биологической вероятности или правдоподобия, сопоставление его с референсными интервалами.

Важной составляющей организации внутрилабораторного контроля качества служит выбор адекватного контрольного материала.

Контрольный материал – однородный стабильный материал, результаты исследования которого используют для оценки погрешности выполняемых аналитических измерений. Для контрольных измерений используют стандартные панели, изготовленные производственным путем как с исследованным, так и с неисследованным содержанием компонентов. Контрольный материал нельзя использовать одновременно в качестве калибровочного материала.

При внутрилабораторном контроле могут использоваться контрольные материалы с аттестованными и неаттестованными значениями контролируемых показателей. Аттестованным значением является значение измеряемой характеристики контрольного материала (концентрации вещества, ферментативной активности и т. п.), установленное при его аттестации и приводимое в паспорте на контрольный материал. Контрольные материалы с аттестованными значениями показателей используются для контроля правильности и воспроизводимости результатов лабораторного анализа, а с неаттестованными значениями – только для контроля воспроизводимости.

Для одного и того же показателя в документах на контрольный материал может быть указано несколько значений отдельно по каждому методу измерений. Эти значения могут существенно различаться друг от друга. Поэтому, следует иметь в виду, что контролировать правильность проведения анализа возможно только в том случае, если в паспорте к контрольному материалу приведены аттестованные значения для конкретного метода исследования.

Из требований, предъявляемых к контрольным материалам и работе с ними, необходимо выделить следующие: уровни исследуемых компонентов в контрольном материале должны соответствовать значениям показателей в нормальном и патологическом диапазоне. За нормальный принимается диапазон значений лабораторного показателя, соответствующий состоянию здоровья обследуемого, за патологический – диапазон, соответствующий состоянию болезни пациента.

Подготовка контрольного материала к исследованию проводится в соответствии с инструкцией производителя. Контрольные материалы должны исследоваться также, как пробы пациентов, т. е. в тех же аналитических сериях и условиях. При реконструкции лиофилизированных форм для уменьшения величины погрешности дозирования необходимо использовать один и тот же

поверенный дозатор. Допускается однократное замораживание и оттаивание реконструированного контрольного материала. Однократное оттаивание замороженного контрольного материала следует проводить при комнатной температуре в водной среде при 20–25 °С. Методика замораживания и оттаивания должна быть стандартизована для всех исследуемых показателей в соответствии с инструкцией производителя.

Для систематического оперативного слежения за стабильностью аналитической системы по результатам исследования контрольных проб используются контрольные карты.

Контрольная карта представляет собой систему координат, на оси абсцисс которой откладывают дни исследований, а на оси ординат контрольные пределы (кп).

Через ось ординат параллельно оси абсцисс проводят прямую, обозначающую среднюю арифметическую величину (X_{cp}), а вверх и вниз от этой прямой - параллельные линии, обозначающие контрольные пределы ($X_{cp} \pm 2\sigma$). По контрольным картам выявляют случайные и систематические ошибки (рис. 2).



Рис. 2. Примеры контрольных карт

Внешняя оценка качества – объективная проверка результатов лаборатории, осуществляемая периодически внешней организацией. Любая хорошо организованная система внешней оценки качества предназначена для сопоставления результатов анализов между лабораториями с целью гармонизации результатов лабораторных исследований. Целью внешней оценки качества исследований является оценка соответствия результатов исследований установленным нормам аналитической точности.

Врач клинической лабораторной диагностики в первую очередь отвечает за лабораторную часть, но должен следить и за внелабораторной частью этапа, так как это – одно из важнейших мероприятий обеспечения качества лабораторного анализа. Не следует забывать, что значительная часть этого этапа проходит вне лаборатории, поэтому один из самых эффективных способов устра-

нения ошибок – хороший контакт и совместная работа с врачами-клиницистами.

Стандарты качества – это ряд международных документов, разработанных техническим комитетом Международной организации по стандартизации (ISO) для гармонизации большого числа международных и национальных стандартов. Она устанавливает единые требования к качеству проектирования и производства продукции (услуг), а также сопутствующего сервиса. Рассмотрим следующие стандарты: ГОСТ ISO 15189(2012), ISO 15193(2002), ISO 53133(2008).

ISO 15189:2012 «Лаборатории медицинские. Требования к качеству и компетентности». Настоящий стандарт содержит руководство для достижения соответствия требованиям к компетентности и качеству для медицинских лабораторий. Представлены основные принципы создания и ведения систем менеджмента качества. Стандарт применим к вновь создаваемым и к действующим лабораториям, содержит управленческие и технические требования.

ISO 15193:2002. Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Измерение величин в пробах биологического происхождения. Описание референтных методик выполнения измерений. Настоящий стандарт устанавливает требования к описанию методики выполнения измерений. Стандарт применим для любого лица, органа или учреждения, работающего в одном из разделов лабораторной медицины, при разработке документа, который является референтной методикой выполнения измерений.

ГОСТ Р 53133.3-2008. Описание материалов для контроля качества клинических лабораторных исследований. Настоящий стандарт устанавливает требования к материалам, предназначенным для контроля качества клинических лабораторных исследований, выполняемых в клинико-диагностических лабораториях медицинских организаций всех форм собственности.

Условия проведения биохимического анализа

Унификация. Концентрацию анализируемого вещества определяют референсными методами, правильность которых устанавливается в специальных исследованиях. Для получения корректных результатов важно использовать унифицированные методики. Унифицированный метод отрабатывается экспериментально, в специальных лабораториях. Проводится *оптимизация* условий его определения, длительная проверка условий *воспроизводимости* методов. Унифицированные методики должны удовлетворять следующим критериям: 1) аналитическим; 2) медицинским; 3) технико-экономическим.

К *аналитическим* критериям относятся: специфичность, правильность, воспроизводимость, чувствительность. Преимущество должно отдаваться методу, имеющему наиболее высокие аналитические показатели.

Вторую группу критериев, имеющих *медицинский* характер, составляют: 1) диагностическая ценность; 2) длительность процесса анализа по отношению к допустимым срокам установления диагноза; 3) способ взятия материала: кровь из вены или пальца; 4) количество биологического материала.

Среди критериев *технико-экономического* характера выделяют: 1) расход рабочего времени на 1 анализ; 2) стоимость реактивов и доступность их широкому кругу практических лабораторий; 3) состав реактивов, их токсичность и канцерогенность для исследователя; 4) наличие аппаратуры и приборов для исследования; 5) достаточная квалификация исполнителя лабораторного исследования.

Применение унифицированных методов, проведение контроля качества значительно улучшает работу биохимической лаборатории, повышает информативность биохимического обследования в клинике.

Идеальный аналитический метод должен давать правильные, воспроизводимые и точные результаты, быть чувствительным и специфичным.

Критерии качества измерений: точность, погрешность, ошибка измерений, воспроизводимость, правильность, специфичность, чувствительность.

Точность отражает степень приближения результата анализа к истинному содержанию определяемого вещества. Высокая точность измерений соответствует малым погрешностям как систематическим, так и случайным. Обычно измерения проводят с точностью до десятых, сотых или тысячных долей единицы, затем цифры округляют. Полученные данные группируют – объединяют в относительно однородные группы (рис. 3).

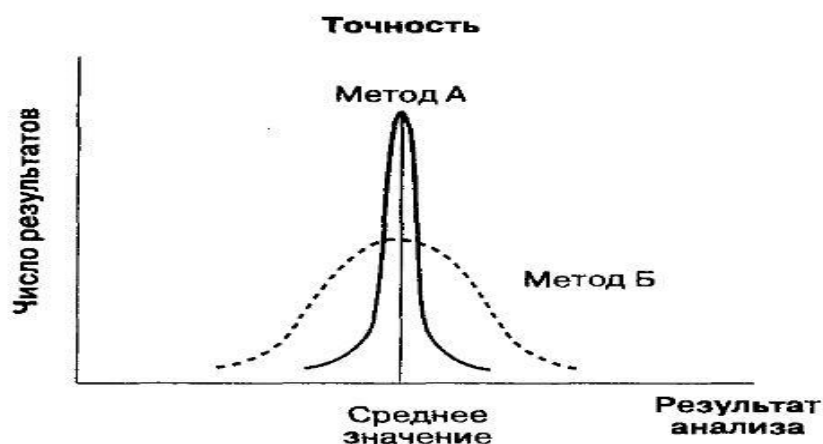


Рис. 3. В обоих случаях средние значения одинаковы, но разброс у метода А меньше, чем у метода Б, поэтому метод А более точен

Погрешность или ошибка – это разница между результатами измерений и действительно существующими значениями результата измеряемой величины. Ошибки могут возникать из-за неисправности и неточности измерительных приборов и инструментов (технические ошибки), личных качеств исследователя, его навыков и мастерства в работе (личные) и целого ряда других причин (случайные). Технические и личные ошибки являются систематическими, неслучайными, их можно преодолеть, совершенствуя технические средства, условия работы и личный опыт.

Систематическая погрешность, выраженная в относительных величинах, или относительная систематическая погрешность рассчитывается в процентах по формуле:

$$B = \frac{X_{cp} - X_i}{X_i} \times 100\% ,$$

где X_{cp} – среднее значение измерений контрольного материала;
 X_i – установленное значение.

Случайная погрешность – это ошибки одиночного значения. Наличие случайных ошибок выражается в том, что при повторном определении одного и того же материала получают не одинаковые, а различающиеся между собой результаты. Величина случайных ошибок является мерой воспроизводимости лабораторных показателей. Чем меньше случайных ошибок, тем лучше воспроизводимость данных.

Математически величина случайной погрешности выражается *среднеквадратическим отклонением* (S) и коэффициентом вариации (CV), которые рассчитываются следующим образом:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - X_{cp})^2}{n-1}} ,$$

где X_{cp} – среднее значение измерений контрольного материала;
 X_i – установленное значение;
 n – количество измерений.

Коэффициент вариации (CV):

$$CV = \frac{S}{X_{cp}} \times 100\% ,$$

где S – среднеквадратическое отклонение;
 X_{cp} – среднее значение измерений контрольного материала.

Правильность – соответствие среднего значения результатов повторных определений номинальной (должной) величине (рис. 4).

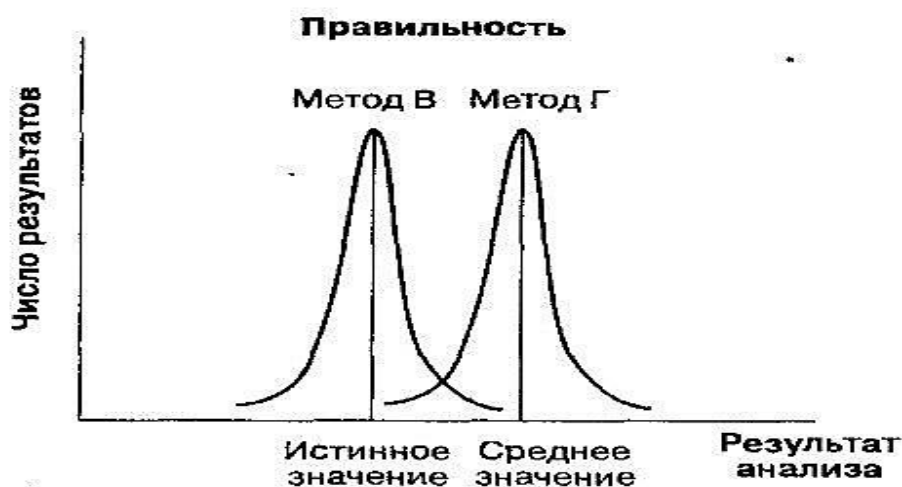


Рис. 4. Оба метода одинаково точны, но у метода Г среднее значение отличается от истинного. Оба метода одинаково точны, но метод В более правильный

Воспроизводимость – соответствие результатов повторного определения одной пробы. Определяется степенью разброса результатов. Воспроизводимость результатов достигается проведением повторных анализов одного и того же образца биологического материала или параллельные определения в серии экспериментов (не менее 20 различных образцов). После этого вычисляют величину стандартного отклонения полученных результатов повторных исследований от среднего содержания (рис. 5).

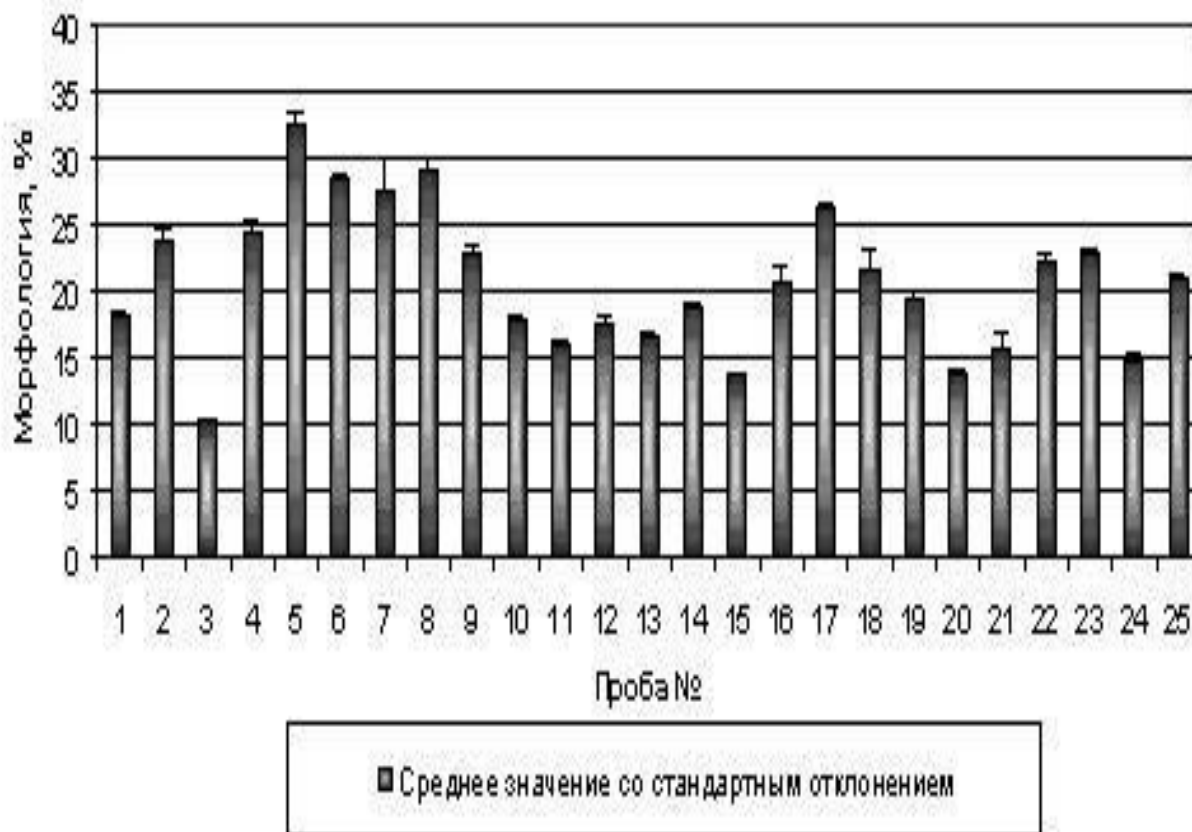


Рис. 5. Проверка воспроизводимости результатов

Чувствительность метода – наименьшее количество определяемого вещества, которое может быть установлено с достаточной достоверностью.

Аналитическая чувствительность – способность метода выявлять наименьшие различия между двумя концентрациями исследуемого вещества. Чувствительность метода можно увеличить изменением условий измерения, например, использованием микрокувет в спектрофотометрах и флуориметрах, а также применением более совершенных измерительных приборов. От чувствительности метода зависит и воспроизводимость результатов.

Аналитическая специфичность – способность метода измерять лишь тот компонент, для определения которого он предназначен.

Выбор метода исследования

Основное требование к методам исследований – это адекватность их к поставленной задаче. Обычно выбор метода соответствует следующим направлениям.

Целенаправленный поиск – по широкому кругу тестов, или по узкому набору тестов, связанный с факторами риска (ионизирующие излучения, химические факторы).

Скрининговые исследования – проведение стандартных биохимических исследований для выявления нарушений еще до клинического осмотра.

Диагностические исследования – для диагностики необходимо исследовать комплекс показателей, что позволит выделить форму патологии.

Используемые величины (норма)

При решении вопроса об отклонении биохимического параметра от нормы необходимо ориентироваться:

- на средний показатель,
- на референсные (справочные) показатели.

Средний показатель – это среднеарифметическое значение. Как правило, чем больше значений входит в выборку, тем более точным является средний показатель.

Референсные значения всех показателей каждая лаборатория определяет с учётом имеющегося оборудования, используемых методик и соответствующих калибровочных и контрольных материалов, а также справочных данных. Каждая лаборатория устанавливает свои диапазоны референтных значений в зависимости от используемой аппаратуры и метода анализа. Соответственно, выдавая результат, каждая лаборатория должна указывать в бланке результатов утверждённый в этой лаборатории референсный интервал.

Критические значения – это результаты анализов, которые выходят за границы нормы (табл. 3). Критические значения определяются при таком патофизиологическом состоянии, которое настолько отличается от нормального, что является жизнеугрожающим, если не принять соответствующих экстренных мер. Как и границы нормы, области критических значений определяются для условий каждой конкретной лаборатории.

Критический интервал (alert interval, critical interval): результат исследований для тревожных (критических) тестов, который указывает на непосредственный риск для пациента возникновения повреждения или смерти (табл. 3).

Таблица 3

Критические величины результатов лабораторных исследований,
требующие немедленных действий

Аналит	Критическая величина
Билирубин общий	> 300 мкмоль/л (новорожденные)
АЛТ АСТ Креатинин Мочевина	Более чем двукратное превышение верхнего референсного предела
Тропонин Т	> 0,1 нг/мл
КФК-МВ	> 6 % от активности общей креатинкиназы
Глюкоза	> 27,75 ммоль/л или < 2,22 ммоль/л
СРБ	> 100 мг/л
Амилаза панкреатическая	> 300 Ед/л
Калий	> 6 ммоль/л
Кальций	< 1,5 ммоль/л или > 3,2 ммоль/л
Белок в моче (у беременных)	> 0,3 г/л

Единицы измерения

Результаты биохимических исследований выражаются в *единицах СИ*. Основные единицы системы СИ – метр, килограмм, секунда, моль, литр. Содержание вещества, молекулярная масса которых известна, выражается величиной молярной концентрации. *Молярная концентрация* – это количество молей вещества, находящихся в литре раствора (моль/л). Для выражения активности ферментов в биологических жидкостях применяется размерность моль/с.л или в ткани в единицах удельной активности (Е или U) – мкмоль/мин·мг белка (табл. 4).

Таблица 4

Основные величины и единицы международной системы единиц

Основная величина	Основная единица	Обозначение единицы
Длина	метр	м
Масса	килограмм	кг
Время	секунда	с
Количество вещества	моль	моль
Объем	литр, кубический метр	л, м ³
Концентрация	моль/ л	моль/л
Активность фермента	моль/с.л	моль/с.л

В клинической лаборатории введение системы СИ связано с определенными трудностями нормирования методов исследования и трактовки результатов анализа. Поэтому международная федерация клинической химии предложила единицы наиболее приемлемые для использования и категорически запретила некоторые единицы. Имеются также рекомендации относительно сокращений. Так, например, следует писать:

1. Все обозначения единиц, а также символов химических элементов без точки, например, мин (а не мин.).
2. Обозначения единиц СИ, в основном, пишутся с маленькой буквы (л, с, моль). Нельзя использовать обозначения угловых мер ($^{\circ}$, $'$).

За последние годы мы привыкли ко многим изменениям: моль вместо мг%, Ед/л вместо ряда других размерностей для ферментов. Однако до сих пор встречается активность ферментов в единицах оптической плотности или в условных единицах. Рекомендуется строить калибровочный график и рассчитывать на единицу объема (л) или массы (г).

Результаты биохимического исследования часто выражают сочетанием единиц, например, концентрация моль/л, удельная активность фермента моль/с.л. При этом в обозначении не употребляют две косые черты. В тех случаях, когда молекулярная масса вещества не известна или не может быть определена (в смеси), результат определения нужно выражать в единицах измерения массы на литр (г/л, мг/л).

Единицей выражения активности ферментов является «катал» (кат), кат/л = моль/(с.л), мкат/л = ммоль/(с.л), мккат/л = мкмоль/(с.л). Иногда еще используют величину измерения активности ферментов МЕ/л = мкмоль/(мин.л).

Для перевода из одних единиц измерения в другие существуют коэффициенты пересчета, например: нкат/л = 0,06 мкмоль/(мин.л) или нкат/л = 0,06.МЕ/л; мкмоль/(мин.л) = 16,67·нкат/л.

Наряду с основными единицами в СИ входят и их производные, которые образуются из основных в соответствии с правилами СИ (табл. 5).

Таблица 5

Основные и производные единицы в СИ

Приставки	Обозначение	
	Русское	Международное
Мега	м	М
Кило	к	к
Гекто	г	h
Дека	да	da
Деци	д	d
Сантиметры	с	с
Милли	м	m
Микро	мк	mk
Нано	н	n
Пико	п	p

Существует следующая соразмерность:

- *Масса.* 1 кг = 1 000 г = 1 000 000 мг = 1 000 000 000 мкг
- *Объем.* 1 л = 10 дл (децилитр) = 100 сл (сантилитр) = 1000 мл = 1 000 000 мкл. Запомните: 1 мл = 1,028 см³
- *Количество вещества.* 1 моль = 1 000 ммоль = 1 000 000 мкмоль
- *Время.* 1 ч = 60 мин = 1800 с; 1 мин = 60 с

Построение калибровочного графика

Для определения количества вещества строится калибровочный график. Для этого готовят растворы вещества, например, белка известной концентрации (15–20 разведений) и измеряют на спектрофотометре при определенной длине волны. По полученным точкам строят калибровочную кривую. Раствор неизвестного вещества также измеряют на спектрофотометре. Полученную цифру сравнивают с калибровочной кривой, определяя по ней количество вещества в растворе.

Имеются приборы с компьютерными программами для определения концентрации растворов, в которых учитывается необходимая длина волны, объем или вес образца, время протекания реакции.

Требования к условиям построения калибровочного графика

1. Калибровочный раствор помимо стандартного вещества должен содержать все основные компоненты биологической жидкости, влияющие на интенсивность окраски определяемого вещества.
2. Навеска стандарта должна быть достаточно большой для уменьшения технической ошибки взвешивания.
3. Сначала готовят основной раствор; чем он концентрированнее, тем дольше в нём сохраняется стандартное вещество. Разведения стандартного вещества должны не только охватывать диапазон физиологических концентраций, но и выходить за пределы минимальных и максимальных величин. Так, содержание общего белка в норме составляет 65–85 г/л, а стандартные растворы готовят в диапазоне от 40 до 120 г/л.
5. Измерение оптической плотности начинают со стандартного раствора меньшей концентрации. Каждое разведение промеряют 3–5 раз в 3-х сериях. В целом одно разведение промеряют 6–12 раз. При построении калибровочной кривой учитываются средние значения.
6. По оси абсцисс (ось X) отмечают концентрации вещества в стандартных растворах, по оси ординат (ось Y) – величины полученных экстинкций. Графики строят не менее чем по 5 точкам: обычно 5–8 точек, различающихся по концентрации поглощающего вещества не более чем на 30 %. Кривая откладывается так, чтобы 3 из 5 точек легли на линию, а остальные располагались равномерно близ нее, отклоняясь в ту и другую сторону. Отдельные точки, значительно смещающиеся от калибровочной кривой, обычно являются результатом ошибки определения, поэтому их не учитывают (рис. 5).

7. Кривая проводится из точки начала координат под углом 45° , поэтому при необходимости применяется масштабирование. В правом верхнем углу указывают наименование кривой, метод, светофильтр, длину оптического пути кюветы (мм), дату построения. Экстинкция обычно должна быть в пределах 0,1–0,3 единиц абсорбции (максимум – до 0,7).

Пример построения калибровочной кривой

Нормальные значения определяемой величины составляют 60–80 г/л, калибровочные стандарты – 20, 40, 60, 80, 100, 120 г/л. Из каждого разведения стандарта выполняют исследование трех проб. Измеряют экстинкции каждого из растворов, содержащих одинаковое количество стандарта, полученные значения усредняют (если одно из трех значительно отклоняется, его не учитывают).

Масштаб калибровочного графика должен быть достаточно крупным – 20 см и более на каждой оси. Для того чтобы кривая располагалась под углом около 45° к осям, берут максимальные значения концентрации и абсорбции, если между ними в пределах этих значений сохраняется прямо пропорциональная зависимость. Например: максимальная концентрация калибровочного стандарта – 120 г/л, максимальное значение экстинкции – 0,6. На основании этих данных находят факторы калибровки по формулам:

$$C_{\max} / 20 = 120 / 20 = 6 \text{ г/л.}$$

$$E_{\max} / 20 = 0,6 / 20 = 0,03.$$

Полученные цифры – это «цена деления», соответствующая масштабу 1 см на осях концентрации (С) и экстинкции (Е). Для облегчения процедуры откладывания на оси ординат значений абсорбции стандартных и опытных проб рекомендуется разделить величину экстинкции на цену деления. Например: $0,2 / 0,03 = 6,67$. Полученное число показывает, на каком расстоянии от нулевой точки в см следует сделать отметку для восстановления из неё перпендикуляра: отмеряют отрезок в 6 см и 7 мм. Аналогично обчисляют остальные значения, размещая их на вертикальной и горизонтальной осях (рис. 6).

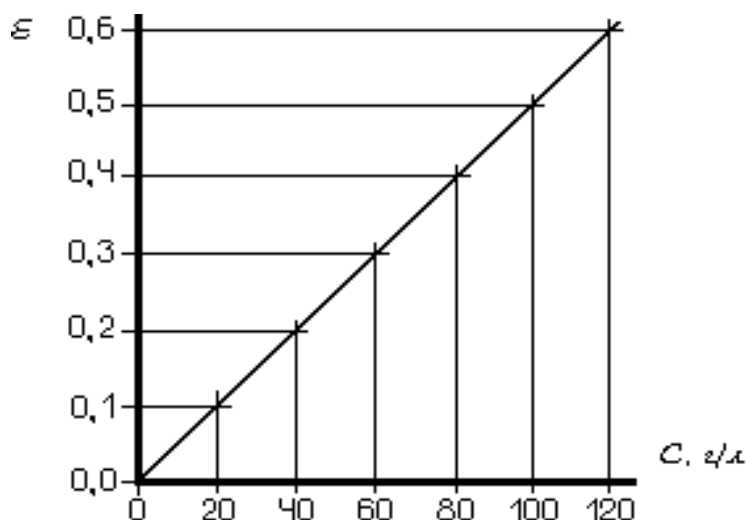


Рис. 6. Схематический вид калибровочной кривой

Необходимо помнить, что в дальнейшем условия обработки опытных проб должны быть аналогичны условиям, в которых выполнялись калибровочные пробы. Для построения графика должна использоваться та же методика и те же реактивы, что и для обработки биопроб. По калибровке нельзя определять результаты, полученные с помощью других методов и реактивов.

Расчёт концентрации вещества по отношению к стандартной пробе

Расчёт концентрации вещества по отношению к стандартной пробе является альтернативным методом вычисления содержания вещества в биологических пробах с использованием калибровочного графика. Этот способ расчёта менее точен, поскольку используется только одна калибровочная точка и, следовательно, увеличивается возможность получения ошибочных результатов.

Вычисление концентрации вещества с использованием молярного коэффициента экстинкции

Коэффициент молярной экстинкции обозначает экстинкцию 1 моль/л вещества в кювете толщиной 1 см. Молярные коэффициенты для многих хромофоров известны (табл. 6).

Таблица 6

Молярные коэффициенты экстинкции для некоторых хромофоров

Соединения	Длина волны, нм	ϵ , моль ⁻¹ · см ⁻¹ · л
Триптофан	280	$5,6 \times 10^3$
ДНК	260	$6,6 \times 10^3$
НАДН, НАДФН	340	$6,22 \times 10^3$
Аденин	260	$13,4 \times 10^3$
Гуанин	260	$7,2 \times 10^3$
Цитозин	260	$5,55 \times 10^3$
Тимин	260	$7,4 \times 10^3$
Триметиновый комплекс, образующийся при взаимодействии МДА и 2-тиобарбитуровой кислоты	532	$1,56 \times 10^5$
Пара-хлормеркурибензоат (п-ХМБ)	232	$1,69 \times 10^{-4}$
п-нитрофенол	405	$8,6 \times 10^3$

Расчет результатов измерений. Расчет результатов измерений производится в зависимости от типа реакции: расчет по конечной точке (расчет по стандарту, по фактору, дифференциальный метод), кинетический, псевдокинетический.

Расчет по конечной точке. Традиционными являются методы *конечной точки*, основанные на образовании окрашенных продуктов реакции. Примерами традиционных методов конечной точки являются определение уровня холестерина методом Илька, глюкозы – ортотолуидиновым методом, трансаминаз –

методом Райтмана–Френкеля и др. К недостаткам этого метода относят большую длительность времени реакции (от 10 до 40 мин), недостаточную точность определения биохимических параметров, невозможность проведения мероприятий по контролю качества исследований. Контрольные сыворотки, которые используют для проведения межлабораторного и внутрилабораторного контроля качества, как правило, не аттестованы по данным методикам.

При *калибровке по стандарту* выполняется замер оптической плотности реакционной смеси, где концентрация искомого вещества заведомо равна нулю (бланк). Затем, измеряется оптическая плотность реакционной смеси, где концентрация искомого вещества известна с высокой точностью (калибратор или стандарт). Калибратор обычно прилагается к набору реагентов. Получив эти величины, мы можем построить график, где на горизонтальной оси – концентрация, а по вертикальной – оптическая плотность. На графике, измеряя оптические плотности последующих образцов (исследуемых), можно высчитать концентрацию искомого вещества.

Расчет по фактору. В этом случае замеряется оптическая плотность бланка и по уже заданному фактору (который пропорционален углу наклона) производится измерение плотностей исследуемых образцов. При использовании этого метода готовятся две пробы – одна с неполной композицией реагентов (когда не происходит специфического окрашивания образца), вторая с полной композицией реагентов, когда специфическое окрашивание происходит. Разница оптических плотностей этих двух проб пропорциональна концентрации исследуемого вещества.

Кинетические методы измерения

Кинетические методы – это методы, когда изменения оптической плотности регистрируются во времени и измеряется скорость реакции, которая пропорциональна либо концентрации исследуемого вещества, либо активности ферментов.

Кинетический метод является более чувствительным, чем метод конечной точки, и позволяет раньше выявить патологические изменения. При использовании этого метода параметры определяют за 2–5 мин. На анализаторах регистрация происходит в автоматическом режиме, активность ферментов оценивают без калибровки. При использовании этого метода можно легко выявить возможные погрешности на аналитической стадии. В наборах реагентов для кинетических исследований, как правило, используют более чистые реактивы. Существует много аттестованных по этим методам контрольных сывороток, позволяющих контролировать качество исследований с использованием любой системы.

Псевдокинетические методы измерения (двухточечная кинетика)

Определяется скорость изменения оптической плотности по времени реакции, только здесь измеряется оптическая плотность в начале интервала измерения (после ЛАГ-фазы) и в конце.

Диагностическая значимость лабораторных показателей

Основными характеристиками любых лабораторных методов являются диагностическая чувствительность и диагностическая специфичность.

Диагностическая чувствительность – это показатель частоты получения положительных результатов у пациентов, имеющих данное заболевание, т. е. «истинно положительных» результатов (ИПР).

Стандартно чувствительность, равная 90 %, предполагает, что только 90 % больных будут на основании данного анализа признаны таковыми, а у 10 % результаты анализа будут ложноотрицательными.

Чувствительный тест (т. е. такой, который при наличии болезни обычно дает положительный результат) следует выбрать, если есть риск пропустить опасную, но излечимую болезнь – туберкулез, сифилис, лимфогранулематоз. Чувствительные тесты рекомендуются на ранних стадиях диагностического поиска для сужения его рамок, когда возможных вариантов много и диагностические тесты позволят исключить некоторые из них, т. е. сделать вывод, что эти заболевания маловероятны.

Чувствительность (Se) определяется по формулам:

$$1) \quad Se = \frac{TP}{D} \times 100\%$$

где TP – истинно положительные результаты исследования;
 D – количество всех заболевших.

$$2) \quad Se = \frac{TP}{TP + FN} \times 100\%$$

где TP – истинно положительные результаты;
 FN – ложноотрицательные результаты.

При изучении диагностической значимости необходимо произвести оценку точности теста, т. е. выбрать метод, заслуживающий доверия – так называемый «золотой стандарт» (или эталонный метод). В действительности «золотой стандарт» тоже нельзя считать абсолютным.

Диагностическая специфичность – это показатель частоты получения отрицательных результатов у лиц, не страдающих данной болезнью, т. е. «истинно отрицательных» результатов (ИОР).

Стандартно специфичность равная 90 %, означает, что 10 % лиц, не страдающих данным заболеванием, на основании результата анализа будут расценены как больные, т. е. у 10 % результаты анализа будут ложноположительными.

Специфичные тесты нужны для подтверждения (установления) диагноза, предложенного на основании других данных. Высокоспецифичный тест не должен дать положительный результат в отсутствие заболевания (т. е. редко бывает ложно-положительным). Такие тесты особенно необходимы, если ложноположительный результат может нанести пациенту вред физический, эмоциональный или финансовый.

Специфичность (Sp) определяется по формулам:

$$1) \quad Sp = \frac{TN}{D} \times 100\%$$

где TN — истинно отрицательные случаи;
 D — здоровые пациенты.

$$2) \quad Sp = \frac{TN}{TN + FP} \times 100\%$$

где TN — количество истинно отрицательных результатов;
 FP — количество ложноположительных результатов.

Факторы, влияющие на чувствительность и специфичность метода:

- 1) выбранный критерий отличия нормы от патологии;
- 2) диагностический метод, используемый в качестве «золотого стандарта»;
- 3) характеристика популяции, в которой применяется метод;
- 4) систематическая ошибка;
- 5) случайная ошибка.

Точность диагностического метода зависит: от самого метода, используемого оборудования, выбранного критерия патологии, популяции, в которой данный тест используется.

Прогностическая ценность метода

Задача, стоящая перед врачом, заключается в том, чтобы, зная результат теста, сделать вывод, болен человек или нет.

Вероятность наличия заболевания при условии известного результата теста называется *прогностической ценностью* (predictive value) теста. Зависит от чувствительности и специфичности.

Прогностическая ценность положительного результата — это вероятность заболевания при положительном (патологическом) результате диагностического исследования. Прогностическое значение положительного результата определяется как количество всех истинно положительных результатов (в %).

Прогностическая ценность отрицательного результата — вероятность отсутствия заболевания при отрицательном (нормальном) результате диагностического исследования. Прогностическое значение отрицательного результата определяется как количество всех истинно отрицательных результатов (в %).

Интерпретация результатов

Когда выполнены измерения биохимических параметров, результаты сравнивают с нормальными значениями. Для всех количественных тестов определены границы нормальных значений, что помогает оценивать результаты анализа пациента. Существуют физиологические факторы, которые могут влиять на границы нормы. К ним относятся: возраст пациента, его пол, наличие беременности, время дня, в которое брали пробу.

Полученные данные группируют и объединяют в относительно однородные группы, составляя статистические таблицы, статистические ряды – ряд числовых значений признака, расположенных в определенном порядке. *Вариационный ряд* или ряд распределения – это двойной ряд чисел, показывающий, каким образом числовые значения признака связаны с их повторяемостью в данной статистической совокупности.

Статистические исследования – комплексный и продолжительный процесс, который включает:

- Статистическое наблюдение – научно организованный и системный процесс сбора массивов данных о различных явлениях (получение достоверной информации для выявления закономерности развития явления/процессов).
- Сводка и группировка результатов наблюдения.
- Анализ полученной информации.

Нормальное распределение. Непрерывная случайная величина имеет нормальное распределение, если её плотность задается выражением:

$$f(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}}$$

График плотности нормального распределения имеет форму колокола. График называется нормальной кривой или кривой Гаусса (рис. 7).

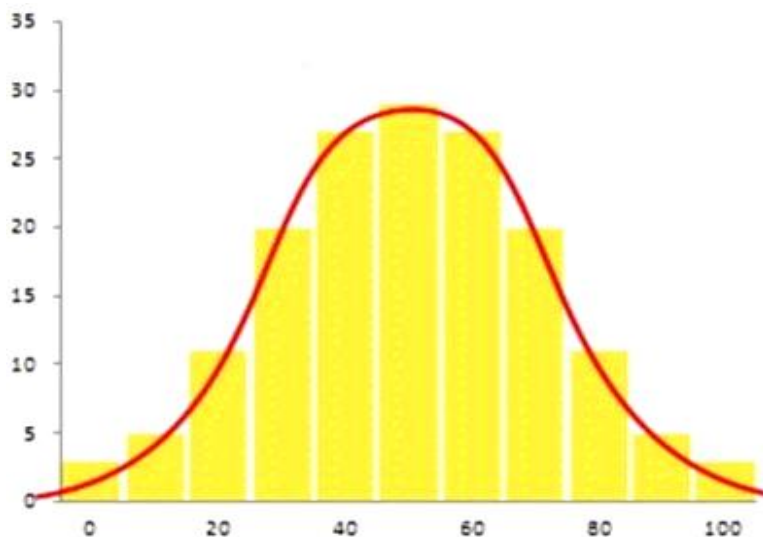


Рис. 7. Кривая Гаусса

Важную роль в анализе полученных результатов играет проверка на нормальность распределения результатов.

Проверка на нормальность распределения результатов. При проверке на нормальность используются критерии нормальности:

- Критерий χ^2 .
- Критерий Колмогорова–Смирнова.

Вычисляют:

1) выборочную среднюю:

$$\bar{x}_B = \frac{\sum_{i=1}^m x_i \cdot n_i}{n}$$

2) среднее квадратическое отклонение:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - X_{cp})^2}{n - 1}}$$

Правило трех сигм. Если случайная величина распределена нормально, то абсолютная величина ее отклонения от математического ожидания не превосходит утроенного среднего квадратического отклонения (рис. 8).

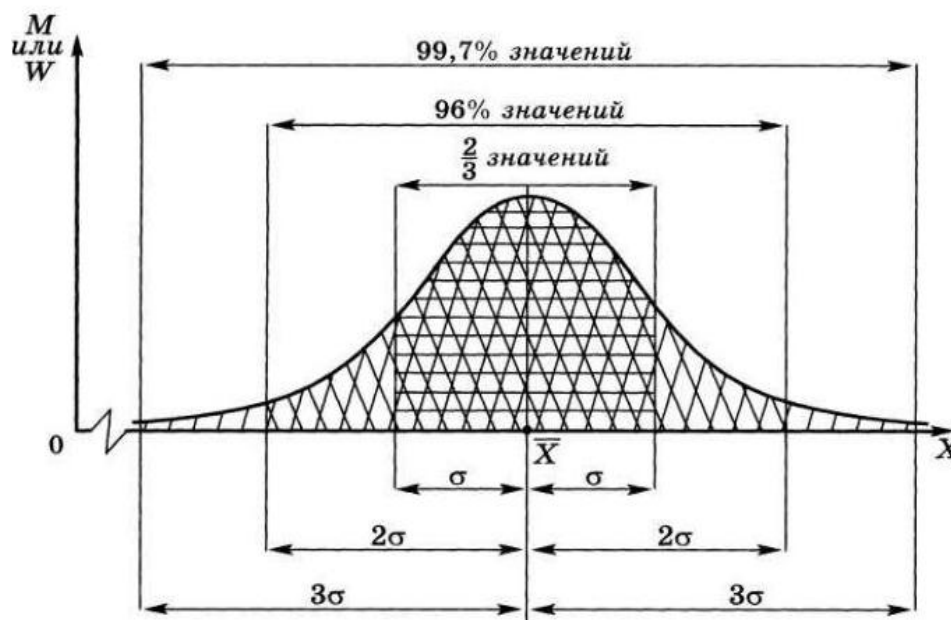


Рис. 8. Правило трех сигм

На практике правило трех сигм применяют следующим образом: если распределение изучаемой случайной величины неизвестно, но условие, указанное в приведенном правиле, выполняется, т. е. основание предполагать, что изучаемая величина распределена нормально; в противном случае она не распределена нормально.

Для оценки значимости различий результатов исследования используют параметрические и непараметрические критерии (табл. 7).

Статистические критерии

Параметрические	Непараметрические
Используются при расчете параметров распределения (среднее, дисперсия)	Опиерируют частотами и рангами
Соответствие эмпирического распределения нормальному распределению	Позволяют выявить различия в распределении признаков, оценить сдвиг значений исследуемого признака
t-Критерий Стьюдента, Фишера	Критерий Колмагорова–Смирнова, Пирсона, Уилкоксона

Оформление бланков анализа

Направление на анализы выдаются врачом в виде бланков. Он также даёт рекомендации и объясняет, как правильно сдать тот или иной анализ.

Существуют основные, клинические анализы, которые пациенту назначают при его первом обращении к врачу. Эти общеклинические анализы являются информативными (в основном крови и мочи).

Бланки анализов:

- на анализ крови – форма 224/у (рис. 9);
- гликемическая кривая после нагрузки глюкозой – форма 232/у;
- анализ крови (содержание глюкозы) – форма 231/у;
- биохимический анализ крови – форма 228/у.

В верхнем левом углу бланка приводится название медицинского учреждения и название или номер лаборатории, в которой проводится анализ. В центре бланка указывается порядковый номер анализа, ниже дата взятия биоматериала. Далее указывают фамилию, имя, отчество, сдающего кровь, его возраст. Таблица разделена на три колонки. В первой колонке перечислены показатели, по которым проводится анализ. Вторая колонка под названием «Результат» заполняется медработником от руки, куда вносятся количественные значения, полученные в результате анализа. В третьей колонке указаны показатели «нормы» для каждого показателя.

Для типографии!
при изготовлении документа
формат А3

Код формы по ОКУД _____
Код учреждения по ОКПО _____

Медицинская документация
форма № 224/у
Утверждена Минздравом СССР
04.10.80 г. № 1030

_____ наименование учреждения
Лаборатория _____

АНАЛИЗ КРОВИ № _____
"..." _____ 19 . . г.
дата взятия биоматериала

фамилия, И., О. _____
Возраст _____
Учреждение _____ Отделение _____ палата _____
Участок _____ медицинская карта № _____

Результат	Норма				
	Единицы СИ	Единицы, подлежащие замене			
Гемоглобин	М	130,0-160,0	г/л	13,0-16,0	г %
	Ж	120,0-140,0		12,0-14,0	
Эритроциты	М	4,0-5,0	10 ¹² /л	4,0-5,0	млн. в
	Ж	3,9-4,7		3,9-4,7	1 мм ³ (мкл)
Цветовой показатель		0,85-1,05		0,85-1,05	
Среднее содержание гемоглобина в 1 эритроците		30-35	пг	30-35	пг
Ретикулоциты		2-10	°/оо	2-10	°/оо
Тромбоциты		180,0-320,0	10 ⁹ /л	180,0 -	тыс. в
				320,0	1 мм ³ (мкл)
Лейкоциты		4,0-9,0	10 ⁹ /л	4,0-9,0	тыс. в 1 мм ³ (мкл)

Рис. 9. Образец оформления анализа крови

В нижнем левом углу приводится дата выдачи анализа и подпись того, кто провел анализ (рис. 10). Необходимо также отмечать возрастные и гендерные различия, обязательно приводить единицы измерения.

Бланк-заявка должна быть разработана руководителем лаборатории совместно с клиницистами. Главное требование к бланку-заявке одно – удобство работы с ними для клиницистов, медсестер и специалистов лаборатории.

Грамотно составленная и правильно заполненная форма бланка заявки, во-первых, упрощает процедуру назначения анализов врачом конкретному пациенту, во-вторых, сводит к минимуму вероятность ошибок вследствие «человеческого фактора».

МЕДИЦИНСКАЯ ДОКУМЕНТАЦИЯ
Форма № 224

наименование учреждения _____

Лаборатория _____

АНАЛИЗ КРОВИ № _____

"..." _____ г.
дата взятия биоматериала

Фамилия, И., О. _____ Возраст _____

Участок: _____ Медицинская карта № _____

		Результат	Норма
Гемоглобин	М		130,0-160,0 г/л
	Ж		120,0-140,0 г/л
Эритроциты	М		$4,0-5,0 \cdot 10^{12}/л$
	Ж		$3,9-4,7 \cdot 10^{12}/л$
Цветовой показатель			0,85-1,05
Среднее содержание гемоглобина в 1 эритроците			30-35 пг
Гематокрит	М		40-48%
	Ж		36-42%
Ретикулоциты			5-12%
Тромбоциты			$180,0-320,0 \cdot 10^9/л$
Лейкоциты			$4,0-9,0 \cdot 10^9/л$
И е й т р о ф и л ы	Миелоциты		-
	Метамиелоциты		-
	Палочкоядерные		1-6%
	Сегментоядерные		47-72%
Эозинофилы			0,5-5%
Базофилы			0-1%
Плазмоциты			1-3%
Моноциты			3-11%
Плазматические клетки			-
Скорость (реакция) оседания эритроцитов	М		2-10 мм/час
	Ж		2-15 мм/час

Морфология эритроцитов _____

Морфология лейкоцитов _____

"..." _____ г.
дата выдачи анализа


 **DATALIFE ENGINE**
SOFTNEWS MEDIA GROUP

Рис. 10. Оформление бланка анализа

1.3. Постаналитический этап

В постаналитический этап входит: доставка результатов исследования врачу, оценка результатов анализа.

Критерии качества постаналитического этапа

Как и преаналитический, постаналитический этап можно разделить на внутрилабораторную и внелабораторную части.

Основной элемент внутрилабораторной части постаналитического этапа – проверка квалифицированным лабораторным специалистом результата анализа на предмет его достоверности, биологической вероятности или правдоподобия, а также сопоставление его с референсными интервалами.

При наличии единой лабораторной информационной системы LIS передача данных с анализаторов осуществляется непосредственно в бланк авторизованного отчета, что значительно уменьшает процент ошибок постаналитического этапа.

Доказано, что последствия ошибок в лабораторной медицине составляют:

- 6 % пациентов получают неправильное лечение,
- 19 % пациентов назначаются ненужные дополнительные обследования.

Врач клинической лабораторной диагностики в первую очередь отвечает за лабораторную часть, но должен следить и за внелабораторной частью этапа, так как это одно из важнейших мероприятий обеспечения качества лабораторного анализа. Не следует забывать, что значительная часть этого этапа проходит вне лаборатории, поэтому один из самых эффективных способов устранения ошибок – хороший контакт и совместная работа с врачами-клиницистами.

Только при хорошей организации и качественном проведении всех стадий лабораторного исследования: преаналитической, аналитической и постаналитической можно рассчитывать, что каждый производимый лабораторией результат, может быть использован врачом для принятия диагностических решений или решений, изменяющих схему лечения.

Экспериментальный блок

СЕМИНАР

КАЧЕСТВО ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Вопросы для самоподготовки:

1. Правила взятия капиллярной, венозной крови, мочи для исследования. Получение плазмы, сыворотки крови. Условия хранения материала.
2. Характеристика средств измерений: диапазон, пределы измерений, нормальность значения, интерференция.
3. Критерии качества измерений: точность, погрешность, ошибка измерений, воспроизводимость, правильность, специфичность, чувствительность.

4. Способы оценки и расчет результатов биохимического исследования. Средний показатель, Референтные, рекомендуемые и критические значения.
5. Критерии качества преаналитического и аналитического этапов. Ошибки, допускаемые персоналом на этих этапах.
6. Стандартизация подходов к выполнению анализа, принципы добросовестной лабораторной практики.
7. Контроль качества: внешний и внутренний контроль качества, контрольные материалы.
8. Выполнение исследований на воспроизводимость (S , $\pm 1S$, $\pm 2S$, $\pm 3S$). Коэффициент вариации (CV). Контрольные карты.
9. Диагностическая значимость лабораторных показателей: диагностическая специфичность, диагностическая чувствительность, прогноз.
10. Статистические исследования, проверка на нормальность распределения результатов. Параметрические и непараметрические критерии.
11. Стандарты качества: ГОСТ ISO – 15189(2003), ISO – 15193(2002), ISO – 53133(2008).
12. Оформление бланка анализа.

Контрольные вопросы:

1. Правила взятия капиллярной, венозной крови, мочи для лабораторного исследования.
2. Наборы для исследований. Контрольные сыворотки.
3. Способы построения калибровочного графика и определения концентрации веществ.
4. Техника безопасности при работе с биологическим материалом.
5. Способы оценки и расчет результатов биохимического исследования. Средний показатель, референтные значения.
6. Международные и национальные стандарты контроля качества исследований.

Темы докладов, рефератов:

1. Качество лабораторных исследований.
2. Физико-химические методы исследования.
3. Иммуноферментные методы исследования в биохимии.
4. Биохимические исследования в клинко-диагностических лабораториях.
5. Унификация биохимических методик.
6. Стандартизация исследований.
7. Интерпретация лабораторных показателей.

ТЕМА 2. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Информационный блок

Автоматизация исследований

Одним из основных принципов работы современной лаборатории является автоматизация лабораторного процесса. Практикуемый еще сегодня ручной (мануальный) метод анализа базируется на непосредственном участии лаборанта в осуществлении всех основных этапов клинико-лабораторного исследования: взятии биологического материала, приготовлении реагентов, их смешивании, инкубации, регистрации аналитического сигнала, расчете концентрации определяемого вещества. При этом даже незначительные отклонения в условиях выполнения анализа, неизбежно возникающие при постановке большого количества проб, могут существенно повлиять на конечный результат лабораторного исследования.

Преимуществами современных автоматизированных анализаторов являются интеграция нескольких методов исследования, возможность проведения множества анализов из одной пробирки с использованием минимального объема образца, гарантия высокой точности исследования, автоматизированный контроль качества. Применение автоматизированных фотометров позволяет осуществлять измерения в следующих режимах: конечной точки, фиксированного времени, кинетики, дифференциальном и бихроматическом. Автоматизация фотометров, прежде всего, связана с использованием в них проточной кюветы, что исключает ошибки, обусловленные установкой кюветы в измерительный модуль. Кроме того, применение проточной кюветы позволяет экономнее расходовать реактивы, поскольку при толщине поглощающего слоя 1 см объем кюветы составляет до 100 мкл.

Наряду с одно- и двухканальными появились и многоканальные фотометры, позволяющие измерять одновременно большое количество проб, что существенно ускоряет процесс измерения. Если пробоотборник в автоматизированном устройстве отсутствует, прибор рассматривается не как полный биохимический автоанализатор, а как полуавтоанализатор, процесс эксплуатации которого требует постоянного участия оператора: при этом лаборант не может отойти от прибора. Практически все автоматические фотометры снабжены программой внутреннего контроля качества (автоматически сообщают о возникших неисправностях) и имеют выход на компьютер.

Технико-аналитические возможности биохимических автоанализаторов во многом зависят от заложенного в них «поточного» или «дискретного» принципов действия.

Согласно поточному принципу функционирования автоанализаторов, все химические реакции в процессе осуществления анализа проводятся в потоке

транспортируемых проб. Воспроизводимость результатов обеспечивается тем, что на каждый этап исследования всегда отводится один и тот же, строго определенный, промежуток времени. Результат анализа рассчитывается путем сопоставления показателей исследования опытной, контрольной и стандартной проб.

При дискретном принципе работы, из специального пробоотборника в реакционную емкость вносятся: анализируемая проба, разбавитель (при необходимости) и соответствующие реагенты. Смесь термостатируют, после чего измеряют оптическую плотность в видимой или ультрафиолетовой области. В дискретных автоанализаторах вместо центрифугирования и диализа (процедуры предварительного отделения белков в «мануальном» – ручном анализе) используется большое разбавление проб, при котором помехи от присутствия белков в большинстве реакций становятся ничтожно малыми.

В зависимости от конструктивных особенностей приборов и предоставляемых ими возможностей выполнения аналитических процедур все автоматизированные устройства могут быть подразделены на несколько основных классов.

1. Автоанализаторы, реализующие принцип «ВАТСН-системы», т. е. выполнения исследований «по тестам». Характерной их конструктивной особенностью является использование проточных кювет. Анализаторы этого типа предназначены для последовательного выполнения отдельных методик, представляют собой открытые системы.

2. Анализаторы селективные, обеспечивающие режим выполнения работы «по пациентам» – RANDOM. Позволяют выполнять исследование по различным биохимическим тестам путем взятия с помощью манипулятора аликвот одной и той же пробы биологического материала. Как правило, регистрация оптической плотности производится не в проточной, а отдельной реакционной кювете. Приборы этого типа допускают возможность проводить экспресс-анализы (в СТАТ-режиме: «внеочередного проведения анализа»).

3. Многофункциональные интеллектуальные системы. Предназначаются для использования в лабораториях крупных лечебно-профилактических учреждений, диагностических центрах, централизованных клинико-биохимических лабораториях, содержат ионоселективные блоки.

Все биохимические автоанализаторы имеют: программное обеспечение, достигаемое использованием современной компьютерной техники; систему контрольных функций, обеспечиваемую автоматизированным слежением компьютерного устройства за работой отдельных блоков прибора и выполнением программы контроля качества проводимых лабораторных исследований; систему автоматической пробоподготовки и дозирования.

Каждый из биохимических автоанализаторов характеризуется рядом технико-аналитических критериев. В их числе: спектр определяемых веществ: субстраты, ферменты, специфические белки, гормоны, электролиты, факторы свертывания крови, иммуноглобулины, чужеродные соединения (наркотики, лекарственные вещества) и др.

В зависимости от потенциальных возможностей приборов биохимические автоанализаторы подразделяют на:

1. Малые аналитические системы, обладающие производительностью примерно 100–120 анализов/ч.
2. Средние по производительности автоанализаторы (180–250 анализов/ч).
3. Современные большие многоканальные биохимические автоанализаторы, позволяющие выполнять 400–600–800 анализов/ч.

При решении вопроса о приобретении автоанализатора следует уяснить все необходимое об используемых реагентах (или тест-системах): они могут быть исключительно одной фирмы (фирмы-производителя) или любые, т. е. реагенты разных фирм, в том числе отечественных.

Следует обращать внимание на то, допускается ли прибором сортировка по тестам и по пациентам, каков тип измерительного блока, есть ли возможность выполнения одиночных, «срочных» исследований, пакетной обработки данных, а также на удобства перепрограммирования, осуществления статистической обработки результатов и других вычислений. При решении вопроса о приобретении прибора следует учесть наличие сервисного обслуживания.

Экспериментальный блок

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В ЛАБОРАТОРИИ. ПРАВИЛА РАБОТЫ С ЛАБОРАТОРНЫМ ОБОРУДОВАНИЕМ

Актуальность

Техника безопасности при работе в лаборатории

Правила по охране труда и техники безопасности (ТБ) направлены на предупреждение опасных и вредных производственных факторов, связанных с особенностями работы в лаборатории, основные из них следующие:

1. Химические факторы возникают при работе с реактивами.
2. Физические факторы возникают при работе с приборами и аппаратами.
3. Биологические факторы возникают при работе с инфицированным биологическим материалом.

В лаборатории нужно соблюдать следующие общие требования:

1. Работать только в спецодежде – халате, колпачке и сменной обуви.
2. Приступать к работе только после вводного инструктажа и первичного инструктажа на рабочем месте. Повторный инструктаж проводится не реже 1 раза в 6 месяцев.
3. Перед работой внимательно ознакомиться с методикой проведения анализа и в соответствии с этим подготовить свое рабочее место.
4. Перед работой следует убедиться в том, что:
– правильно уяснена методика,

- правильно подготовлены приборы и оборудование,
 - взятые вещества соответствуют методике анализа,
 - все расставлено так, чтобы было удобно достать, не вставая с места, и самое необходимое находится в пределах оптимальной рабочей зоны, соответствующей размаху согнутой в локтевом суставе руки.
5. Работать только на закрепленном месте.
 6. Рабочее место содержать в чистоте, не загромождать его не нужными предметами.
 7. Во время работы соблюдать тишину, порядок и чистоту.
 8. Не допускать торопливости, невнимательности, беспорядочности и неряшливости.
 9. Не покидать рабочее место во время проведения анализа, не оставлять без присмотра включенные приборы.
 10. Запрещается выполнять работы, не связанные с непосредственной работой в лаборатории.
 11. Соблюдать правила ТБ при работе с кислотами, щелочами, летучими и ядовитыми веществами, инфицированным материалом, нагревательными приборами.
 12. Соблюдать правила противопожарной безопасности.
 13. Не наклоняться близко над склянками с реактивами (правильно вдыхайте запахи!).
 14. Работать с реактивами только над столом.
 15. Пипетировать вещества только пипеткой с грушей или дозатором.
 16. Запрещено выливать вещества в канализацию, для этого предусмотрены специальные банки.
 17. Не пробовать на вкус в лаборатории любые вещества, даже если они кажутся вам знакомыми.
 18. В лаборатории запрещается принимать пищу!
 19. После работы обязательно вымыть руки с мылом!
 20. После работы убрать приборы и реактивы по местам, выключить электроприборы, закрыть форточки, краны водоснабжения и протереть рабочий стол.
 21. Уметь оказывать первую медицинскую помощь.

Цель работы:

Изучить правила техники безопасности при работе в биохимической лаборатории и научиться работать с биологическим материалом

Задания для самостоятельной работы:

1. Оформить протокол по правилам техники безопасности при работе в биохимической лаборатории.
2. Подготовить памятку пациенту для подготовки к лабораторному исследованию.

3. Оборудовать рабочее место для практической работы согласно методике работы.

Принцип работы:

Комплекс ориентирующих, управленческих, организационных и технических решений способствует максимальной безопасности при работе с биологическим материалом в условиях биохимической лаборатории.

Материал исследования: правила работы в биохимической лаборатории, правила работы с биологическим материалом.

Оборудование:

- спектрофотометр;
- ИФА-анализатор;
- биохимический анализатор;
- колориметр;
- центрифуга.

Проведение анализа:

1. Рассмотреть правила работы с биологическим материалом.
2. Изучить этапы лабораторных исследований.
3. Рассмотреть условия выбора оборудования для проведения работы

Ответить на вопросы:

1. Какой биологический материал можно использовать для биохимических исследований?
2. Чем отличается цельная кровь, сыворотка и плазма крови?
3. Правила приготовления и хранения растворов кислот, щелочей и солей.
4. Основные этапы лабораторных исследований. Какие ошибки возможны на каждом из них?
5. Основные измерительные приборы в лаборатории. Правила работы.
6. Правила хранения и транспортировки биологического материала.
7. Единицы измерения в лабораторной диагностике.

СЕМИНАР

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В БИОХИМИИ

Вопросы для самоподготовки:

1. Хроматография: базовый принцип метода по М. Цвету. Распределительная, проникающая, адсорбционная, ионообменная и аффинная виды хроматографии. Области применения.
2. Электрофорез. Физико-химическая основа метода. Диск-электрофорез. Области применения.

3. Абсорбционная спектроскопия в видимой и ультрафиолетовой областях спектра. Понятие о хромофорах, основном (S_0) и возбужденном (S_1) состояниях молекул. Фотометрия и спектрофотометрия. Области применения.
4. Основные законы светорассеивания. Нефелометрия и турбидиметрия. Области применения.
5. Флуоресценция, как частный случай люминесценции. Понятие о флуорофорах, основном (S_0) и двух возбужденных состояниях молекул (S_2 S_1). Области применения. Виды флуорофоров.
6. Флуоресцентная спектроскопия. Спектр флуоресценции и спектр возбуждения. Сдвиг Стокса. Правило Вавилова. Флуоресцентные красители и флуоресцентные зонды. Области применения.
7. Проточная цитометрия: основные блоки конструкции современного цитометра.
8. Физические и биологические характеристики клеточной суспензии, выявляемые методом проточной цитометрии. Области применения.
9. Люминесценция и хемилюминесценция. Физико-химические явления, лежащие в основе хемилюминесценции.
10. Хемилюминесценция, как основной метод изучения свободнорадикальных процессов в живых системах. Хемилюминометры.
11. Масс-спектрометрия в анализе химического строения биомолекул. Основные блоки конструкции масс-спектрометра.

Контрольные вопросы:

1. Сформулируйте базовый принцип метода хроматографии и назовите изобретателя хроматографии. Как в хроматографии соотносятся понятия «матрица», «сорбент», «элюент» и «стационарная и неподвижная фазы»?
2. Что в хроматографии характеризует коэффициент распределения (K_d)? Какие условия описывает K_d , когда он принимает значения: $K_d > 1$; K_d стремится к 0 и $K_d = 1$? Что характеризует коэффициент R_f и для решения каких задач его применяют на практике?
3. Назовите материалы носителей, используемых для аналитического электрофореза. Укажите их достоинства и недостатки. Охарактеризуйте материал для приготовления геля для диск-электрофореза? Преимущества диск-электрофореза и области его применения в биомедицинской аналитике?
4. Укажите причину того, что различные молекулы поглощают кванты светового потока со строго определенной энергией (длиной волны/частотой). Что называют «хромофором»? Что такое спектр поглощения вещества и почему этот спектр называют «молекулярным паспортом» вещества?
5. Перечислите достоинства абсорбционной спектроскопии в видимом и ультрафиолетовом диапазонах спектра и укажите области её применения.
6. Дайте определение явлению флуоресценции (вторичного светового потока) и объясните причины её появления. Что такое «флуорофор» и что характерно для химической структуры флуорофоров? Приведите примеры естественных и искусственных (синтетических) флуорофоров.

7. Укажите основные причины явления тушения флуоресценции. Соблюдение каких правил анализа позволит избежать ошибок при регистрации интенсивности флуоресценции?
8. Какие виды светорассеяния изучаемыми клетками наблюдают в проточном цитометре? Какую информацию об изучаемых клетках можно получить на основе измерения светорассеивания? Какие сведения о функциональном состоянии изучаемых клеток позволяет получить измерение их собственной флуоресценции и после предварительного окрашивания изучаемых клеток флуоресцентными красителями (флуорохромами)?
9. Назовите три типа биохимических реакций и участников этих реакций, которые лежат в основе существования собственной (сверхслабой) хемилюминесценции клеток и тканей. Укажите причины чрезвычайно низкой интенсивности собственной хемилюминесценции клеток и тканей.
10. Дайте определение метода масс-спектрометрии (масс-спектрометрического анализа). Какое открытие легло в основу изобретения метода? Опишите характер зависимости между кривизной (радиусом) траектории движения ионов в постоянном магнитном поле и величиной отношения массы иона к его заряду (m/z)?

Темы докладов, рефератов:

1. Хроматография, история изобретения метода, принцип хроматографии. Классификация методов хроматографии по принципу фракционирования. Применение метода в медико-биологических исследованиях.
2. Абсорбционная спектроскопия в ультрафиолетовой и видимой областях спектра, принцип метода, закон Ламберта–Бугера–Бэра, молярный коэффициент экстинкции. Применение метода в медико-биологических исследованиях.
3. Флуоресцентная спектроскопия, принцип метода, закон Вавилова и сдвиг Стокса, тушение флуоресценции. Флуоресцентные метки и зонды. Применение метода в медико-биологических исследованиях.
4. Масс-спектрометрия, история изобретения метода, принцип. Блок-схема устройства масс-спектрометра, наиболее распространенные методы ионизации пробы и конструкции блока анализаторов. Тандемная масс-спектрометрия, хромато-масс-спектрометрия. Применение метода в медико-биологических исследованиях.
5. Проточная цитометрия. История изобретения цитометра. Гидродинамические фокусирование, как метод формирования ламинарного потока изучаемых клеток. Оптические каналы проточного цитометра. Двумерные графики для отображения результатов цитометрического исследования клеток. Флуоресцентные красители для проточной цитометрии. Применение метода в медико-биологических исследованиях.

ТЕМА 3. ИММУННЫЕ И ИММУНОФЕРМЕНТНЫЕ МЕТОДЫ

Информационный блок

Методы иммунного анализа широко используются в медицинской практике с диагностической и аналитической целями. Иммунный анализ основывается на взаимодействии антигена (АГ) и антитела (АТ) с использованием различных вариантов мечения одного из компонентов (фермент, радионуклид, флуоресцентный краситель и другие). Оценка реакции проводится автоматически на специальной аппаратуре, что позволяет стандартизировать эти методы.

В зависимости от типа используемой метки и условий постановки теста иммунный анализ обозначается как иммуноферментный (ИФА), радиоиммунный (РИА), иммунофлуоресцентный и другие. При постановке реакций в один или несколько этапов они обозначаются как прямые или непрямые. Имеет значение среда, в которой проводится реакция. Если реакция проводится с реагентами, фиксированными на поверхности, то тест обозначается как твердофазный, например, ELISA (enzyme linked immunosorbent assay).

В основе иммуноферментного метода лежит специфическое «узнавание» анализируемого вещества специфическим к нему антителом. Использование ферментов в иммуноферментном анализе заключается в том, что молекула фермента, соединённая с антигеном или антителом, служит индикатором реакции антиген-антитело в среде. Измеряя активность фермента, можно оценить, сколько молекул антигена вступило в иммунохимическую реакцию с антителом.

Одним из путей визуализации образования комплекса антиген-антитело является использование меченых соединений, в которых метка может легко определяться в концентрациях, сопоставимых с определяемой концентрацией анализируемого вещества. В иммуноферментном анализе в качестве такой метки индикации используют ферменты: пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу из кишечника телят и *E.coli*. Возможность применения ферментов в качестве метки в иммунном анализе обусловлена, прежде всего, их высокой каталитической активностью, позволяющей с применением соответствующих субстратов регистрировать ферменты в растворе на уровне 10^{-15} М и ниже. Ферменты связаны ковалентно с антителами и при добавлении их в систему соответствующих субстратов (хромогенные субстраты) катализируют образование окрашенных продуктов. Среди хромогенных субстратов для пероксидазы наибольшее распространение получили о-фенилендиамин и 3,3',5,5'-тетраметилбензидин.

К настоящему времени разработано большое число различных вариантов проведения иммуноферментного анализа, имеющих как принципиальные отличия, так и второстепенные. Обычно методы иммуноферментного анализа различают по принципу проведения всех стадий анализа – с участием твердой фазы (гетерогенные методы) или же только в растворе (гомогенные методы).

Методы иммуноферментного анализа применимы для контроля лекарственной терапии, препаратов, влияющих на сердечно-сосудистую систему, антибиотиков, барбитуратов, кодеина, морфина. Эти методы позволяют выявлять наличие психотропных препаратов в организме, наркотиков. Иммуноферментный анализ используется в контроле биотехнологических процессов и качества лекарственных препаратов. Так, в микробиологических производствах иммуноферментный анализ может применяться для выявления высокоэффективных микроорганизмов – продуцентов биологически активных веществ (антибиотиков, ферментов и т. д.). Иммуноферментный анализ может также использоваться для контроля появления посторонних микроорганизмов, бактериофагов в ферментерах. Иммуноферментный анализ применим для определения содержания гормонов, белков и метаболитов (тиреотропный гормон, тироксин, тиреоглобулин, кортизол, прогестерон, тестостерон, фибронектин, α -фетопротеин, тропонин I, неоптерин, иммуноглобулины, фолиевая кислота, витамин B₁₂ и др.), для выявления возбудителей инфекций (хламидиоз, микоплазмоз, герпес, гепатиты А, В и С, кандидоз, цитомегаловирус, краснуха, сифилис, ВИЧ, и др.), паразитов (описторхоз, лямблиоз), а также для контроля лекарственной терапии (антибиотики, барбитураты, кодеин, морфин).

Экспериментальный блок

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1

ИММУНОФЕРМЕНТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ТРОПОНИНА I В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Актуальность

Тропонин представляет собой белковый комплекс, состоящий из 3 белков: тропонин I, тропонин T, тропонин C. Он входит в состав сократительной системы миоцита и выполняет функцию кальцийзависимого «переключателя» сокращения мышечного волокна. Известны три изоформы Тропонина I, одна из которых присутствует только в кардиомиоцитах, а две – в поперечно-полосатой мускулатуре. Кардиоспецифический тропонин I имеет молекулярную массу около 22,5 кДа, и структурно отличается от изоформ скелетных мышц (на N-терминальном конце имеет дополнительно 30 аминокислот).

Тропонин I является высокочувствительным и высокоспецифическим маркером повреждения миокарда. Выраженная, но кратковременная ишемия, не сопровождающаяся гибелью кардиомиоцитов, не приводит к повышению концентрации тропонина в крови. Некроз миокарда сопровождается поступлением тропонина в периферический кровоток. В этом случае концентрация тропонина I начинает возрастать в сыворотке крови через 4–6 часов от начала острого коронарного синдрома, достигает пика через 12–24 часа и возвращается к норме через 7–14 дней, что обуславливает значительное увеличение «диагностического окна» для выявления повреждения сердечной мышцы.

После успешного проведения тромболитического лечения наблюдается большой подъем уровня тропонина I по сравнению с пациентами со стойкой окклюзией коронарных артерий, обусловленный феноменом вымывания.

В комплексе с другими диагностическими методами количественное определение содержания тропонина в сыворотке крови человека может быть использовано для диагностики инфаркта миокарда, оценки реперфузии после применения тромболитической терапии, выделения групп высокого коронарного риска среди больных острым коронарным синдромом без подъема сегмента ST.

В комплексе с другими диагностическими методами количественное определение концентрации тропонина I в сыворотке крови человека используется не только для диагностики факта инфаркта миокарда и/или оценки эффективности реперфузии после применения тромболитической терапии, но и для все более важного в настоящее время выделения групп потенциально высокого коронарного риска среди больных острым коронарным синдромом и/или стенокардией высоких степеней выраженности (включая стенокардию нестабильную), особенно при отсутствии подъема сегмента ST на электрокардиограмме (ЭКГ).

Цель работы:

Научиться определять содержание тропонина I в сыворотке крови методом ИФА.

Задания для самостоятельной работы:

1. Подготовить реактивы.
2. Оборудовать рабочее место для лабораторной работы.
3. Выполнить лабораторную работу с использованием пробы сыворотки крови.
4. Сделать необходимые расчеты.
5. Заполнить бланк анализа. Оценить полученные результаты.
6. Сделать выводы по работе.
7. Ответить на дополнительные вопросы.

Принцип метода:

Метод основан на твердофазном иммуноферментном анализе и заключается в специфическом связывании моноклональных антител к тропонину I, адсорбированных на лунках иммунологического планшета, с последующим образованием конъюгата.

Материал исследования: сыворотка крови.

Реактивы:

- конъюгат моноклональных антител к тропонину I с пероксидазой хрена, раствор для разведения сывороток;
- фосфатно-солевой буферный раствор с твином;
- раствор тетраметибензидина;

- стоп-реагент;
- контрольный образец с известным содержанием тропонина I;
- калибровочные образцы, содержащие известные количества тропонина I.

Оборудование:

- ИФА-анализатор;
- вошер.

Проведение анализа:

1. Внесение образцов. Внести в дублях, начиная с верхних лунок первых двух стрипов по 100 мкл калибровочных образцов. В остальные лунки внести по 100 мкл контрольного образца и по 100 мкл анализируемых образцов сыворотки.
2. Внесение конъюгата моноклональных антител. Конъюгат готов к использованию. В лунки внести по 50 мкл конъюгата.
3. Инкубация. Стрипы заклеить пленкой и инкубировать при температуре 37 °С в течение 60 мин в термостатируемом шейкере с частотой 650 об/мин.
4. Промывка. По окончании инкубации снять липкую планку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть планшет 5 раз промывочным раствором, чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить не менее 350 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.
5. Внесение тетраметилбензидина (ТМБ). Раствор ТМБ готов к использованию. Внести во все лунки по 100 мкл ТМБ.
6. Инкубация. Стрипы заклеить пленкой и инкубировать в темноте при температуре 37 °С в течение 15 мин в термостатируемом шейкере с частотой 650 об/мин.
7. Внесение стоп-реагента. Внести во все лунки 100 мкл стоп-реагента с той же скоростью и с той же последовательностью, как и раствор ТМБ. Встряхнуть планшет на шейкере в течение 10–15 сек; при этом содержащее лунок окрашивается в желтый цвет.
8. Измерение. Измерить оптическую плотность на спектрофотометре, позволяющем проводить измерения оптической плотности в лунках планшета в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине сравнения в диапазоне 620–655 нм.

Референсные значения:

Концентрация тропонина I в сыворотке крови: 0–0,1 нг/мг; при инфаркте миокарда: более 0,1 нг/мг.

Ответить на вопросы:

1. Зависит ли возможность раннего выявления инфаркта миокарда от аналитической чувствительности тропониновых тестов?
2. Уточните, влияет ли отсутствие стандартизации высокочувствительных тестов на тропонин на результат исследования?
3. Каковы основные принципы измерения кардиальных тропонинов?
4. Каков подход к взятию крови при назначении данного исследования?
5. Объясните понятие «клиническая необходимость определения концентрации тропонина в крови».

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2

ИММУНОФЕРМЕНТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ С-РЕАКТИВНОГО БЕЛКА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Актуальность

С-реактивный белок (СРБ) – белок, состоящий из 5 идентичных, нековалентно связанных друг с другом кольцевых субъединиц. С-реактивный белок определяется в сыворотке крови при различных воспалительных и некротических процессах и является показателем острой фазы их течения. Свое название он получил из-за способности преципитировать С-полисахарид клеточной стенки пневмококка. Синтез С-реактивного белка как белка острой фазы происходит в печени под влиянием ИЛ-6 и других цитокинов.

С-реактивный белок усиливает подвижность лейкоцитов. Связываясь с Т-лимфоцитами, он влияет на их функциональную активность, инициируя реакции преципитации, агглютинации, фагоцитоза и связывания комплемента. В присутствии кальция С-реактивный белок связывает лиганды в полисахаридах микроорганизмов и вызывает их элиминацию.

Повышение концентрации С-реактивного белка в крови начинается в течение первых 4 ч от момента тканевого повреждения, достигает максимума через 24–72 ч и снижается в ходе реконвалесценции. Повышение концентрации С-реактивного белка – самый ранний признак инфекции, а эффективная терапия проявляется её снижением. С-реактивный белок отражает интенсивность воспалительного процесса, и контроль за ним важен для мониторинга этих заболеваний. Содержание С-реактивного белка при воспалительном процессе может повышаться в 20 раз и более. Концентрация С-реактивного белка в сыворотке крови выше 80–100 мг/л свидетельствует о бактериальной инфекции или системном васкулите. При активном ревматическом процессе повышение С-реактивного белка обнаруживают у большинства больных. Параллельно со снижением активности ревматического процесса уменьшается и содержание С-реактивного белка. Положительная реакция в неактивной фазе может быть обусловлена очаговой инфекцией (хронический тонзиллит).

Синтез С-реактивного белка усиливается при опухолях различных локализаций. Повышение концентрации С-реактивного белка в крови отмечают при раке лёгкого, предстательной железы, желудка, яичников и других опухолей.

Несмотря на свою неспецифичность, СРБ совместно с другими онкомаркёрами может служить тестом для оценки прогрессирования опухоли и рецидива заболевания.

Цель работы:

Научиться определять содержание С-реактивного белка в сыворотке крови методом ИФА.

Задания для самостоятельной работы:

1. Подготовить реактивы.
2. Оборудовать рабочее место для лабораторной работы.
3. Выполнить лабораторную работу с использованием пробы сыворотки крови.
4. Сделать необходимые расчеты.
5. Заполнить бланк анализа. Оценить полученные результаты.
6. Сделать выводы по работе.
7. Ответить на дополнительные вопросы.

Принцип метода:

Метод основан на твердофазном иммуноферментном анализе и заключается в специфическом связывании моноклональных антител к С-реактивному белку, адсорбированных на лунках иммунологического планшета, с последующим образованием конъюгата.

Материал исследования: сыворотка крови.

Реактивы:

- конъюгат моноклональных антител к С-реактивному белку с пероксидазой хрена, раствор для разведения сывороток;
- фосфатно-солевой буферный раствор с твином;
- раствор тетраметибензидаина;
- стоп-реагент;
- контрольный образец с известным содержанием С-реактивного белка;
- калибровочные образцы, содержащие известные количества С-реактивного белка.

Оборудование:

- ИФА-анализатор;
- вошер.

Проведение анализа:

1. Внесение образцов. Внести в дублях, начиная с верхних лунок первых двух стрипов по 100 мкл калибровочных образцов. В остальные лунки внести по 100 мкл контрольного образца и по 100 мкл анализируемых образцов сыворотки.

2. Внесение конъюгата моноклональных антител. Конъюгат готов к использованию. В лунки внести по 50 мкл конъюгата.
3. Инкубация. Стрипы заклеить пленкой и инкубировать при температуре 37 °С в течение 60 мин в термостатируемом шейкере с частотой 650 об/мин.
4. Промывка. По окончании инкубации снять липкую планку и поместить ее в сосуд с дезинфицирующим раствором. С помощью промывочного устройства промыть планшет 5 раз промывочным раствором, чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого стрипа. В каждую лунку вносить не менее 350 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.
5. Внесение тетраметилбензидина (ТМБ). Раствор ТМБ готов к использованию. Внести во все лунки по 100 мкл ТМБ.
6. Инкубация. Стрипы заклеить пленкой и инкубировать в темноте при температуре 37 °С в течение 15 мин в термостатируемом шейкере с частотой 650 об/мин.
7. Внесение стоп-реагента. Внести во все лунки 100 мкл стоп-реагента с той же скоростью и с той же последовательностью, как и раствор ТМБ. Встряхнуть планшет на шейкере в течение 10–15 сек; при этом содержимое лунок окрашивается в желтый цвет.
8. Измерение. Измерить оптическую плотность на спектрофотометре, позволяющем проводить измерения оптической плотности в лунках планшета в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине сравнения в диапазоне 620–655 нм.

Референсные значения:

Значение С-реактивного белка в сыворотке крови: 0–1 мг/л.

Ответить на вопросы:

1. Что понимают под определениями «белки острой фазы», «С-реактивный белок»?
2. Каковы основные показания к назначению исследования?
3. Объясните основной принцип метода определения С-реактивного белка.
4. Перечислите основные факторы, искажающие результат исследования.
5. Может ли клинический диагноз основываться на результатах отдельного теста или он должен согласовываться с результатами клинических и лабораторных данных?

СЕМИНАР

ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В БИОХИМИИ

Вопросы для самоподготовки:

1. Иммунохимические методы анализа. История открытия. Радиоиммунный метод анализа: принцип метода, применение.
2. Иммунодиффузный и иммуноэлектрофоретический методы исследования. Принцип методов, применение.
3. Иммуноферментный анализ. Принцип метода. Классификация: прямые, непрямые, конкурентные, неконкурентные, гомогенные, гетерогенные. Твердофазный иммуноферментный анализ.
4. Основные типы тест-систем в зависимости от используемых антигенов. Лизатные, рекомбинантные, пептидные. Преимущества и недостатки.
5. Этапы иммуноферментного анализа. Преаналитический (долабораторный), аналитический (доприборный), приборный и постаналитический этапы.
6. Оценка качества. Проведение внутрилабораторного контроля качества при проведении ИФА. Технические ошибки при постановке реакции. Подготовка биологических образцов для проведения ИФА.
7. Причины ложноположительных и ложноотрицательных результатов ИФА. Влияние системных заболеваний пациента. Синдром поликлональной активации.
8. Преимущества и недостатки ИФА. Сравнение с другими методами лабораторной диагностики. Разница между ПЦР и ИФА.
9. Применение ИФА в клинической лабораторной диагностике. Применение в клинической биохимии. Диагностика соматических и инфекционных заболеваний, исследование гормонального статуса, обследование на онкомаркеры.
10. Оборудование, необходимое для проведения ИФА. ИФА-анализатор, промыватель, шейкер. Выбор оборудования в зависимости от задач лаборатории. Автоматический и полуавтоматический анализатор.
11. Принцип метода Вестерн блоттинг. Стандартный протокол метода. Особенности методов Саузерн блоттинг, Истерн блоттинг, Нозерн блоттинг в отличие от метода Вестерн блоттинг.
12. «Твердая» фаза для иммуноблота, нироцеллюлоза, PVDF-мембраны. Основные принципы подготовки образца для иммуноблота, связь количества биологического материала с качеством иммуноблота.
13. Принципы SDS-гель электрофореза, электрофорез по Лэмми. Окрашивание гелей, обратимое, необратимое. Системы визуализации для Вестерн блоттинга, основные подходы для визуализации результатов иммуноблота.
14. Электроперенос белков на пористую мембрану (блоттинг), виды блоттинга. Применение метода Вестерн блоттинг в клинической лабораторной диагностике. Особенности применения антител в методе Вестерн блоттинг. Значение этапа блокирования, его виды.

Контрольные вопросы:

1. Иммунотурбидиметрический и иммуноферментный методы анализа.
2. Радиоиммунные методы исследования, история применения, характеристика метода.
3. Вестерн-блоттинг, основные этапы процесса.
4. Особенности визуализации результатов Вестерн блоттинга.
5. Применение Вестерн блоттинга для диагностики ВИЧ/СПИД, TORCH инфекций, боррелиоза.

Темы докладов, рефератов:

1. Применение иммунохимических методов исследования в клинической лабораторной диагностике.
2. Классификация иммуноферментных методов исследования, их преимущества и недостатки.
3. Основы безопасного применения радиоиммунного метода исследования в клинической лабораторной диагностике.
4. Саузерн и Нозерн блоттинг, особенности методов и их применение.
5. Оборудование для проведения Вестерн блоттинга.

ТЕМА 4. БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Информационный блок

Биохимические методы позволяют объективно оценить и охарактеризовать состав сложных биологических систем, какими являются биологические жидкости организма человека. В настоящее время в клинико-диагностических лабораториях используют наборы реактивов для определения биохимических показателей, основанных на различных аналитических принципах измерения.

Принципы измерений в клинико-диагностических лабораториях

В рутинной лабораторной практике для определения основных параметров клинической биохимии чаще всего используют спектрофотометрические способы определения. Среди применяемых с этой целью анализаторов можно выделить три группы:

1. Спектрофотометры.
2. Полуавтоматические биохимические анализаторы.
3. Полностью автоматизированные аналитические системы.

Спектрофотометры рассчитаны на регистрацию величины оптической плотности и производят элементарные математические операции с полученными величинами. Подготовку реагентов, смешивание и внесение образцов, распределение очередности тестов для всех этих анализаторов осуществляет врач-лаборант вручную, поэтому используемые при этом методики называют ручными, или мануальными. Полуавтоматические анализаторы также требуют вмешательства оператора. Врач-лаборант готовит пробы и смешивает реагенты. Стадии автоматизированы с момента введения реакционной смеси в анализатор.

Полностью автоматизированные биохимические анализаторы осуществляют дозирование реагентов, их смешивание и перенос реакционной смеси в зону анализатора автоматически. Контроль оператора необходим только на стадии программирования тестов и установлении регламента последовательности определения тех или иных параметров и количества анализируемых проб. Все биохимические автоанализаторы оснащены современным программным обеспечением, в них использована современная компьютерная техника, осуществляется контроль за работой отдельных блоков прибора и качества проводимых лабораторных исследований, автоматизированы пробоподготовка и дозирование.

Точность определения биохимических маркеров во многом зависит и от используемых реактивов. Наиболее удобными для использования являются жидкие, полностью готовые к применению диагностические наборы. Для этих реактивов характерны повышенная стабильность и длительный срок хранения.

Отсутствие стадии разведения (что необходимо для лиофилизированных реактивов) полностью исключает ошибки, связанные с использованием некачественной воды и погрешностями посуды, а также влиянием человеческого фактора. Благодаря использованию таких реактивов достигаются высокая точность и чувствительность методов.

Одним из достаточно информативных лабораторных тестов, широко используемых в настоящее время, является электрофорез белков биологических жидкостей (сыворотка крови, моча, спинномозговая жидкость и др.), который позволяет получить значительный объем диагностической информации. Принцип электрофоретического разделения молекул состоит в их движении с различной скоростью в постоянном электрическом поле. В клинической практике чаще всего используют электрофорез на поддерживающих средах-носителях – хроматографической бумаге, ацетатцеллюлозных мембранах, различных гелях, а также на комбинированных средах.

Электрофорез в агарозном, крахмальном и особенно в полиакриламидном геле дает существенно лучшие результаты, позволяя идентифицировать большее количество белковых фракций сыворотки (до 30). Применение мембран из ацетата целлюлозы позволяет повысить четкость фракционирования и значительно сократить время, необходимое для разделения, окраски и анализа.

Одним из самых современных и перспективных сепарационных методов на сегодняшний день является капиллярный электрофорез, вобравший в себя все лучшие качества хроматографических методов и электрофореза. Капиллярный электрофорез обеспечивает очень высокую эффективность разделения, поэтому метод широко применяют не только для выявления сходных по строению веществ (белков, пептидов, аминокислот, витаминов, наркотиков, красителей, ионов токсичных металлов, анионов), но и для идентификации лекарственных препаратов, при проведении клинических анализов, в криминалистике и судебной экспертизе. Уникальные системы полностью автоматического клинического капиллярного электрофореза дают возможность определять белковые фракции, специфические белки, иммуноглобулины, а также проводить скрининг наличия моноклональных компонентов в сыворотке крови и моче.

Основы тактики биохимических исследований

При биохимических исследованиях следует соблюдать следующую тактику обследования пациента:

Лабораторные тесты, назначаемые пациенту, должны соответствовать основной клинической цели обследования:

- Профилактика – выявление ранее не наблюдавшегося отклонения от нормы.
- Диагностика или дифференциально-диагностическое обследование – установление диагноза.
- Контроль за эффективностью лечения – мониторинг.
- Прогностическое обследование, диспансерное наблюдение – оценка степени выздоровления и восстановления нарушенных болезнью функций.

Цель исследования должна определять набор, комбинацию и частоту назначения тестов.

Поиск ранее не наблюдавшейся патологии может проводиться как «вслепую», по широкому кругу тестов, так и направленно, по узкому набору тестов. Иногда в стационарах используют так называемый «вступительный скрининг», т. е. проведение каждому поступающему пациенту еще до осмотра лечащего врача заранее отобранного и установленного стандартного набора биохимических тестов.

Лабораторные тесты должны назначаться с учетом их диагностической ценности на различных стадиях заболевания (скрытое течение, острая фаза, криз) и возможностей наблюдения за течением болезни. Целесообразнее назначать биохимические тесты для дифференциальной диагностики заболевания (набор тестов, которые способны отличить данное заболевание от ряда других похожих) в комплексе, которые выполняются одновременно. Нагрузочные тесты (функциональные и фармакологические пробы) помогают выявлять скрытые и неявные изменения биохимических параметров, резервные возможности систем, чем исследования в состоянии покоя. Назначать нагрузочные тесты, нужно учитывая состояние больного и возможные отрицательные эффекты пробы.

При биохимическом контроле за результатами лечения следует учитывать возможные влияния других лечебных воздействий, а также диагностических мероприятий.

Скрининговые исследования

Скрининг (от англ. screening отбор, сортировка) – это вид исследования, целью которого является раннее выявление заболеваний. Он позволяет обеспечить:

- раннее начало лечения,
- облегчение состояния пациентов,
- снижение смертности.

Скрининговые исследования должны обладать достаточной чувствительностью и специфичностью. При скрининге анализы применяют для выявления заболевания у людей, которые по внешним признакам здоровы. С этой целью проводят определение биохимических профилей у стационарных больных, профессиональные медосмотры, состояние здоровья пожилых людей; доклинические исследования; выявление группы риска; профилактические осмотры; индивидуальный контроль заболевания.

Определение биохимических профилей у стационарных больных проводят в рамках общего и расширенного скрининга (табл. 8).

Общий и расширенный скрининг

Биохимические тесты общего скрининга	Границы референсных величин	Средние значения, (X±δ)	Дополнительные тесты расширенного скрининга
Глюкоза (ммоль/л)	3,3–5,5	4,3±0,7	Сахарный профиль, нагрузка глюкозой
Мочевина (ммоль/л)	2,5–7,5	5,8±1,7	
Общий белок (г/л)	65–85	75,0±10,0	Креатинин, мочевая кислота, электролиты
Альбумин (г/л)	30,6–52,0	40,0±6,0	Креатинин, мочевая кислота, электролиты
Билирубин (мкмоль/л)	4,0–20,5	14,5±3,0	Белковые фракции
АЛТ (Е/л)	5,0–45,0	25,8±9,6	Прямой билирубин, АСТ, ЛДГ, ГГТП
ЩФ (Е/л)	13,1–3,5	33,3±10,1	Прямой билирубин, АСТ, ЛДГ, ГГТП

Экспериментальный блок**4.1. Прямое определение метаболитов в крови**

В настоящее время не все анализы необходимо выполнять в центральной лаборатории. Существуют индикаторы для исследования проб крови и мочи непосредственно в клинике или в домашних условиях. С их помощью можно определять разнообразные субстраты: глюкоза, белок, билирубин, кетоновые тела, нитриты (свидетельствующие о наличии инфекции в мочеполовых путях).

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА**ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ГЛЮКОЗЫ В КРОВИ
ПОРТАТИВНЫМ ЭКСПРЕСС-АНАЛИЗАТОРОМ ACCU-CHEK ACTIVE***Актуальность*

Основное назначение прибора Accu-Chek Active – индивидуальное использование с целью определения уровня глюкозы в крови. Прибор позволяет работать в двух режимах: в режиме нанесения капли крови на тест-полоску, находящуюся в приборе, и вне прибора. Последнее возможно в диагностических, лечебно-профилактических учреждениях, службах скорой помощи. Несомненным достоинством экспресс-метода является минимальный объем крови. Для проведения измерения требуется капля крови в объеме 2 мкл.

Цель работы:

Научиться определять содержание глюкозы в капле крови экспресс-методом.

Задания для самостоятельной работы:

1. Ознакомиться с инструкцией определения содержания глюкозы в крови с помощью портативного глюкометра.
2. Подготовить глюкометр и прибор для взятия крови.
3. Выполнить лабораторную работу с использованием портативного оборудования.
4. Оценить полученные результаты.

Проведение анализа:

В режиме нанесения капли крови на тест-полоску, находящуюся в приборе

1. Вымойте теплой водой и вытрите насухо руки.
2. Извлеките тест-полоску из флакона с тест-полосками.
3. Держите тест-полоску таким образом, чтобы стрелочки были направлены от себя, а тестовое поле вверх. Вставьте тест-полоску в направляющее поле до тех пор, пока не услышите легкий щелчок. Установка тест-полоски автоматически запускает режим измерения на приборе через 1–2 мин.
4. Проверьте номер кода, который напечатан на флаконе с тест-полосками. Мигающий символ капли крови означает, что Вам следует нанести каплю крови на тест-полоску (в течение 2 мин).
5. Если Вы решили наносить каплю крови на тест-полоску, находящуюся в приборе, поступайте следующим образом: помассируйте кончик пальца, чтобы усилить кровообращение и облегчить получение капли крови. Используйте устройство, чтобы проколоть боковую поверхность пальца. Без сильного сдавливания позвольте образоваться маленькой капле крови.
6. Нанесите каплю крови в центр оранжевого квадратного тестового поля. Можно прикоснуться к тестовому полю, но не следует размазывать каплю крови. Если капли крови недостаточно для проведения анализа, то можно нанести вторую каплю крови в течение 5 с. Звуковой сигнал будет означать, что прибор Акку-чек Актив начинает проведение измерения. Символ песочных часов покажет, что идет измерение. Через 5 с прибор снова подаст звуковой сигнал, на дисплее появится результат.
7. Прибор Акку-Чек Актив измеряет уровень глюкозы в пределах 0,6–33,3 ммоль/л.
8. Далее необходимо провести проверку в течение 30–60 с после того, как была нанесена капля крови. Для этого, переверните тест-полоску, чтобы увидеть круглое контрольное окошко. Окраска этого окна должна соответствовать значению на цветовой шкале, напечатанной на этикетке флакона с тест-полосками, и показанию прибора.

В режиме нанесения капли крови вне прибора

1. После того, как на дисплее начнет мигать символ капли крови, извлеките тест-полоску из прибора. В течение 20 с нанесите каплю крови на тест-полоску и снова вставьте ее в прибор. Через 15 с прозвучат 5 звуковых сигналов с интервалом в 1 с, означающих, что время, отведенное для нанесения капли крови, истекает.
2. Портативные лабораторные приборы, как правило, просты в эксплуатации, но сотрудник, производящий измерения должен пройти цикл специальной подготовки и придерживаться инструкции (протокола) по работе с ними.
3. Вопросы подготовки и контроля качества работы на портативном оборудовании возлагаются на штатных сотрудников лаборатории.

Ответить на вопросы:

1. В чем заключается принцип работы глюкометра?
2. Как можно проверить точность измерения при использовании тест-полоски?
3. Какие ограничения имеются при использовании глюкометра?

4.2. Абсорбционная фотометрия

Абсорбционная фотометрия – это метод исследования, изучающий поглощение светового потока при его прохождении через биообъект. Группы атомов, поглощающих кванты света в УФ- и видимой области спектра, называют хромофорами. Основными хромофорами в белках являются остатки ароматических аминокислот (фенилаланин, тирозин, триптофан), в нуклеиновых кислотах – пуриновые и пиримидиновые азотистые основания (аденин, гуанин, тимин, цитозин и урацил).

Группы атомов, которые сами не поглощают свет в указанном диапазоне спектра, но при включении в какую-либо хромофорную систему приводят к смещению максимума полосы поглощения и изменению ее интенсивности, называют ауксохромами. В белках ауксохромами являются оксо-, амино- и сульфгидрильные группы.

Следует отметить, что образование окрашенных в видимой области спектра соединений необходимо только для методов колориметрического анализа. Применение инструментальных методов позволяет использовать спектры поглощения, лежащие как в ультрафиолетовой, так и в инфракрасной областях спектра. Фотометрические исследования проводятся на фотометрах и спектрофотометрах, с помощью которых измеряют оптические плотности окрашенных растворов исследуемых веществ в спектральном диапазоне поглощения веществ. Сплошные спектры изучаются с помощью спектрофотометров.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Актуальность

Белки сыворотки крови представляют собой гетерогенную группу белков, включающую транспортные белки, ферменты, иммуноглобулины, гормоны, белки-ингибиторы и многие другие. Несмотря на различия в составе, структуре, физических и химических свойствах и выполняемой функции, белкам сыворотки присущ ряд общих характеристик:

- содержат атомы углерода, водорода, кислорода, азота;
- состоят из аминокислот, соединенных пептидными связями;
- обладают поглощением в ультрафиолетовой области спектра;
- сходно ведут себя в ряде химических реакций.

Исходя из этих общих свойств и были разработаны методы определения белка в биологических жидкостях.

Концентрация общего белка в сыворотке зависит главным образом от синтеза и распада двух основных белковых фракций - альбумина и глобулинов. Синтез белков плазмы крови осуществляется в основном в клетках печени и ретикулоэндотелиальной системы. При анализе содержания общего белка в сыворотке различают нормальный его уровень, пониженный (гипопротеинемию) и повышенный (гиперпротеинемию). Основные способы количественного определения белка представлены биуретовым, микробиуретовым и спектрофотометрическими методами.

Цель работы:

Научиться определять содержания белка в сыворотке крови биуретовым, микробиуретовым и спектрофотометрическими методами

Задания для самостоятельной работы:

1. Ознакомиться с инструкциями определения содержания белка биуретовым, микробиуретовым и спектрофотометрическими методами.
2. Подготовить реактивы.
3. Оборудовать рабочее место для лабораторной работы.
4. Выполнить лабораторную работу с использованием пробы сыворотки крови.
5. Сделать необходимые расчеты.
6. Заполнить бланк анализа. Оценить полученные результаты.
7. Сделать выводы по работе.

Биуретовый метод

Определение

Биуретовый метод основан на образовании окрашенных комплексных соединений меди при взаимодействии пептидных группировок молекул белков с биуретовым реактивом. Метод обладает низкой чувствительностью и используется в интервале концентраций белка от 10 г/л до 100 г/л (предел обнаружения

0,3 г/л). Пригоден для определения концентрации белка в образцах с высоким содержанием белка (например, сыворотка крови).

Принцип метода:

При добавлении к раствору белка щелочного раствора меди появляется фиолетовое окрашивание, интенсивность которого прямо пропорциональна концентрации белка. Развитие окраски обусловлено наличием пептидных связей. Биуретовую реакции дают не только белки, но и пептиды, в этом случае для ее протекания необходимо, по крайней мере, наличие двух пептидных связей. Биуретовый метод не проводят в присутствии солей аммония из-за образования медно-аммиачного комплекса. Метод специфичен, отличается хорошей воспроизводимостью. На правильность результатов влияет качество калибровочного графика и корригирование результатов по значению холостой пробы на реактивы и сыворотку. Завышает результаты повышенное содержание билирубина (больше 85 мкМ), триглицериды (больше 11,4 мМ), в этом случае применяют экстрагирование сыворотки диэтиловым эфиром.

Материал исследования: сыворотка крови.

Реактивы:

- исходный стандартный раствор альбумина (100 г/л);
- биуретовый реактив: в 50 мл воды растворяют 0,15 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и 0,6 г $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ (виннокислый натрий-калий или сегнетова соль), и при энергичном перемешивании добавляют 30 мл 10 % раствора NaOH и 0,1 г KI , объем раствора доводят до 100 мл.

Оборудование: колориметр.

Проведение анализа:

1. К 1 мл сыворотки крови добавить 4 мл биуретового раствора.
2. Измерить оптическую плотность пробы через 30 мин при 540 нм против холостой пробы (4 мл биуретового реактива и 1 мл дистиллированной воды).
3. Для определения концентрации белка необходимо построить калибровочный график (табл. 9).

Таблица 9

Построение калибровочного графика

	Исходный раствор альбумина, мл	Дист. вода, мл	Биуретовый реактив, мл	Концентрация белка в пробе, г/л
1	0,2	0,8	4,0	20
2				
3	0,4	0,6	4,0	40
4	0,6	0,4	4,0	60
5	0,8	0,2	4,0	80
	1,0	-	4,0	100
Через 30 мин фотометрируют при 540 нм				

Микробиуретовый метод

Определение

Микробиуретовый метод – это колориметрический метод количественного определения содержания белка. Чувствительность метода почти в 100 раз выше, чем у биуретового метода. Он используется в интервале концентраций белка от 0,02 г/л до 0,53 г/л.

Принцип метода:

Микробиуретовый метод – основан на взаимодействии пептидных связей с ионами меди в щелочной среде. В результате реакции образуется комплекс, окрашенный в фиолетовый цвет.

Материал исследования: сыворотка крови.

Реактивы:

- реактив Бенедикта: 17,3 г цитрата натрия и 10 г углекислого натрия растворяют при подогревании в небольшом количестве воды. В раствор добавляют 1,73 г сульфата меди, растворенного в 10 мл воды и доводят водой до 100 мл;
- 3 % раствор NaOH;
- исходный стандартный раствор альбумина, 1,0 г/л.

Оборудование: спектрофотометр.

Проведение анализа:

1. К 0,1 мл сыворотки крови добавить 4 мл 3% раствора NaOH и 0,2 мл реактива Бенедикта.
2. Раствор хорошо перемешать и через 15 мин фотометрировать на спектрофотометре при длине волны 330 нм против холостой пробы (0,1 мл H₂O, 4 мл щелочи и 0,2 мл реактива Бенедикта).
3. Для определения концентрации белка необходимо построить калибровочный график (табл. 10).

Таблица 10

Построение калибровочного графика

№ пробы	Исходный раствор альбумина, мл	Раствор NaOH, мл	Реактив Бенедикта, мл	Концентрация белка в пробе, мл
1	0,2	0,8	0,2	0,2
2	0,4	0,6	0,2	0,4
3	0,6	0,4	0,2	0,6
4	0,8	0,-	0,2	0,8
5	1,0		0,2	1,0

Через 15 мин спектрофотометрируют при 330 нм

Спектрофотометрический метод

Определение

Спектрофотометрический метод используется в интервале концентраций белка от 0,015 г/л до 0,045 г/л. Его можно использовать для растворов с низким количеством белка.

Принцип метода:

Белки обладают способностью поглощать свет в ультрафиолетовой области спектра за счет входящих в их состав ароматических аминокислот (триптофана и тирозина). Оптическая плотность раствора, содержащего эти аминокислоты прямо пропорциональна концентрации белка. Условно принято считать, что при концентрации белка в растворе 1,0 мг/мл, величина оптической плотности при 280 нм равна 1, при использовании 1 см кюветы. При 260 нм максимум поглощения обладают нуклеиновые кислоты. Белковые растворы, содержащие их в большом количестве, дают погрешность при данном методе определения. Для устранения этого недостатка проводят измерение оптической плотности при 260 и 280 нм. Спектрофотометрический метод имеет широкое применение в аналитической химии при выделении и контроля чистоты белковых фракций, а также в энзимологии для оценки чистоты фермента. Если фермент выделен в чистом виде, то можно определить какая величина оптической плотности будет соответствовать, например, 1 мг данного фермента. Пользуясь этим соотношением, можно определить концентрацию фермента, используя спектрофотометрический метод.

Материал исследования: сыворотка крови.

Реактивы: 0,9 % раствором NaCl.

Оборудование: спектрофотометр.

Проведение анализа:

1. Сыворотку крови развести в 1000 раз 0,9 % раствором NaCl.
2. Бесцветный, совершенно прозрачный раствор белка поместить в кювету спектрофотометра и определить оптическую плотность при длине волны 280 нм и 260 нм против физиологического раствора либо дистиллированной воды.
3. Расчет содержания белка проводят по формуле Калькара:
Концентрация белка (мг/мл) = $1,45 \cdot E_{280} - 0,74 \cdot E_{260}$

Референсные значения:

Содержание общего белка в сыворотке крови: 65–80 г/л.

Ответить на вопросы:

1. Какие методы абсорбционной фотометрии используются при определении содержания белка?
2. Что понимают под определением «общий белок сыворотки крови»?
3. В чем заключается принцип каждого метода?
4. При какой длине волны определяют содержание белка?
5. Какой прибор необходимо выбрать при использовании биуретового и микробиуретового методов?

4.3. Разделение фракций белков сыворотки крови

Общий белок сыворотки крови включает в себя альбумин и глобулины, которые в норме находятся в определенном качественном и количественном соотношении. Оно может быть оценено с помощью нескольких лабораторных методов. При разделении общего белка сыворотки крови удается выявить 5 основных фракций. При проведении электрофореза белковые фракции определяются в виде полос различной ширины с характерным, специфичным для каждого типа белка местоположением в геле. Для определения доли каждой фракции в общем количестве белка оценивают интенсивность полос.

Основная белковая фракция сыворотки – это альбумин. На его долю приходится около 2/3 всего белка крови. Альбумин соответствует самой интенсивной полосе, полученной при электрофорезе белков сыворотки крови здорового человека. К другим фракциям сыворотки, выявляемым с помощью метода электрофореза, относят: альфа-1 (преимущественно альфа-1-антитрипсин), альфа-2 (альфа-2-макроглобулин и гаптоглобин), бета (трансферрин и С3-компонент комплемента) и гамма-глобулины (иммуноглобулины).

Различные острые и хронические воспалительные процессы и опухолевые заболевания сопровождаются изменением нормального соотношения белковых фракций. Отсутствие какой-либо полосы может указывать на дефицит белка, что наблюдается при иммунодефицитах или недостаточности альфа-1-антитрипсина. Избыток какого-либо белка сопровождается увеличением интенсивности соответствующей полосы, что наиболее часто наблюдается при различных гаммапатиях. Результат электрофоретического разделения белков может быть представлен графически, при этом каждая фракция характеризуется определенной высотой, отражающей ее долю в общем белке сыворотки. Патологическое увеличение доли какой-либо фракции носит название «пик», например «М-пик» при множественной миеломе.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ НА ПЛЕНКАХ ИЗ АЦЕТАТА ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

Актуальность

Наиболее распространенным методом фракционирования белков является электрофорез, основанный на разной скорости движения белков в электрическом поле, в зависимости от величины заряда и молекулярной массы. Количество выделяемых фракций определяется условиями проведения электрофореза, в большей степени от качества поддерживающей среды. Так, например, при электрофорезе на бумаге и пленках ацетата целлюлозы выделяют 5 фракций (альбумины, α_1 -, α_2 -, β - и γ - глобулины), в то время как в полиакриламидном геле – до 20 и более фракций. На протеинограмме выявляются только те белки, концентрация которых достаточно высока.

Цель работы:

Изучить способы фракционирования белка сыворотки крови.

Задания для самостоятельной работы:

1. Выбрать метод для разделения белков сыворотки крови.
2. Подготовить реактивы.
3. Оборудовать рабочее место для лабораторной работы.
4. Сделать необходимые расчеты.
5. Оценить полученные результаты.
6. Сделать выводы по работе.

Принцип метода:

Коллоидные частицы белка перемещаются в электрическом поле постоянного тока: в щелочной среде к аноду, в кислой – к катоду. В щелочной среде наиболее быстро перемещаются альбумины, α_1 -, α_2 - и β -глобулины.

Материал исследования: сыворотка крови.

Реактивы:

- веронал-мединаловый буфер, рН=8,6: 10,32 г мединала и 1,84 г веронала последовательно растворяют в дистиллированной воде при нагревании, объем доводят до 1 л;
- краситель бромфеноловый синий;
- отмывочный раствор: 5 мл ледяной уксусной кислоты и 95 мл дистиллированной воды;
- элюирующий раствор: 0,01 М раствор NaOH.

Оборудование:

- прибор для электрофореза на пленках из ацетата целлюлозы;
- денситометр или фотоэлектроколориметр.

Проведение анализа:

1. Заполнить камеру буферным раствором: веронал-мединаловый буфер, рН=8,6. При этом необходимо сохранять одинаковый уровень буфера в обеих камерах и постоянную влажность.
2. Подготовка пленок: пленки смочить буферным раствором в течение 5 мин, удалить избыток влаги фильтровальной бумагой и натягивать пленку матовой стороной вверх на специальных рамках.
3. Нанесение образцов: с помощью аппликатора на катодный край пленки нанести 1–4 мкл сыворотки в виде узкой полоски.
4. Проведение электрофореза: включить ток примерно на 20 мин при напряжении 150 В и силе тока 1 мА на 1 см поперечного сечения полоски.
5. Обработка пленки: после окончания электрофореза: выключить ток, вынуть пленки и высушить на воздухе 5–10 мин.
6. Окрасить раствором бромфенолового синего в течение нескольких минут.
7. Отмыть в нескольких порциях раствора уксусной кислоты до просветления фона и высушить на фильтровальной бумаге. При невозможности провести учет фракций сразу пленки можно оставить в дистиллированной воде на сутки и более.
8. Количественное определение фракций провести после их элюирования в порциях 0,01 М раствор NaOH на ФЭКе, измеряя оптическую плотность проб против контрольной пробы (элюирующий раствор или элюат участка фона) или с помощью денситометра. Отдельные фракции белков вырезать и поместить в пробирки. В пробирки с глобулиновыми фракциями прилить по 4 мл элюирующего раствора, с альбуминовой – 8 мл. Элюцию проводят в течение 20 мин. Контролем служит участок фореграмм, не содержащий белка.
9. Провести измерение на ФЭКе при 630–670 нм, кювета 1 см. Величину экстинкции альбуминов умножить на 2.
10. При использовании денситометрии пленки необходимо просветлять в вазелиновом масле.

Расчет:

- а) результат выражают в процентах от суммы экстинкций всех фракций, принятой за 100 %;
- б) предварительно определив содержание общего белка в образце, рассчитывают содержание белковых фракций в г/л.

Референсные значения:

Содержание альбумина: 55,8–66,1 %; альфа-1-глобулина: 2,9–4,9 %; альфа-2-глобулина: 7,1–11,8 %; бета-1-глобулина: 4,7–7,2 %; бета-2-глобулина: 3,2–6,5 %; гамма-глобулина: 11,1–18,8 %.

Ответить на вопросы:

1. На какое количество фракций происходит разделение белков сыворотки крови при электрофорезе на ацетат-целлюлозных пленках?
2. С какой скоростью двигаются белки в щелочной среде?
3. Каким образом проводится учет фракций?
4. Единицы измерения результатов по содержанию белка в сыворотке крови.

4.4. Фотометрические методы. Турбидиметрия. Нефелометрия

Фотометрические методы исследования по типу взаимодействия вещества с излучением подразделяются на нефелометрические и турбидиметрические.

Нефелометрия: метод основан на определении содержания белка путем оценки интенсивности светорассеивания его взвеси или коллоидного раствора при помощи фотоколориметра (нефелометра). Предварительно, используя растворы белка известной концентрации, определяют степень мутности и строят калибровочный график.

Турбидиметрия: метод основан на измерении поглощения или пропускания света частицами мутных растворов (тонких взвесей, коллоидных растворов). Используется для определения белковых фракций.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

ТИМОЛОВАЯ ПРОБА

Актуальность

Тимоловая проба (тимоловероналовая проба, проба тимолового помутнения, проба Маклагана) не относится к числу особо популярных биохимических методов исследования крови, однако со счетов при выявлении отдельных заболеваний не сбрасывается и по-прежнему применяется в клинической лабораторной диагностике.

Неспецифическая реакция, основанная на взаимодействии с тимолом в вероналовом буфере отдельных белков плазмы (гамма-глобулинов и бета-глобулинов, связанных с липидами — липопротеинов низкой плотности), и помутнении раствора, четкого ответа в отношении определенных заболеваний не дает, но нередко заметно помогает в сочетании с другими тестами, а в отдельных случаях — еще и опережает их.

Цель работы:

Изучить основы турбидиметрического метода и определить тимоловую пробу в единицах S-N.

Задания для самостоятельной работы:

1. Оборудовать рабочее место для лабораторной работы.
2. Подготовить рабочие реактивы.

3. Сделать необходимые расчеты.
4. Заполнить бланк анализа. Оценить полученные результаты.
5. Сделать вывод по работе.

Принцип метода:

Сывороточные β -глобулины, γ -глобулины и липопротеины осаждаются при рН 7,55 тимоловым реактивом. При взаимодействии сыворотки с тимоловым реактивом возникает помутнение, интенсивность которого измеряют турбодиметрически.

Материал исследования: сыворотка крови.

Реактивы:

- концентрированный раствор тимола, в трис-буфере 11 ммоль/л, малеиновая кислота 3,36 ммоль/л, тимол 6,66 ммоль/л;
- калибровочный раствор I: серная кислота 2,5 моль/л;
- калибровочный раствор II: барий хлористый 48 ммоль/л.

Состав реакционной смеси

- Трис-буфер, рН 7,55 (25 °С).
- Тимол 0,098 ммоль/л.

Соотношение сыворотка / реакционная смесь: 1/61

Оборудование: спектрофотометр (длина волны (620–660) нм, кювета 1 см).

Проведение анализа:

1. Приготовить рабочие растворы:

Раствор 1. В мерную колбу на 1000 мл налить около 900 мл дистиллированной воды и при постоянном перемешивании магнитной мешалкой, постепенно добавить 15 мл Реактива 1. Носок пипетки должен быть погружен в воду в колбе. Раствор довести до метки и перемешивать еще 10 мин.

Раствор 2. В мерную колбу на 250 мл пипеткой внести 10 мл Реактива 2, долить охлажденной до +8 °С дистиллированной водой до метки и перемешать.

Раствор 3. В мерную колбу на 50 мл пипеткой внести 1,50 мл Реактива 3 и долить до метки Раствором 2, охлажденным точно до +10 °С, тщательно перемешать.

2. В двух пробирках смешать Раствор 1 в соотношении 60+1 с сывороткой крови (проба) или физиологического раствора (табл. 11).
3. В следующей пробирке смешать физиологический раствор в соотношении 60+1 с сывороткой крови (контрольный раствор 2), например, 3 мл физ. раствора и 0,05 мл сыворотки.
4. Построить калибровочный график согласно таблице 12. Из растворов 2 и 3 разбавлением готовят растворы с помутнением, соответствующим 5–20 единицам помутнения по Shank-Noagland (ед. S-H).
5. В пробирках смешать Раствор 2 с Раствором 3 и точно через 30 мин содержимое пробирок тщательно перемешать, после чего измерить оптиче-

скую плотность против дистиллированной воды. Измерение провести при такой же длине волны, как при измерении пробы.

Таблица 11

Ход реакции

Отмерить, мл	Проба	Контрольный раствор 1	Контрольный раствор 2
Сыворотка крови	0,05	-	0,05
Раствор 1	3,0	3,0	-
Физ. раствор	-	0,05	3,0

Перемешивают и оставляют точно 30 мин. Снова перемешивают и измеряют оптическую плотность пробы (А) против контрольного раствора 1. Если проба сыворотки хилезная, измеряют оптическую плотность против контрольного раствора 2.

Таблица 12

Ход реакции

Раствор №	Раствор 2, мл	Раствор 3, мл	Ед. помутнения, S-H
1	4,5	1,5	5
2	3	3,0	10
3	1,5	4,5	15
4	–	6,0	20

Референсные значения:

Тимоловое помутнение 0–4 ед. S-H.

Предельные величины – 4–5 ед. S-H.

Патологические величины – свыше 5 ед. S-H.

Ответить на вопросы:

1. Что такое коллоидная устойчивость белков?
2. Каким единицам S-H соответствуют предельные значения?
3. С какой целью строится калибровочный график при определении тимоловой пробы?
4. Почему при поражениях печени изменяется коллоидная устойчивость белков?

4.5. Флуоресцентные методы

Флуоресцентный, метод анализа основан на измерении интенсивности излучаемого веществами видимого света (флуоресценции) при облучении их ультрафиолетовыми лучами.

Количественный флуоресцентный метод анализа основан на измерении интенсивности флуоресценции искомого вещества путем сравнения его с интенсивностью флуоресценции вещества с известной концентрацией. Для оценки интенсивности флуоресценции наибольшее применение нашли визуальный и фотометрический методы. Вследствие того, что выход флуоресценции зави-

сит от ряда факторов, подготовку пробы и измерение интенсивности флуоресценции необходимо вести в строго определенных условиях.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ БИТИРОЗИНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ

Актуальность

Активные формы кислорода способны воздействовать практически на все биомолекулы. В большинстве исследований перекисное окисление липидов (ПОЛ) рассматривается в качестве универсального первичного механизма, обуславливающего возникновение и развитие различных патологических состояний, в том числе через повреждение других биомолекул и инициацию свободнорадикальных процессов.

При окислении фенилаланина в составе молекул белка образуется долгоживущий тирозин-радикал, который при взаимодействии с таким же радикалом образует битирозиновые сшивки. По его содержанию судят об интенсивности процессов ПОЛ.

Цель работы:

Научиться определять содержание битирозина в плазме крови.

Задания для самостоятельной работы:

1. Оборудовать рабочее место для лабораторной работы.
2. Подготовить рабочие реактивы.
3. Сделать необходимые расчеты.
4. Заполнить бланк анализа. Оценить полученные результаты.
5. Сделать вывод по работе.

Принцип метода:

Оценку содержания битирозина проводят методом К.Д. Дэвиса (1987) в модификации Э.М. Бекмана и соавт. (2006). В результате окисления фенилаланина в составе молекул белка образуются орто-, мета-, пара-тирозины, а их одноэлектронное окисление генерирует долгоживущий тирозин-радикал, который при взаимодействии с таким же радикалом образует битирозиновые сшивки. Битирозиновую флуоресценцию измеряют при длине волны 416 нм.

Материал исследования: плазма крови.

Реактивы:

- калий фосфорнокислый 1-замещенный;
- натрий фосфорнокислый 2-замещенный 2-водный;
- сульфат меди.

Приготовление реактивов:

- раствор 0,07 М фосфатный буфер (рН 7,4), содержащий раствор калия фосфорнокислого 1-замещенного (9,078 г/л) и раствор натрия фосфорнокислого 2-замещенного 2-водного (11,876 г/л).
- раствор CuSO₄ (до конечной концентрации 1 мМ).

Оборудование:

- центрифуга лабораторная (ОПН-3);
- пробирки центрифужные по ГОСТ 1770-74;
- дозаторы (объем 0,1–1,0 мл, 1–5 мл);
- спектрофлуориметр SFM 25 Kontron.

Проведение анализа:

1. Кровь собирают в центрифужные пробирки с добавлением 3,9 % раствора цитрата натрия в соотношении 1:9. Центрифугируют в течение 5 мин при 1500 об/мин, отделяют плазму. Битирозиную флуоресценцию измеряют при длине волны возбуждения – 325 нм и при длине волны испускания – 415 нм. Интенсивность флуоресценции выражают в условных единицах.
2. Для определения индуцированной окислительной модификации битирозина в опытную пробу в стерильных условиях добавляют 0,1 мл плазмы, 4,8 мл 0,07 М фосфатного буфера (рН 7,4), 0,1 мл раствора CuSO₄ до конечной концентрации 1 мМ. В контрольную пробу кроме плазмы добавляют 4,9 мл 0,07 М фосфатного буфера (рН=7,4). Обе пробы инкубируют 20 ч при 37 °С. На спектрофлуориметре регистрируют снижение флуоресценции триптофана при длине волны возбуждения 295 нм и длине волны испускания 325 нм и флуоресценцию образованного битирозина при длине волны возбуждения 325 нм и длине волны испускания 415 нм. Результаты представляют в условных единицах, стандартизованных на 1 мг белка.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ОКИСЛЕННОГО ТРИПТОФАНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ

Актуальность

Триптофан в составе белковой молекулы также может подвергаться окислению в результате реакций ПОЛ. Определение его содержания в плазме крови позволяет судить об интенсивности процессов ПОЛ.

Цель работы:

Научиться определять содержание окисленного тирозина в плазме крови.

Задания для самостоятельной работы:

1. Оборудовать рабочее место для лабораторной работы.

2. Подготовить рабочие реактивы.
3. Сделать необходимые расчеты.
4. Заполнить бланк анализа. Оцените полученные результаты.
5. Сделать вывод по работе.

Принцип метода:

Оценку содержания окисленного триптофана проводят методом К. J. Davies (1987) в модификации Э. М. Бекмана и соавт. (2006). Окисление триптофановых остатков сопровождается снижением флуоресценции, характерной для триптофана. Битирозин и окисленный триптофан в нативных молекулах, в основном, отсутствуют, поэтому известны как стабильные маркеры окислительной модификации белка. Свободнорадикальное окисление аминокислотных остатков триптофана приводит к его деградации, проявляющейся в снижении интенсивности флуоресценции в области 336 нм.

Материал исследования: плазма крови.

Реактивы:

- калий фосфорнокислый 1-замещенный;
- натрий фосфорнокислый 2-замещенный 2-водный.

Приготовление реактивов:

- Раствор 1/15 М фосфатный буфер (рН 7,4), содержащий раствор калия фосфорнокислого 1-замещенного (9,078 г/л) и раствор натрия фосфорнокислого 2-замещенного 2-водного (11,876 г/л).

Оборудование:

- центрифуга лабораторная (ОПН-3);
- пробирки центрифужные по ГОСТ 1770-74;
- дозаторы (объем 0,1–1,0 мл, 1–5 мл);
- спектрофлуориметр SFM 25.

Проведение анализа:

1. Для определения флуоресценции триптофана готовят 0,4 % раствор плазмы крови на 1/15 М фосфатном буфере (рН 7,4). Для этого 20 мкл плазмы доводят до 5 мл 1/15 М раствором фосфатного буфера (рН 7,4).
2. Триптофановую флуоресценцию регистрируют при длине волны возбуждения – 297 нм и при длине волны испускания – 336 нм. Интенсивность флуоресценции выражают в условных единицах.

4.6. Фотометрические исследования по конечной точке

При проведении фотометрических исследований оценку результатов чаще всего производят тремя способами:

- по конечной точке (измерение в конечной точке);

- по фиксированному времени (примером может служить прямой псевдокинетический метод Яффе);
- кинетически (кинетическое измерение).

Определение по конечной точке состоит в учете образования продукта за некоторое (порой относительно длительное) время инкубации. Расчет результатов производится по стандарту.

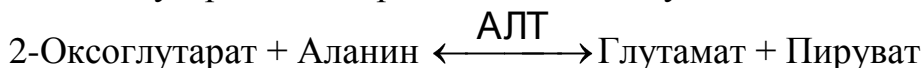
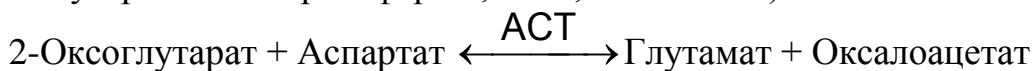
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АЛАНИНАМИНОТРАНСФЕРАЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Определение активности аланинаминотрансферазы в сыворотке крови динитрофенилгидразиновым методом

Актуальность

В сыворотке крови человека наибольшей активностью обладают две аминотрансферазы: аспаратаминотрансфераза (L-аспартат:2-оксоглутарат-аминотрансфераза, АСТ, КФ 2.6.1.1.) и аланинаминотрансфераза (L-аланин: 2-оксоглутарат-аминотрансфераза, АЛТ, КФ 2.6.1.2.).



Активность АЛТ максимальна в печени, среди других органов убывает в последовательности: поджелудочная железа, сердце, скелетные мышцы, селезенка, легкие.

Определение активности трансаминаз основано на унифицированном методе Райтмана–Френкеля.

Цель работы:

Научиться определять активность аланинаминотрансферазы в сыворотке крови динитрофенилгидразиновым методом.

Задания для самостоятельной работы:

1. Познакомиться с принципом и методикой проведения лабораторной работы.
2. Оборудовать рабочее место для лабораторной работы.
3. Сделать необходимые расчеты.
4. Построить калибровочный график для определения активности АЛТ.
5. Заполнить бланк анализа. Оценить полученные результаты.
6. Сделать выводы по активности обеих аминотрансфераз.

Принцип метода:

Определение активности АЛТ основано на измерении оптической плотности при длине волны 490 (49–540) нм окрашенного в щелочной среде

2,4-динитрофенилгидразона пировиноградной кислоты, концентрация которого пропорциональна активности АЛТ.

Материал исследования: сыворотка крови, контрольная сыворотка.

Реактивы:

- Реагент 1: субстрат АЛТ (L-аланиновая кислота – 0,1 моль/л, α-кетоглутаровая кислота – 2 ммоль/л в 0,1 моль/л фосфатном буфере, рН 7,4, азид натрия 0,03 %).
- Реагент 2: 2,4 динитрофенилгидразин (1 ммоль/л в 1 моль/л соляной кислоте).
- Реагент 3: гидроокись натрия (4 моль/л). Конечная концентрация реагента 3 в рабочем растворе – 0,4 моль/л.
- Калибратор: натрий пировинограднокислый (1,5 ммоль/л в 0,1 моль/л фосфатном буфере, рН 7,4).

Оборудование:

- спектрофотометр (длина волны 490 нм) или фотоэлектроколориметр (490–540 нм), кювета с длиной оптического пути 1 см;
- термостат водяной, поддерживающий температуру 37 °С.

Проведение анализа:

1. Предварительно приготовить рабочий реагент 3. Реагент 3 количественно перенести в мерную колбу на 1000 мл, довести до метки дистиллированной водой.
2. В пробирки внести Калибратор и Реагент 1. Раствор тщательно перемешать и добавить 0,5 мл Реагента 2, перемешать и выдержать при комнатной температуре +(18–25) °С в течение 20 мин, после чего добавить 5,0 мл рабочего раствора Реагента 3, оставить на 10 мин при комнатной температуре для развития окраски. Измерить оптическую плотность против дистиллированной воды при длине волны 490 (490–540) нм.
3. Калибровочный график построить, откладывая по оси ординат разность оптических плотностей опытных и контрольной (холостой, пробирка 0) проб, а по оси абсцисс – соответствующие значения активности АЛТ (табл. 13).

Таблица 13

Построение калибровочного графика

№ пробирки	Калибратор, мл	Вода дист., мл	Реагент 1, мл	Активность АЛТ		
				Е/л	ммоль/ч× л	мккат/л
0	-	0,10	0,50	-	-	-
1	0,025	0,10	0,475	6,25	0,375	0,104
2	0,05	0,10	0,45	12,50	0,75	0,208
3	0,10	0,10	0,40	25,0	1,50	0,417
4	0,20	0,10	0,30	50,0	3,0	0,833

4. Компоненты реакционной смеси для определения активности АЛТ внести в пробирки в соответствии с таблицей 14.

Таблица 14

Объемы реагентов, необходимых для проведения реакции
в опытной и контрольной пробах

Отмерить, мл	Опытная проба	Контрольная (холостая) проба
Реагент 1	0,25	0,25
Выдержать при t 37 °С		
Сыворотка или плазма крови	0,05	-
Перемешать и выдержать точно 60 мин при t 37 °С		
Дистиллированная вода	-	0,05
Реагент 2	0,25	0,25
Перемешать и выдержать в течение 20 мин при комнатной t +(18–25) °С		
Реагент 3 (рабочий раствор реагента)	2,50	2,50
Перемешать, выдержать в течение 10 мин при комнатной t + (18–25) °С		

5. Измерить оптическую плотность растворов опытных и контрольной (холостой) проб против дистиллированной воды при длине волны 490 (490–540) нм в кювете на 1 см. Окраска стабильна в течение 30 мин.
6. Расчет активности АСТ провести по калибровочному графику. Для этого на оси ординат отметить разницу оптических плотностей опытной и контрольной проб, на оси абсцисс найти соответствующее им значение активности. В случае, если активность АЛТ превышает 50 Е/л, сыворотку крови разбавить физиологическим раствором, процедуру анализа повторить и учесть разбавление при расчете.

Референсные значения:

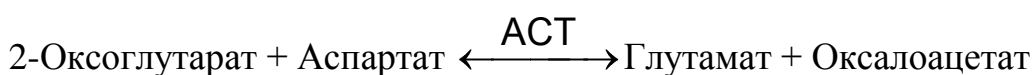
Сыворотка: АЛТ – до 11,3 Е/л

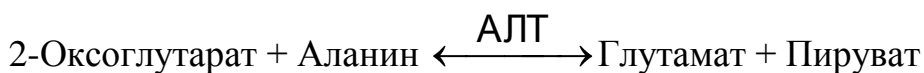
Коэффициент де Ритиса (АСТ / АЛТ) – $1,33 \pm 0,40$

Определение активности аспаратаминотрансферазы в сыворотке крови динитрофенилгидразиновым методом

Актуальность

В сыворотке крови человека наибольшей активностью обладают две аминотрансферазы: аспаратаминотрансфераза (L-аспартат:2-оксоглутарат-аминотрансфераза, АСТ, КФ 2.6.1.1.) и аланинаминотрансфераза (L-аланин: 2-оксоглутарат-аминотрансфераза, АЛТ, КФ 2.6.1.2.).





Наибольшая активность АСТ обнаружена в миокарде, затем в порядке убывания в печени, скелетных мышцах, головном мозге, почках.

Определение активности трансаминаз основано на унифицированном методе Райтмана–Френкеля.

Цель работы:

Научиться определять активность аспартатаминотрансферазы в сыворотке крови динитрофенилгидразиновым методом.

Задания для самостоятельной работы:

1. Познакомиться с принципом и методикой проведения лабораторной работы.
2. Оборудовать рабочее место для лабораторной работы.
3. Сделать необходимые расчеты.
4. Построить калибровочный график для определения активности АСТ.
5. Заполнить бланк анализа. Оценить полученные результаты.
6. Сделать выводы по активности обеих аминотрансфераз.

Принцип метода:

АСТ катализирует реакцию переаминирования между L-аспартатом и α -кетоглутаратом с образованием глутаминовой и щавелевоуксусной кислот (последняя спонтанно превращается в пировиноградную кислоту). Определение активности АСТ основано на измерении оптической плотности при длине волны 490 (490–540) нм окрашенного в щелочной среде 2,4-динитрофенилгидразона пировиноградной кислоты, концентрация которого пропорциональна активности АСТ.

Материал исследования: сыворотка крови, контрольная сыворотка.

Реактивы:

- Реагент 1: субстрат АСТ, готовый к использованию.
- Реагент 2: 2,4 динитрофенилгидразин.
- Реагент 3: гидроокись натрия, концентрат.
- Калибратор: натрий пировинограднокислый (1,5 ммоль/л в 0,1 моль/л фосфатном буфере, рН 7,4).

Проведение анализа:

1. Построить калибровочный график, внося реактивы в пробирки согласно таблице 15.

Построение калибровочного графика

№ пробирки	Калибратор, мкл	Вода, мкл	Реагент 1, мкл	Активность АСТ		
				Е/л	ммоль/ч ×л	мкат/л
0	-	100	500	-	-	-
1	25	100	475	6,25	0,375	0,104
2	50	100	450	12,5	0,75	0,208
3	100	100	400	25,0	1,50	0,417
4	200	100	300	50,0	3,00	0,833

- Пробы перемешать и добавить по 0,5 мл Реагента 2, перемешать и выдержать 20 мин при комнатной температуре $+(18-25)$ °С. Добавить по 5,0 мл рабочего раствора Реагента 3 и оставить на 10 мин при комнатной температуре для развития окраски. Калибровочный график построить, откладывая по оси ординат разность оптических плотностей опытных и контрольной (холостой, пробирка 0) проб. А по оси абсцисс – соответствующие значения активности АСТ. Для каждой новой серии набора необходимо проводить построение нового калибровочного графика.
- Компоненты реакционной смеси для определения активности АСТ внести в пробирки в соответствии с таблицей 16.
- Измерить оптическую плотность растворов опытных и контрольной (холостой) проб против дистиллированной воды при длине волны 490 (490–540) нм в кювете на 1 см. Окраска стабильна в течение 30 мин.
- Расчет активности АСТ провести по калибровочному графику. Для этого на оси ординат отметить разницу оптических плотностей опытной и контрольной проб, на оси абсцисс найти соответствующее им значение активности.

Таблица 16

Объемы реагентов, необходимых для проведения реакции
в опытной и контрольной пробах

Отмерить, мкл	Опытная проба	Контрольная (холостая) проба
Реагент 1	250	250
Выдержать при t 37 °С в течение 5 мин		
Дистиллированная вода	-	50
Сыворотка крови	50	-
Перемешать и выдержать точно 60 мин при t 37 °С		
Реагент 2	250	250
Перемешать и выдержать в течение 20 мин при комнатной t $+(18-25)$ °С		
Реагент 3 (рабочий раствор реагента)	2500	2500
Перемешать, выдержать в течение 10 мин при комнатной t $+(18-25)$ °С		

Референсные значения:

Сыворотка: АСТ – до 7,5 Е/л

Коэффициент де Ритиса (АСТ / АЛТ): $1,33 \pm 0,40$

Ответить на вопросы:

1. В чем заключается принцип определения активности ферментов по конечной точке?
2. Какая цветная реакция составляет основу метода Райтмана–Френкеля?
3. Можно ли пользоваться одним калибровочным графиком для определения АЛТ и АСТ?

4.7. Автоматизированные биохимические исследования

Автоматизация биохимических исследований в мировой лабораторной практике началась с середины 50-х годов XX в., ознаменовавшихся созданием фотометров и спектрофотометров с контролируемой температурой кюветы: это позволило выполнять наряду с конечно-точечными кинетические исследования. Дальнейшее совершенствование фотометров было направлено на автоматизированный перевод значений абсорбции в показатели концентрации или активности (ферментов).

Применение в клинико-лабораторной практике автоматизированных фотометров сделало возможным осуществлять измерения не только в режиме конечной точки, когда реакция уже завершилась, но также в режимах:

- фиксированного времени (измерение результата через определенный интервал времени после начала реакции);
- кинетики (ряд измерений с определенным интервалом времени и расчетом активности фермента по средней величине изменения абсорбции за этот интервал времени);
- дифференциальном (расчет концентрации по разности абсорбции образца и бланка);
- бихроматическом (при котором расчет концентрации выполняется по разности абсорбции, измеренной на двух длинах волн).

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ КИНЕТИЧЕСКИМ УФ-МЕТОДОМ

Актуальность

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) – гликолитический фермент, обратимо катализирующий окисление L-лактата в пировиноградную кислоту. Для лактатдегидрогеназы в качестве промежуточного акцептора водорода требуется НАД. Реакция, катализируемая лактатдегидрогеназой, может быть представлена в следующем виде: $L\text{-лактат} + \text{НАД} \leftrightarrow \text{пируват} + \text{НАДН} + \text{H}^+$.

Фермент широко распространен в организме человека. По степени убывания активности энзима органы и ткани могут быть расположены в следующем порядке: почки, сердце, скелетные мышцы, поджелудочная железа, селезенка, печень, легкие, сыворотка крови. Лактатдегидрогеназа содержится не только в сыворотке, но и в значительном количестве в эритроцитах, поэтому сыворотка, используемая для анализа, должна быть свежей, лишенной следов гемолиза.

Цель работы:

Научиться определять активность лактатдегидрогеназы в сыворотке крови.

Задания для самостоятельной работы:

1. Подготовить реактивы.
2. Оборудуйте рабочее место для лабораторной работы.
3. Выполнить лабораторную работу с использованием проб сыворотки крови.
4. Сделать необходимые расчеты.
5. Заполнить бланк анализа. Оценить полученные результаты.
6. Сделать выводы по работе.

Материал исследования: сыворотка крови.

Реактивы:

- Реагент 1 (Р1): трис-НСI буфер, натрия пируват, натрия хлорид.
- Реагент 2 (Р2): лиофилизат (НАДН).

Концентрации компонентов в смеси:

НАДН – 0,24 ммоль/л

Трис-НСI буфер, рН 7,4 – 0,07 моль/л

Натрия хлорид – 0,2 моль/л

Оборудование: спектрофотометр.

Проведение анализа:

1. Предварительно приготовить рабочий реагент. Для этого флакон Р2 растворить в содержимом флакона Р1, перемешать. Рабочий реагент стабилен в течение 1 мес. При температуре 2–8 °С.
2. Выбрать условия проведения анализа:
 - длина волны – 340 нм;
 - длина оптического пути – 10 мм;
 - температура – 37 °С.
3. Довести температуру рабочего реагента до температуры анализа. К 1000 мкл рабочего реагента добавить 25 мкл пробы, перемешать и поместить в термостатируемое кюветное отделение анализатора. Через 30 с начать считывание оптической плотности с интервалом 1 мин в течение 3 мин. Вычислить среднее ($\Delta E/\text{мин}$). Если $\Delta E/\text{мин}$ превышает 0,16 (актив-

ность ЛДГ более 1050 Е/л), пробу разбавить в 10 раз физиологическим раствором, повторить анализ и результат умножить на 10.

Расчет:

Активность ЛДГ (А) в пробе в Е/л рассчитать по формуле:

$A = \Delta E / \text{мин} \times \text{фактор}$, где значение фактора равно 6592.

Референсные величины:

В сыворотке крови активность ЛДГ равна 195–450 Е/л.

Ответить на вопросы:

1. Назовите основные преимущества кинетического метода?
2. На каком принципе основан метод определения активности лактатдегидрогеназы?
3. При какой длине волны проводится анализ?
4. С какой целью определяется активность лактатдегидрогеназы в контрольной сыворотке?
5. Что означает расчет по фактору активности лактатдегидрогеназы?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ γ -ГЛУТАМИЛТРАНСПЕПТИДАЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КИНЕТИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Актуальность

Гамма-глутамилтрансфераза (синоним – гамма-глутамилтранспептидаза, ГГТП) – это фермент (белок), участвующий в обмене аминокислот в клетках организма. Содержится он, в основном, в клетках почек, печени и поджелудочной железы. Но незначительное количество также может находиться в селезенке, мозге, сердце, кишечнике. Располагается он в самой клетке (в мембране, цитоплазме и лизосоме), но при её разрушении попадает в кровеносное русло.

Невысокая активность этого фермента в крови считается нормой, так как клетки обновляются, но если гибнет значительная часть клеток, его активность в сыворотке крови резко возрастает. Наибольшее содержание фермента расположено в почках, но несмотря на это, источник сывороточной активности ГГТ – преимущественно гепатобилиарная система. Анализ на содержание в крови сыворотки ГГТП – наиболее чувствительный лабораторный показатель практически при всех поражениях и заболеваниях печени.

Цель работы:

Научиться определять активность ГГТП в сыворотке крови однореагентной и двухреагентной процедурами.

Задания для самостоятельной работы:

1. Познакомиться с принципом и методикой проведения практической работы.

2. Ознакомиться с правилами работы на биохимическом анализаторе
3. Оборудовать рабочее место для практической работы.
4. Оформить протокол выполнения работы.
5. Заполнить бланк анализа. Оценить полученные результаты.
6. Сделать вывод по работе.

Принцип метода:

γ -Глутамилтрансфераза (ГГТП, γ -ГТФ) переносит глутамиловый остаток с γ -L-(+)глутамил-4-нитроанилина на дипептидный акцептор, которым является глицилглицин, служащий одновременно и буфером.

L- γ -глутамил-3 карбокси - 4-нитроанилид + глицилглицин $\xrightarrow{\text{ГГТП}}$

L- γ -глутамил-глицилглицин + 5-амино-2- нитробензоат

Скорость образования 5-амино-2-нитробензоата прямо пропорциональна активности ГГТП.

Материал исследования: сыворотка крови.

Реактивы:

- Реагент 1 (Р1): раствор глицилглицина;
- Реагент 2(Р2): раствор L-гамма-глутамил-3-карбокси – 4-нитроанилида.

Оборудование: спектрофотомер.

Проведение анализа:

1. Выбрать условия проведения анализа:
 - длина волны – 405 (415) нм;
 - длина оптического пути – 10 нм;
 - температура – 37 °С.
2. *Однореагентная процедура (запуск реакции образцом).* Довести температуру рабочего реагента до температуры анализа. В кювету внести 1000 мкл рабочего реагента, добавить 100мкл анализируемого образца (О), перемешать и поместить в термостатируемое кюветное отделение анализатора. Через 1 мин начать считывание оптической плотности через равные промежутки времени в течение 1–3 мин. Количество считываний должно быть не менее трех. Рассчитать среднее изменение оптической плотности за 1 мин ($\Delta E/\text{мин}$). Если $\Delta E/\text{мин}$ превышает 0,2 (активность ГГТП более 230 Е/л), образец разбавить в 10 раз физиологическим раствором, повторить анализ и результат умножить на 10.
3. *Двухреагентная процедура (запуск реакции субстратом).* Довести температуру Р1 и Р2 до температуры анализа. К 800 мкл Р1 добавить 100 мкл образца, перемешать и выдержать при температуре 37 °С в течение 1–5 мин. Затем добавить 200 мкл Р2 и далее проводить анализ, как описано в однореагентной процедуре.

Расчет:

Активность ГГТП (А) в анализируемом образце в Е/л рассчитать по формуле: $A = \Delta E / \text{мин} \times \text{фактор}$, где значение фактора равно 1158 (405 нм).

Референсные величины:

У мужчины активность ГГТП должна быть до 50 Е/л. У женщин – до 32 Е/л.

Ответить на вопросы:

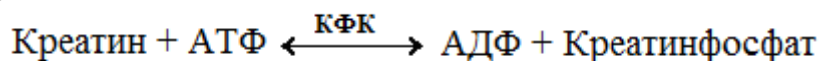
1. На каком принципе основан метод определения активности ГГТП?
2. В чем заключаются преимущества биохимического анализатора перед спектрофотометром и фотоэлектроколориметром?
3. Как рассчитывается $\Delta E / \text{мин}$?
4. Назовите условия проведения измерений?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КРЕАТИНКИНАЗЫ В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ КИНЕТИЧЕСКИМ УФ-МЕТОДОМ

Актуальность

Креатинфосфокиназа (КФК) (АТФ: креатин-фосфотрансфераза, КФ 2.7.3.2.), магнийзависимый фермент, содержится исключительно в цитоплазме и митохондриях миокарда, скелетной мускулатуры и ткани мозга, где катализирует реакцию:



Равновесие реакции при щелочных значениях рН смещено в сторону образования АТФ.

Цель работы:

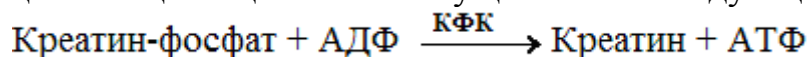
Научиться определять активность креатинкиназы кинетическим методом в сыворотке крови.

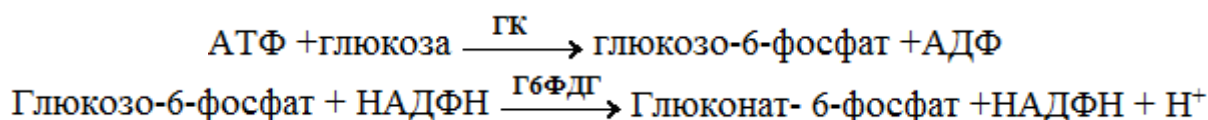
Задания для самостоятельной работы:

1. Подготовить реактивы.
2. Оборудовать рабочее место для лабораторной работы.
3. Выполнить лабораторную работу с использованием сыворотки крови.
4. Сделать необходимые расчеты.
5. Заполнить бланк анализа. Оценить полученные результаты.

Принцип метода:

Определение активности фермента можно проводить как по прямой, так и по обратной реакции. Кинетическое определение активности креатинкиназы после реактивации N- ацетилцистеином осуществляют следующим образом:





Скорость образования НАДФН прямо пропорциональна активности креатинкиназы и измеряется фотометрически при длине волны 340 нм.

Материал исследования: сыворотка крови, гепаринизированная или ЭДТА плазмы крови.

Реактивы:

- Реагент 1 (Р1): буфер;
- Реагент 2 (Р2): лиофилизат.

Концентрация компонентов в реакционной смеси:

- Имидазольный буфер, рН 6,7-100 ммоль/л.
- Глюкоза 20 ммоль/л.
- Магния ацетат – 10 ммоль/л.
- N-ацетилцистеин (НАС) 20 ммоль/л.
- Креатинфосфат – 30 ммоль/л.
- АДФ – 2,0 ммоль/л.
- АМФ – 5,0 ммоль/л.
- НАДФ – 2,0 ммоль/л.
- ЭДТА- Na_2 – 2,0 ммоль/л.
- Натрия азид – 0,1 %.
- Диаденозин пентафосфат – 10 мкмоль/л.
- Глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа (Г6ФДГ) – 1500 Е/л.
- Гексокиназа (ГК) – 2500 Е/л.

Проведение анализа:

1. Предварительно приготовить рабочий реактив. Флакон Р2 растворить в содержимом 1 флакона Р1.
2. Выбрать условия проведения анализа:
 - длина волны – 340 нм;
 - длина оптического пути – 10 мм;
 - температура – 37 °С.
3. Довести температуру рабочего реагента до температуры анализа (37 °С).
4. К 1 мл рабочего реагента добавить 0,04 мл сыворотки, перемешать и поместить в термостатируемое кюветное отделение анализатора. Через 2 мин начать считывание оптической плотности с интервалом 30–60 с в течение 3 мин. Количество считываний должно быть не менее трех.
5. Рассчитать среднее изменение оптической плотности за 1 мин ($\Delta E/\text{мин}$). Если активность креатинкиназы превышает 1000 Е/л, сыворотку разбавить физиологическим раствором, повторить анализ и полученный результат умножить на разведение.

Расчет:

Активность креатинкиназы в сыворотке крови (А) в Е/л рассчитать по формуле:

$$A = \frac{\Delta E/\text{мин} \times 1,040 \times 1000}{6,3 \times 0,040 \times 1,0} = \Delta E/\text{мин} \times 4127, \text{ где}$$

1,040 – общий объем реакционной смеси, мл;

0,040 – объем сыворотки, мл;

6,3 – миллимолярный коэффициент экстинкции НАДФН при 340 нм;

1000 – коэффициент пересчета из ммоль в мкмоль;

1,0 – длина оптического пути, см.

Референсные величины:

У женщин активность креатинкиназы равна 24–165 Е/л. У мужчин креатинкиназы равна 24–190 Е/л.

Ответить на вопросы:

1. На каком принципе основан метод определения активности креатинкиназы?
2. При какой длине волны проводится анализ?
3. С какой целью в реакционную смесь добавляют НАДФ?
4. Что означает миллимолярный коэффициент экстинкции?

4.8. Сравнительный анализ эффективности методов

Лабораторные методы исследования находят все большее значение в клинической практике. За последнее десятилетие в лабораторную практику введено около 190 новых методов, позволяющих проводить лабораторные исследования. Разнообразие методов исследования в клинической лабораторной диагностике ставит задачу по оценке их эффективности.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ГЛЮКОЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Актуальность

Определение глюкозы в крови – важный этап, в диагностике сахарного диабета. Существует огромное количество методик определения, позволяющих установить глюкозы в крови. Среди них можно выделить редуктометрические, колориметрические, ферментативные методы определения.

Ферментативные методы определения концентрации глюкозы в крови наиболее распространены. Выделяют две основные разновидности этих методов: глюкозооксидазный и гексокиназный. На данный момент наиболее распространенным является глюкозооксидазный метод определения.

Определение содержания глюкозы глюкозооксидазным методом

Цель работы:

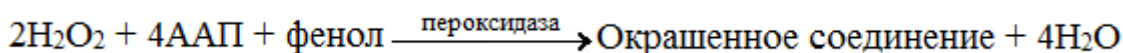
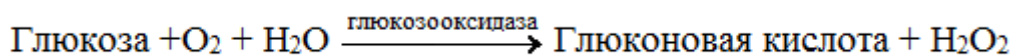
Научиться определять содержание глюкозы в сыворотке и плазме крови глюкозооксидазным методом.

Задания для самостоятельной работы:

1. Ознакомиться с методикой проведения работы.
2. Оборудовать рабочее место для практической работы.
3. Определить содержание глюкозы в сыворотке и плазме крови, в контрольной сыворотке.
4. Сделать необходимые расчеты.
5. Заполнить бланк анализа. Оценить полученные результаты.
6. Сделать вывод по работе.

Принцип метода:

Определение глюкозы основано на реакции, катализируемой глюкозооксидазой:



Увеличение оптической плотности раствора пропорционально концентрации глюкозы в образце.

Материал исследования: сыворотка крови, гепаринизированная или ЭДТА плазмы крови.

Реактивы:

- фосфатный буфер, pH=7;
- смесь лиофильно высушенных ферментов;
- депротеинизирующий раствор;
- калибровочный раствор глюкозы 10 ммоль/л.

Оборудование: спектрофотометр или колориметр.

Проведение анализа:

1. Приготовить рабочий реагент: растворить содержимое флакона 2 в дистиллированной воде и количественно перенести в мерную колбу на 100 мл, туда же перенести содержимое флакона 1. Объем раствора довести до метки дистиллированной водой.
2. Приготовить депротеинизирующий раствор: флакон 3 количественно перенести в мерную колбу на 50 мл, довести до метки дистиллированной водой.
3. Рабочий реагент выдержать 5 мин при 37 °С.

4. Провести исследование количества глюкозы в сыворотке крови согласно таблице 17.
5. *Определение концентрации глюкозы по конечной точке.* Перемешать, пробы выдержать 25 мин при 37 °С. Через 5 мин после начала инкубации пробирки интенсивно встряхнуть. После инкубации измерить оптическую плотность опытной и калибровочной проб против рабочего реагента в кювете 10 мм при 510 нм.

Таблица 17

Объем реактивов, необходимых для проведения реакции
в опытной и калибровочной пробах

Отмерить, мкл	Опытная проба	Калибровочная проба
Сыворотка	10	-
Калибратор	-	10
Рабочий реактив	1000	1000

6. *Определение концентрации глюкозы в кинетическом режиме.* Перемешать, каждую пробу (опытные и калибровочные) выдержать точно 5 мин (по секундомеру) при 37 °С и измерить оптическую плотность проб против рабочего реагента.

Расчет:

Расчет концентрации глюкозы производят по формуле:

$$C_{\text{глюкоза}} = E_{\text{оп}}/E_{\text{к}} \times 10 \text{ (ммоль/л)}$$

Референсные величины:

Содержание глюкозы в цельной крови: 3,3–5,5 ммоль/л.

Содержание глюкозы в сыворотке крови: 3,5–5,6 ммоль/л.

Содержание глюкозы в плазме крови: 4,0–6,0 ммоль/л.

Ответить на вопросы:

1. Какие методы определения содержания глюкозы в крови вы знаете?
2. Почему уровень глюкозы в плазме крови выше, чем в сыворотке крови?
3. Какой метод определения содержания глюкозы является более точным?
4. Каковы преимущества и недостатки определения содержания глюкозы с помощью портативного оборудования?
5. Почему содержание глюкозы в венозной крови отличается от капиллярной?

Тест толерантности к глюкозе

Среди лабораторных исследований, предназначенных для выявления нарушений углеводного обмена, весьма важное место приобрел тест на толерантность к глюкозе, глюкозотолерантный тест.

Для его проведения пациент в течение 3 дней должен придерживаться

обычного питания с содержанием углеводов не более 250 г в день.

Утром натощак у больного берут кровь из пальца для определения содержания глюкозы, после чего ему дают выпить заранее приготовленный раствор, содержащий 75 г глюкозы в 300 мл теплой кипяченой воды или в 300 мл жидкого чая с лимоном. Затем через 60 и 120 мин берут из пальца кровь для определения уровня глюкозы.

На основании полученных данных строят график, откладывая на вертикальной оси концентрацию сахара в ммоль/л, а на горизонтальной – время в минутах.

При анализе гликемических кривых обращают внимание на следующие параметры:

- начальное содержание глюкозы в крови,
- быстроту и высоту подъема гликемической кривой,
- продолжительность гипергликемии и характер её снижения.

Референсные величины:

Уровень глюкозы при проведении ГТГ (ммоль/л): натощак – 3,9–5,8; через 30 мин – 6,1–9,4; через 60 мин – 6,7–9,4; через 90 мин – 5,6–7,8; через 120 мин – 3,9–6,7.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ α -АМИЛАЗЫ СЫВОРОТКИ КРОВИ

Актуальность

α -Амилаза (диастаза, 1,4- α -D-глюкангидролаза, КФ 3.2.1.1.) катализирует гидролиз α -1,4-глюкозидных связей крахмала, гликогена и родственных им полисахаридов до мальтозы, декстринов и других полимеров. В крови она представлена двумя изоферментами: панкреатическим – Р-тип и слюнным – S-тип.

Существующие методы определения активности α -амилазы делятся на 2 группы:

- метод конечной точки, который основан на определении остатка нерасщепленного крахмала по степени интенсивности его реакции с йодом (метод Каравея);
- метод кинетический.

Определение активности α -амилазы сыворотки крови амилокластическим методом

Цель работы:

Научиться определять активность α -амилазы амилокластическим методом в сыворотке крови.

Задания для самостоятельной работы:

1. Познакомиться с инструкцией соответствующего метода.

2. Подготовить реактивы.
3. Оборудовать рабочее место для лабораторной работы.
4. Выполнить практическую работу с использованием проб сыворотки крови.
5. Сделать необходимые расчеты.
6. Заполнить бланк анализа. Оценить полученные результаты
7. Сделать вывод по работе.

Принцип метода:

α -Амилаза гидролизует крахмал с образованием конечных продуктов, не дающих цветной реакции с йодом. Об активности амилазы судят по уменьшению интенсивности окраски.

Материал исследования: сыворотка крови, гепаринизированная или ЭДТА плазмы крови.

Реактивы:

- Реагент № 1: 20 ммоль/л фосфатный буфер, рН 6,9.
- Реагент № 2: концентрированный субстрат крахмал по Lintner – 10 мг/мл.
- Реагент № 3: концентрированный раствор йода 12,7 мг/мл.
- Реагент № 4: раствор фторида калия 4,3 моль/л.
- Реагент № 5: кислота соляная 1,6 моль/л.

Оборудование: спектрофотометр или колориметр.

Проведение анализа:

1. Приготовить реагенты.
Субстратно-буферный раствор: смешать необходимое количество реагентов № 1 и № 2 в соотношении 24:1.
Рабочий раствор йода: разбавить необходимое количество реагентов № 3 и № 4 дистиллированной водой в соотношении 1:2:7.
Рабочий раствор соляной кислоты: развести необходимое количество реагента № 5 дистиллированной водой в соотношении 1:15.
2. Смешать приготовленные реактивы согласно таблице 18.
3. Пробы перемешать и инкубировать при комнатной температуре в течение 5 мин. Измерить оптическую плотность опытной и контрольной проб против воды при длине волны 630–690 нм.

Процедура анализа

Реактивы	Опытная проба	Контрольная проба
Субстратно-буферный раствор, мл	0,500	0,500
Инкубация при t 37 °С, 5 мин		
Исследуемый материал, мл	0,010	-
Перемешать и инкубировать при t 37 °С, 5 мин		
Рабочий раствор соляной кислоты, мл	4,0	4,0
Исследуемый материал, мл	-	0,010
Рабочий раствор йода, мл	0,300	0,300

Расчет:

Активность амилазы показывает количество крахмала в мг, гидролизованного 1 л биологической жидкости за 1 с при t 37 °С (мг/с·л)

$$A = \frac{(E \text{ контр.} - E \text{ оп.}) \times C \times t \times K}{E \text{ контр.}} \quad \text{или} \quad A = \frac{(E \text{ контр.} - E \text{ оп.}) \times 66,6}{E \text{ контр.}}, \text{ где}$$

E оп. – оптическая плотность опытной пробы;

E контр. – оптическая плотность контрольной пробы;

C – коэффициент пересчета на 1 мг крахмала;

t – время, с;

K – коэффициент пересчета на 1 л жидкости.

Референсные величины:

Активность α-амилазы в выворотке крови составляет 3,3–8,9 мг/с·л или 16–30 г/ч·л.

Определение активности α-амилазы сыворотки крови энзиматическим кинетическим методом

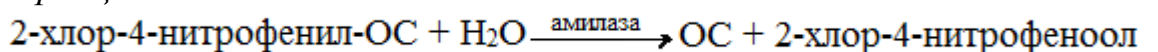
Цель работы:

Научиться определять активность α-амилазы энзиматическим кинетическим методом в сыворотке крови.

Задания для самостоятельной работы:

1. Познакомиться с инструкцией соответствующего метода.
2. Подготовить реактивы.
3. Оборудовать рабочее место для лабораторной работы.
4. Выполнить практическую работу с использованием проб сыворотки крови.
5. Сделать необходимые расчеты.
6. Заполнить бланк анализа. Оценить полученные результаты
7. Сделать вывод по работе.

Принцип метода:



где ОС – олигосахарид.

Скорость образования 2-хлор-4-фенола пропорциональна активности фермента и определяется фотометрически при длине волны 405 нм.

Исследуемый материал: сыворотка крови.

Материал исследования: сыворотка крови, гепаринизированная или ЭДТА плазмы крови.

Реактивы:

- Реагент № 1. Буфер 50 мл: MES-буфер, рН 6,0; кальций хлористый – 5 ммоль/л.
- Реагент № 2. Субстрат (лиофилизат); концентрация в рабочем реагенте 2,5 ммоль/л.

Проведение анализа:

1. Приготовить реагенты.
Рабочий реагент: реагент № 2 с субстратом растворить при аккуратном перемешивании в буфере. Рабочий реагент готов к использованию через 3–5 мин.
2. Непосредственно в кювете фотометра с длиной оптического пути 1 см при 37 °С смешать рабочий реагент и сыворотку крови в соотношении 50:1 и через 10 с измерить оптическую плотность при длине волны 405 нм против воздуха.
3. Повторить измерения точно через 1, 2 и 3 мин определить среднее изменение оптической плотности в мин (ΔЕ/мин).

Расчет:

Расчет активности α-амилазы:

$$\Delta E/\text{мин} \cdot 3806 = \text{Ед/л или } \Delta E/\text{мин} \cdot 63446 = \text{нмоль/с} \cdot \text{л}$$

Референсные величины:

Активность α-амилазы в сыворотке крови энзиматическим кинетическим методом находится в интервале до 220 Ед/л или до 3670 нмоль/с . л

Ответить на вопросы:

1. Какова эффективность энзиматического кинетического метода?
2. Какой метод является более точным, более чувствительным?
3. Назовите особенности амилокластического и энзиматического методов?
4. Какой из методов основан на измерении количества субстрата, какой – на измерении количества продукта реакции?
5. К какому классу ферментов относится амилаза?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ

Актуальность

Щелочная фосфатаза – фосфогидролаза моноэфиров ортофосфорной кислоты, присутствует в каждом органе, больше всего вырабатывается в печени, костях, кишечнике, эндометрии (плаценте), легких. Активность фермента возрастает у детей в периоде быстрого роста, у женщин в последнем триместре беременности, после менопаузы. Располагается ЩФ на поверхности цитоплазматических мембран; наличие изоформ ЩФ в сыворотке крови связано с тем, что в организме человека биосинтез фермента кодируют три гена: печеночный, костный и почечный.

Щелочная фосфатаза (щелочная фосфогидролипаза моноэстеров ортофосфорной кислоты) расщепляет в N-метил-D-глюкаминовом буфере 4-нитрофенилфосфат с образованием 4-нитрофенола и фосфата. Щелочная фосфатаза (ЩФ) активирована хлоридом магния. Мерой каталитической концентрации фермента является количество освобожденного 4-нитрофенола, который определяют фотометрически, либо кинетическим методом, либо методом постоянного времени после остановки ферментативной реакции ингибитором ЩФ, который блокирует активный центр фермента. Кинетическим методом можно без разведения анализировать сыворотки до каталитической концентрации ЩФ 30 мккат/л. Методом константного времени можно без разведения анализировать пробы до 7 мккат/л. При каталитической концентрации ЩФ, превышающей эти величины, пробы следует развести физиологическим раствором и анализ произвести повторно (результат умножить на разведение). Объемы отдельных растворов и пробы можно модифицировать при условии соблюдения взаимных соотношений объемов, указанных в описании хода инкубационной смеси.

Определение активности щелочной фосфатазы кинетическим методом и по «конечной точке»

Цель работы:

Научиться определять активность щелочной фосфатазы в сыворотке крови кинетическим методом и «по конечной точке».

Задания для самостоятельной работы:

1. Познакомиться с инструкцией выполнения анализа.
2. Подготовить реактивы.
3. Оборудовать рабочее место для лабораторной работы.
4. Выполнить лабораторную работу с использованием проб сыворотки крови и контрольной сыворотки.
5. Сделать необходимые расчеты.
6. Заполнить бланк анализа. Оценить полученные результаты.

7. Сделать вывод по работе.

Принцип метода:

п-Нитрофенилфосфат + H₂O → п-нитрофенол + фосфат

Материал исследования: сыворотка крови.

Реактивы:

– Реагент 1 (P1): буферный раствор диэтаноламина (ДЭА) с магнием хлористым.

– Реагент 2 (P2): раствор п-нитрофенилфосфата.

Концентрация реагентов в рабочем растворе: буфер ДЭА – 1 ммоль/мл; п-нитрофенилфосфат – 5 мкмоль/мл; магний хлористый – 0,5 мкмоль/мл.

Оборудование: спектрофотометр или колориметр.

Проведение анализа:

1. Приготовить рабочий реактив.

Смешать 4 объема P1 и объем P2. Рабочий реагент стабилен в течение 1 мес при температуре 2–8 °С, 5 сут при 18–25 °С, 3 мес. при -20 °С.

2. *Однореагентная процедура (запуск реакции образцом).* Довести температуру рабочего реагента до температуры анализа. К 1000 мкл рабочего реагента добавить 20 мкл сыворотки, перемешать и поместить в термостатируемое кюветное отделение анализатора. Через 1 мин начать считывание оптической плотности через равные промежутки времени в течение 1–3 мин. Количество считываний должно быть не менее трех. Рассчитать среднее изменение оптической плотности за 1 мин (ΔЕ/мин). Если ΔЕ/мин превышает 0,43 (активность ЩФ более 1200 Е/л) сыворотку развести в 5 раз физиологическим раствором, повторить анализ и результат умножить на 5.

3. *Двухреагентная процедура (запуск реакции субстратом).* Довести температуру P1 и P2 до температуры анализа. К 800 мкл P1 добавить 20 мкл сыворотки, перемешать и выдержать при температуре 37 °С в течение 1–5 мин. Затем добавить 200 мкл P2 и далее проводить анализ, как описано в однореагентной процедуре.

Расчет:

Активность ЩФ (А) в Е/л рассчитать по формуле:

$$A = \Delta E / \text{мин} \times \text{фактор},$$

где значение фактора равно 2757.

4. Набор может быть использован для проведения анализа методом константного времени. Для остановки реакции приготовить раствор натрия гидроокиси, 0,5 моль/л (20 г/л).

Довести температуру рабочего реагента до температуры анализа. К 1000 мкл рабочего реагента прибавить 10 мкл пробы, перемешать, выдержать ровно 5 мин при температуре 37 °С и добавить 1000 мкл раствора натрия гидроксида. Перемешать и измерить оптическую плотность (Е) против холостой пробы. Окраска стабильна 30 мин.

Расчет:

Активность ЩФ (А) в Е/л рассчитать по формуле:

$$A = E \cdot \text{фактор},$$

где значение фактора равно 2173.

Референсные величины:

Активность ЩФ при температуре 37 °С:

- взрослые: 70–270 Е/л,
- дети 3–15 лет: 240–900 Е/л.

Ответить на вопросы:

1. Назовите особенности кинетического и константного методов.
2. Перечислите необходимое оборудование для определения активности ЩФ с остановкой реакции.
3. Каково значение коэффициента миллимолярной поглощения для п-нитрофенола?

4.9. Ферментативные методы определения содержания метаболитов

Ферментативные методы анализа – это методы количественного определения химических веществ в растворе, основанные на использовании ферментов. С помощью ферментативных методов определяют вещества, способные участвовать в химических реакциях, катализируемых ферментами, а также являющиеся активаторами либо ингибиторами ферментов. Они характеризуются высокой чувствительностью и специфичностью, поскольку ферменты катализируют превращения веществ с большой скоростью и высоко избирательно, даже если анализируемое соединение находится в смеси с др. близкими по химическому строению веществами.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ КРЕАТИНИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Определение содержания креатинина в сыворотке крови псевдокинетическим методом Яффе без депротеинизации

Актуальность

Наиболее используемыми методами определения концентрации креатинина являются колориметрические, основанные на реакции Яффе – реакция аро-

матических нитровеществ (пикриновая кислота) с веществами, содержащими активную метиленовую ($=\text{CH}$) или метиновую ($\equiv\text{CH}$) группы. Методы отличаются по способу осаждения белков плазмы или сыворотки (вольфраматом натрия, пикриновой кислотой, трихлоруксусной кислотой). Они недостаточно специфичны, поскольку в той же области спектра поглощают также другие хромогены, такие как пикраты пировиноградной и ацетоуксусной кислоты, ацетона, глюкозы, производных креатинина. Метод с осаждением белков при помощи пикриновой кислоты (метод Поппера) является наиболее точным, так как, вероятно, при этом часть креатиноподобных хромогенов удаляется.

Креатинин в щелочной среде образует с пикриновой кислотой продукт оранжевого цвета (реакция Яффе), скорость образования которого пропорциональна концентрации креатинина в пробе.

Цель работы:

Научиться определять содержание креатинина в сыворотке крови и моче псевдокинетическим методом.

Задания для самостоятельной работы:

1. Оборудовать рабочее место для лабораторной работы.
2. Подготовить рабочий реагент, пробы сыворотки крови и мочи.
3. Провести анализ проб.
4. Заполнить бланк анализа. Оценить полученные результаты.
5. Сделать выводы по работе.

Принцип метода:

Скорость образования окрашенного комплекса с пикриновой кислотой в щелочной среде пропорциональна концентрации креатинина в пробе.

Материал исследования: сыворотка крови и разбавленная в 50 раз проба суточной мочи.

Реактивы:

- Реагент № 1: пикриновая кислота.
- Реагент № 2: натр едкий.
- Калибратор: раствор креатинина 177 мкмоль/л.

Оборудование: спектрофотометр или колориметр.

Проведение анализа:

1. Приготовить реагенты.
Рабочий реагент: для исследования смешать необходимые количества реагентов № 1 и № 2 в соотношении 1:1. Нагреть рабочий реагент до температуры 37 °С.

2. Провести анализ в термостатированной (37 °С) фотометрической кювете с длиной оптического пути 1 см при длине волны 505 нм против воздуха. В кювете смешать рабочий реагент и исследуемый материал или калибратор в соотношении 5:1 (например, 1 мл рабочего реагента и 0,2 мл исследуемого материала). Через 1 мин измерить оптическую плотность (E1). Повторить измерение точно через 60 с (E2).
3. Вычислить величину $\Delta E = E2 - E1$. Условия проведения анализа для калибратора должны быть строго идентичными.

Расчет:

В сыворотке, плазме:

$$C = \frac{\Delta E \text{ пробы}}{\Delta E \text{ калибратора}} \times 177 \text{ мкмоль/л}$$

В моче:

$$C = \frac{\Delta E \text{ пробы}}{\Delta E \text{ калибратора}} \times 8,85 \times V \text{ ммоль/сутки}$$

, где

ΔE пробы – изменение оптической плотности пробы;

ΔE – калибратора изменение оптической плотности калибровочной пробы;

177 мкмоль/л – концентрация креатинина в калибраторе;

8,85 – коэффициент пересчета;

V – объем суточной мочи.

Референсные величины:

Сыворотка/плазма:

– мужчины: 53–97 мкмоль/л;

– женщины: 44–80 мкмоль/л.

Моча: 4,4–17,6 ммоль/сут.

Ответить на вопросы:

1. На каком принципе основана реакция Яффе?
2. Почему метод называется псевдокинетическим?
3. При какой длине волны проводится анализ?
4. С какой целью определяют содержание креатинина в сыворотке крови и моче?
5. Какова концентрация креатинина в калибраторе?

Определение концентрации креатинина в сыворотке крови ферментативным методом

Актуальность

Ферментативные методы определения концентрации креатинина в сыворотке крови подразделяются на 2 группы, в зависимости от фермента, применяемого в методе:

- с ферментом креатинкиназой;

– с использованием ферментов пируваткиназы и лактатдегидрогеназы.

В первом случае, метод достаточно точен, но его применение ограничено использованием специальной аппаратуры. Во втором случае – метод характеризуется низкой специфичностью и крайне дорогостоящ.

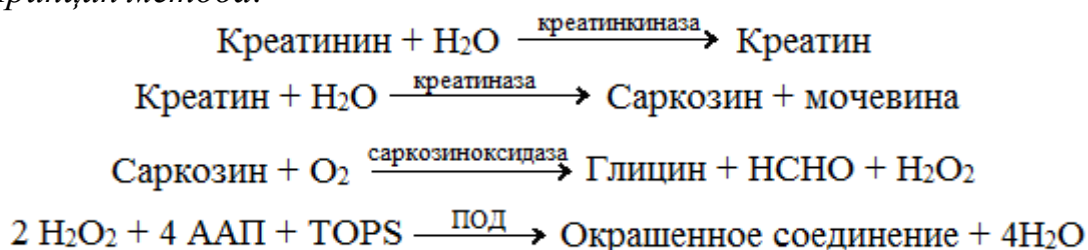
Цель работы:

Научиться определять содержание креатинина в сыворотке крови ферментативным методом.

Задания для самостоятельной работы:

1. Оборудовать рабочее место для лабораторной работы.
2. Подготовить рабочий реагент, пробы сыворотки крови и мочи.
3. Провести анализ проб.
4. Заполнить бланк анализа. Оценить полученные результаты.
5. Сделать выводы по работе.

Принцип метода:



Материал исследования: негемолизированная сыворотка или плазма крови, без следов липемии, иктеричности.

Реактивы:

- Реагент 1 (Р1): раствор креатиназы, саркозиноксидазы, каталазы, аскорбатоксидазы, ТОПС;
- Реагент 2 (Р2): раствор креатининазы, пероксидазы, 4-аминоантипирина;
- Калибратор: калибровочный раствор креатинина 240 мкмоль/л.

Оборудование: спектрофотометр или колориметр.

Проведение анализа:

1. Выбрать условия проведения анализа:
 - длина волны – 546 (520 – 570) нм;
 - длина оптического пути – 10 мм;
 - температура – 37 °С.
2. Довести температуру Р1 и Р2 до температуры анализа.
3. Компоненты реакционной смеси для определения содержания креатинина внести в пробирки в соответствии с таблицей 19.
4. Концентрацию креатинина (С) в анализируемом образце в мкмоль/л рассчитать по формуле:

$$C = \frac{\Delta E_{\text{оп}}}{\Delta E_{\text{кал}}} \times 240, \text{ где}$$

$\Delta E_{\text{оп}} = E_{\text{оп}_2} - 0,83 \times E_{\text{оп}_1}$;

$\Delta E_{\text{кал}} = E_{\text{кал}_2} - 0,83 \times E_{\text{кал}_1}$;

240 – концентрация креатинина в калибраторе, мкмоль/л.

Если концентрация креатинина в образце превышает 3500 мкмоль/л, образец разбавить дист. водой в 5 раз, анализ повторить, результат умножить на 5.

Таблица 19

Объемы реагентов, необходимых для проведения реакции в опытной, калибровочной и контрольной пробах

Отмерить, мкл	Опытная проба	Калибровочная проба	Контрольная (холостая) проба
Реагент 1	800	800	800
Образец (О)	30	-	-
Калибратор	-	30	-
Вода дистил.	-	-	30
Пробы перемешать, выдержать 5 мин при $t 37^\circ\text{C}$. Измерить оптическую плотность опытной ($E_{\text{оп}_1}$) и калибровочной ($E_{\text{кал}_1}$) против контрольной (холостой) пробы.			
Реагент 2	200	200	200
Пробы перемешать, выдержать 5 мин при $t 37^\circ\text{C}$. Измерить оптическую плотность опытной ($E_{\text{оп}_2}$) и калибровочной ($E_{\text{кал}_2}$) против контрольной (холостой) пробы.			

Референсные величины:

Содержание креатинина в сыворотке/плазме у мужчин составляет 53–97 мкмоль/л; у женщин – 44–80 мкмоль/л.

Ответить на вопросы:

1. Каковы преимущества энзиматического метода определения креатинина?
2. В каком диапазоне концентраций креатинина можно использовать ферментативный ПАП метод?
3. Что представляет собой холостая проба?
4. На каком оборудовании возможно проведение анализа этим методом?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ХОЛЕСТЕРОЛА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Определение концентрации общего холестерина в сыворотке крови ферментативным методом

Актуальность

Общий холестерол (холестерин) относится к многоатомным циклическим спиртам. В организме человека это соединение выполняет огромное количество функций. При патологических состояниях его содержание может меняться. Опасно как понижение концентрации, так и ситуация, когда уровень холестерола повышен.

Цель работы:

Научиться определять содержание холестерола в сыворотке крови.

Задания для самостоятельной работы:

1. Оборудовать рабочее место для практической работы.
2. Подготовить реагенты, оборудование.
3. Провести анализ проб.
4. Заполнить бланк анализа. Оценить полученные результаты.
5. Сделать выводы по работе.

Принцип метода:

При гидролизе эфиров холестерола холестеролэстеразой образуется свободный холестерол, образовавшийся и имеющийся в пробе холестерол окисляется кислородом воздуха под действием холестеролоксидазы с образованием эквимольного количества перекиси водорода. Под действием пероксидазы перекись водорода окисляет хромогенные субстраты с образованием окрашенного продукта. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации холестерола в пробе.

Материал исследования: негемолизированная сыворотка или плазма крови.

Реактивы:

- реагент (Р): буферный раствор, холестеролэстераза, холестеролоксидаза, пероксидаза, 4-аминоантипирин, фенол, стабилизаторы;
- калибратор: калибровочный раствор холестерола, 4,65 ммоль/л.

Оборудование: спектрофотометр или колориметр.

Проведение анализа:

1. Выбрать условия проведения анализа:
 - длина волны – 500 (490–520) нм

- длина оптического пути – 10 мм
 - температура – 37 °С.
2. Довести температуру рабочего реагента до температуры анализа.
 3. Компоненты реакционной смеси для определения содержания холестерина внести в пробирки в соответствии с таблицей 20.
 4. Пробы перемешать, выдержать 5 мин при температуре 37 °С и измерить оптическую плотность опытных (Е) и калибровочной (Е_к) проб против реагента. Окраска стабильна в течение 1 ч.

Таблица 20

Объемы реагентов, необходимых для проведения реакции
в опытной и калибровочной пробах

Отмерить, мкл	Опытная проба	Калибровочная проба
Реагент	1000	1000
Проба	10	-
Калибратор	-	10

Расчет:

Концентрацию холестерина (С) в анализируемом образце в ммоль/л рассчитать по формуле:

$$C = E / E_{к} \cdot 4,65, \text{ где}$$

4,65 – концентрация холестерина в калибраторе, ммоль/л

Референсные величины:

Рекомендуемое значение холестерина в сыворотке/плазме крови менее 5,2 ммоль/л. Допустимое – 5,2–6,5 ммоль/л. Патологическое значение – более 6,5 ммоль/л.

Ответить на вопросы:

1. На каком принципе основано ферментативное определение содержания холестерина?
2. Какие компоненты входят в состав Реагента?
3. Что представляет собой холостая проба?
4. Для какого оборудования разработан ферментативный метод?
5. Что означает «рекомендуемое» и «допустимое» значения?

Определение фракций холестерина в сыворотке крови

Актуальность

Холестерол сыворотки крови человека находится не в свободном состоянии. В кровотоке это соединение связано с белками-переносчиками. Они называются липопротеидами. Мембраны клеток же включают в себя свободный холестерол. Различают липопротеиды низкой (ЛПНП), очень низкой (ЛПОНП) и

высокой плотности (ЛПВП). Они состоят не только из холестерина, но также из фосфолипидов, белков и кофакторов. Все они синтезируются печенью.

Цели работы:

Научиться определять содержание холестерина во фракции ЛПВП и рассчитывать содержание ЛПНП в сыворотке крови.

Задания для самостоятельной работы:

1. Оборудовать рабочее место для лабораторной работы.
2. Подготовить реагенты, оборудование.
3. Определить содержание фракций холестерина в сыворотке крови и в контрольной сыворотке.
4. Заполнить бланк анализа. Оценить полученные результаты.
5. Сделать выводы по работе.

Принцип метода:

Хиломикроны, ЛПОНП и ЛПНП осаждаются при добавлении к образцу фосфорно-вольфрамовой кислоты и ионов магния. После центрифугирования в супернатанте остаются только ЛПВП, концентрация которых определяется также, как концентрация общего холестерина.

Материал исследования: негемолизированная сыворотка крови.

Реактивы:

- Осаждающий реагент (Р): раствор фосфорновольфрамовой кислоты и магния хлористого.
- Калибратор: калибровочный раствор холестерина, 1,29 ммоль/л.
- Реагент для определения общего холестерина.

Оборудование: спектрофотометр или колориметр.

Проведение анализа:

1. Провести реакцию преципитация. Внести реактивы в пробы согласно таблице 21.

Таблица 21

Объемы реагентов, необходимых для проведения реакции в опытной и калибровочной пробах

Отмерить, мкл	Опытная проба	Калибровочная проба
Осаждающий реагент	500	500
Проба	200	-
Калибратор	-	200

2. Пробы перемешать, выдержать 10 мин при комнатной температуре. Центрифугировать 10 мин при 4000 об/мин. Прозрачный супернатант исполь-

зовать для определения концентрации ЛПВП. Определите концентрацию холестерина во всех пробах в течение 1 часа.

3. Выбрать условия для определения концентрации ЛПВП-холестерола:
 - длина волны – 500 (490–520) нм;
 - длина оптического пути – 10 мм;
 - температура 37 °С.
4. Довести температуру рабочего реагента (для определения содержания общего холестерина) до температуры анализа.
5. Внести реактивы в пробы согласно таблице 22.

Таблица 22

Объемы реагентов, необходимых для проведения реакции в опытной, и калибровочной пробах

Отмерить, мкл	Опытная проба	Калибровочная проба
Рабочий реагент	1000	1000
Супернатант	100	-
Калибратор 1,29 ммоль/л	-	100

6. Пробы перемешать, выдержать 10 мин при температуре 37 °С. Измерить оптическую плотность опытных (E) и калибровочной (E_к) проб против рабочего реагента.

Расчет:

Концентрацию концентрации ЛПВП (С) в анализируемом образце рассчитать по формуле:

$$C = E/E_k \cdot 1,29, \text{ где}$$

1,29 – концентрация холестерина в калибраторе, ммоль/л

Референсные величины:

Концентрация ЛПВП у мужчин равна 0,90–1,80 ммоль/л, у женщин – 1,00–2,10 ммоль/л.

Расчет концентрации ЛПНП (С) и ИА (индекс атерогенности) производится по следующим формулам:

$$C = (\text{Общий холестерол}) - (\text{ЛПВП-холестерол}) - (\text{ТАГ}/2,2) \text{ ммоль/л}$$

$$\text{ИА} = (\text{Общий ХС} - \text{ХС-ЛПВП}) / (\text{ХС-ЛПВП})$$

В норме содержание ХС-ЛПНП в сыворотке крови ниже 3,5 ммоль/л, повышенные значения: 3,5–4,0 ммоль/л, высокие – более 4,0 ммоль/л.

Индекс атерогенности у здоровых мужчин – 2,5; у здоровых женщин – 2,2; у лиц с ИБС – более 4, достигая 5–6 единиц.

Ответить на вопросы:

1. В чем заключается принцип разделения фракций ЛПВП и ЛПНП?
2. Какой калибратор используется для определения содержания ЛПВП?

3. С какой целью используется контрольная сыворотка?
4. В каких пределах находится содержание холестерина во фракции ЛПВП?
5. Как определяется содержание холестерина ЛПНП и индекс атерогенности?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ТРИАЦИЛГЛИЦЕРИДОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Актуальность

Триглицериды в крови – важный показатель, применяемый наряду с уровнем холестерина для оценки риска развития атеросклероза. Они являются самым распространенным видом жиров в организме, потому обеспечивают человека энергией. Лишние калории, поступающие вместе с едой, откладываются в жировых клетках в виде триглицеридов. При этом совершенно неважно, из какого вида пищи поступает энергия, будь то жиры, белки или углеводы. Триглицериды образуются из любых источников. Переработкой и созданием триглицеридов в организме занимается печень.

Основными источниками триглицеридов являются:

- животные жиры, то есть, источники твердых, насыщенных жиров;
- растительные жиры: масло подсолнечное, кукурузное, они относятся к полинасыщенным жирным кислотам.

Цель работы:

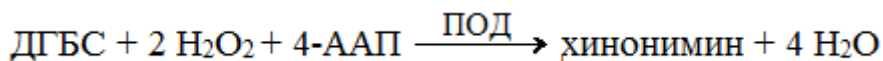
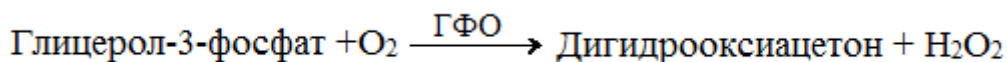
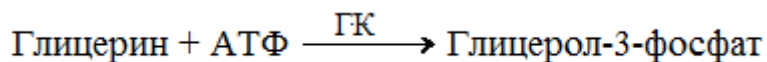
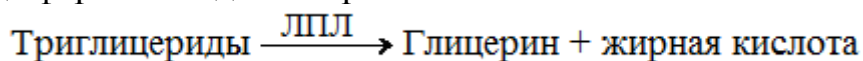
Научить определять содержание триацилглицеридов в сыворотке крови.

Задания для самостоятельной работы:

1. Познакомиться с инструкцией выполнения анализа.
2. Оборудовать рабочее место для лабораторной работы.
3. Выполнить лабораторную работу с использованием проб сыворотки крови и контрольной сыворотки.
4. Заполнить бланк анализа. Оценить полученные результаты.
5. Сделать вывод по работе.

Принцип метода:

Ферментативный колориметрический метод: триацилглицериды при воздействии ряда ферментов дают образование хинонимина.



Интенсивность окраски реакционной смеси прямо пропорциональна концентрации триацилглицеридов в пробе.

Материал исследования: негемолизированная сыворотка крови.

Реактивы:

- Реагент (Р): монореагент, готовый к использованию.
- Калибратор: раствор глицерина, эквивалентный концентрации триглицеридов 2,29 ммоль/л.

Оборудование: спектрофотометр или колориметр.

Проведение анализа:

1. Выбрать условия для определения
 - длина волны – 546 (492–546) нм;
 - длина оптического пути – 10 (3,5) мм;
 - температура 18–25 °С.
2. Довести температуру рабочего реагента и калибратора до температуры анализа.
3. Внести реактивы в пробы согласно таблице 23.

Таблица 23

Объемы реагентов, необходимых для проведения реакции
в опытной и калибровочной пробах

Отмерить, мкл	Опытная проба	Калибровочная проба
Калибратор	-	10
Образец (О)	10	-
Реагент	1000	1000

4. Пробы перемешать, выдержать 5 мин при комнатной температуре (18–25 °С). Измерить оптическую плотность опытных (Е) и калибровочной (Е_к) против реагента.

Расчет:

Концентрацию триацилглицеридов (С) в анализируемом образце в ммоль/л рассчитать по формуле:

$$C = E/E_k \cdot 2.29 \text{ ммоль/л, где}$$

2,29 – это концентрация триглицеридов в калибраторе, ммоль/л.

Референсные величины:

Концентрация триацилглицеридов в сыворотке крови – до 1,7 ммоль/л. В группах риска их концентрация находится в пределах 1,71–2,25 ммоль/л. При патологии концентрация триацилглицеридов – более 2,26 ммоль/л.

Ответить на вопросы:

1. На чем основан принцип колориметрического ферментативного метода?

2. Каким образом осуществляется расчет концентрации триацилглицеридов в пробе?
3. Что используется в качестве калибратора?
4. С какой целью используется контрольная сыворотка?
5. Каким образом можно проверить правильность выполнения анализа?
6. Для какого оборудования предназначен метод?

СЕМИНАР

БИОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В МЕДИЦИНЕ

Вопросы для самоподготовки:

1. Значение биохимических исследований в оценке состояния здоровья. Выбор методов исследования. Основные единицы СИ в биохимии. Унификация биохимических методик. Стандартизация исследований. Интерпретация лабораторных показателей.
2. Скрининговые исследования, использование стрип-технологий. Особенности определения содержания метаболитов и активности ферментов в плазме, сыворотке крови и моче.
3. Объем биохимических исследований при заболеваниях печени. Клинические и биохимические синдромы при заболеваниях печени. Принципы оценки функций печени по активности сывороточных ферментов. Энзимодиагностика заболеваний печени.
4. Билирубин, свойства, образование свободного и конъюгированного билирубина. Фракции билирубина в крови, моче, кале. Билирубинемия, показатели для дифференциальной диагностики желтух.
5. Рациональные биохимические исследования при заболеваниях сердечно-сосудистой системы. Нарушения липидного обмена при атеросклерозе. Гиперхолестеролемии, дислипотеинемии.
6. Инфаркт миокарда, факторы риска. Кардиоспецифические маркеры.
7. Биохимические исследования при заболеваниях поджелудочной железы. Панкреатиты, изучение активности амилазы. Сахарный диабет, клинические признаки и лабораторные показатели. Оценка компенсации сахарного диабета. Осложнения сахарного диабета, биохимические исследования.
8. Биохимические исследования при заболеваниях почек. Физиологические компоненты мочи, мочевины, креатинина. Протеинурии, оценка типов протеинурий.
9. Белки плазмы крови. Характеристика белковых фракций. Электрофоретические методы. Протеинограммы.

Контрольные вопросы:

1. Скрининговые исследования, использование стрип-технологий.
2. Электрофорез белков сыворотки крови на ацетатцеллюлозной пленке.
3. Принципы оценки функций печени по активности сывороточных ферментов.

4. Использование кинетических методов и фотометрические исследования по конечной точке.
5. Объем биохимических исследований при заболеваниях печени.
6. Рациональные биохимические исследования при заболеваниях сердечно-сосудистой системы.
7. Биохимические исследования при заболеваниях поджелудочной железы.
8. Биохимические исследования при заболеваниях почек.

Темы докладов, рефератов:

1. Качество лабораторных исследований.
2. Физико-химические методы исследования.
3. Иммуноферментные методы исследования в биохимии.
4. Биохимические исследования в клинико-диагностических лабораториях.
5. Унификация биохимических методик. Стандартизация исследований. Интерпретация лабораторных показателей.
6. Хроматография: распределительная, проникающая, адсорбционная, ионообменная и аффинная виды хроматографии.
7. Электрофорез. Физико-химическая основа метода. Диск-электрофорез.
8. Фотометрия и спектрофотометрия.
9. Основные законы светорассеивания. Нефелометрия и турбидиметрия.
10. Флуоресцентная спектроскопия. Спектры флуоресценции и спектры возбуждения. Флуоресцентные красители и флуоресцентные зонды.
11. Проточная цитометрия: физические и биологические характеристики клеточной суспензии, выявляемые методом проточной цитометрии.
12. Люминесценция и хемилюминесценция. Физико-химические явления, лежащие в основе хемилюминесценции.
13. Хемилюминесценция, как основной метод изучения свободнорадикальных процессов в живых системах. Хемилюминометры.
14. Масс-спектрометрия в анализе химического строения биомолекул.
15. Объем биохимических исследований при заболеваниях печени. Принципы оценки функций печени по активности сывороточных ферментов. Энзимодиагностика заболеваний печени.
16. Билирубин, свойства, образование свободного и конъюгированного билирубина. Фракции билирубина в крови, моче, кале.
17. Нарушения липидного обмена при атеросклерозе. Гиперхолестеролемии, дислипидопроteinемии.
18. Инфаркт миокарда, кардиоспецифические маркеры.
19. Биохимические исследования при панкреатите, изучение активности амилазы.
20. Сахарный диабет, лабораторные биохимические показатели. Оценка компенсации сахарного диабета.
21. Осложнения сахарного диабета, биохимические исследования.
22. Биохимические исследования при заболеваниях почек.
23. Протеинурии. Оценка типов протеинурий.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Выберите один правильный ответ.

1. КАТАЛ – ЭТО ЕДИНИЦА, ОТРАЖАЮЩАЯ

- 1) коэффициент молярной экстинкции
- 2) концентрацию ингибитора
- 3) активность фермента
- 4) константу Михаэлиса–Ментен

2. АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ РЕКОМЕНДУЕТСЯ ОПРЕДЕЛЯТЬ ФОТО-
МЕТРИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ НА ОСНОВЕ

- 1) принципа «псевдокинетического определения»
- 2) принципа «кинетического определения»
- 3) принципа «конечной точки»
- 4) принципов «кинетического определения» и «конечной точки»

3. В ПЛАЗМЕ КРОВИ В ОТЛИЧИЕ ОТ СЫВОРОТКИ СОДЕРЖИТСЯ

- 1) белок
- 2) глюкоза
- 3) альбумин
- 4) фибриноген

4. ЭТАП ЛАБОРАТОРНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ, КОТОРЫЙ ВЫПОЛНЯЕТСЯ
ТОЛЬКО В ЛАБОРАТОРИИ,

- 1) преаналитический
- 2) внелабораторный
- 3) внутрिलाбораторный
- 4) аналитический

5. ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ОПРЕДЕЛЯЕТСЯ КАК

- 1) доля положительных результатов среди больных
- 2) доля отрицательных результатов среди больных
- 3) доля отрицательных результатов среди здоровых лиц
- 4) доля положительных результатов среди здоровых лиц

6. ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ОПРЕДЕЛЯЕТСЯ КАК

- 1) доля положительных результатов среди здоровых лиц
- 2) доля отрицательных результатов среди здоровых лиц
- 3) доля отрицательных результатов среди больных
- 4) доля положительных результатов среди больных

7. КОНТРОЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ ПОЗВОЛЯЮТ ОЦЕНИТЬ

- 1) нормальность значения
- 2) точность результата
- 3) правильность метода
- 4) чувствительность метода

8. СООТВЕТСТВИЕ МЕЖДУ ЧИСЛОМ ОБОРОТОВ И ЦЕНТРОБЕЖНЫМ УСКОРЕНИЕМ ОПРЕДЕЛЯЕТСЯ ПО

- 1) гистограмме
- 2) номограмме
- 3) калибровочной кривой
- 4) полярограмме

9. К КРИТЕРИЯМ КАЧЕСТВА ИЗМЕРЕНИЙ ОТНОСИТСЯ

- 1) диапазон
- 2) предел измерения
- 3) точность
- 4) нормальность значения

10. АНАЛИТИЧЕСКАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ХАРАКТЕРИЗУЕТ

- 1) диапазон концентраций показателя
- 2) верхнюю и нижнюю границы нормы
- 3) отличие от нижней границы нормы
- 4) наименьшие различия между концентрациями вещества

11. ОСНОВНЫМ СТАТИСТИЧЕСКИМ ПАРАМЕТРОМ, ИСПОЛЬЗУЕМЫМ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) дисперсия
- 2) среднеквадратичное отклонение
- 3) медиана
- 4) мода

12. ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ РЕКОМЕНДУЕТСЯ ИСПОЛЬЗОВАТЬ

- 1) водные растворы субстратов
- 2) донорскую кровь
- 3) реактивы зарубежных фирм
- 4) промышленную сыворотку (жидкую или лиофилизированную)

13. ПРАВИЛЬНОСТЬ ИЗМЕРЕНИЯ – ЭТО КАЧЕСТВО ИЗМЕРЕНИЯ, ОТРАЖАЮЩЕЕ

- 1) близость результатов измерения к величине контрольного материала
- 2) близость результатов измерений, выполняемых в одинаковых условиях

- 3) близость результатов измерений, выполняемых в разных условиях
- 4) близость результатов к установленному значению измеряемой величины

14. ТОЧНОСТЬ ИЗМЕРЕНИЯ – ЭТО КАЧЕСТВО ИЗМЕРЕНИЯ, ОТРАЖАЮЩЕЕ

- 1) близость результатов к установленному значению измеряемой величины
- 2) близость результатов измерений, выполняемых в одинаковых условиях
- 3) близость результатов измерений, выполняемых в разных условиях
- 4) близость к нулю систематических ошибок в их результатах

15. КОЭФФИЦИЕНТ ВАРИАЦИИ ИСПОЛЬЗУЮТ ДЛЯ ОЦЕНКИ

- 1) воспроизводимости метода
- 2) чувствительности метода
- 3) правильности
- 4) специфичности метода

16. КОНТРОЛЬНАЯ СЫВОРОТКА С НЕИЗВЕСТНЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ВЕЩЕСТВА ПОЗВОЛЯЕТ

- 1) выявить систематические ошибки
- 2) выявить случайные ошибки
- 3) построить градуированный график
- 4) проверить правильность результатов

17. СХОДИМОСТЬ ИЗМЕРЕНИЯ – ЭТО КАЧЕСТВО ИЗМЕРЕНИЯ, ОТРАЖАЮЩЕЕ

- 1) близость результатов к истинному значению измеряемой величины
- 2) близость результатов измерений, выполняемых в одинаковых условиях
- 3) близость результатов измерений, выполняемых в разных условиях
- 4) близость к нулю систематических ошибок

18. В ОСНОВЕ ИММУНОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ЛЕЖИТ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ

- 1) преципитата с субстратом
- 2) антитела с антигеном
- 3) сыворотки с иммуноглобулином
- 4) комплемента с носителем

19. В ПЛАЗМЕ КРОВИ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА НА АЦЕТАТЕ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ МОЖНО ВЫДЕЛИТЬ ___ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ

- 1) три

- 2) пять
- 3) десять
- 4) тридцать девять

20. ГРАНИЦА ПЕРЕХОДА МЕЖДУ УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫМ ДИАПАЗОНОМ И ВИДИМОЙ ЧАСТЬЮ СПЕКТРА –

- 1) от 750 нм и более
- 2) 400 нм
- 3) 200–250 нм
- 4) 340 нм

21. ОСНОВНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СВЕТОВОГО ПОТОКА, КОТОРЫЙ ПРОХОДИТ ЧЕРЕЗ РАСТВОР, ПОМЕЩЕННЫЙ В КЮВЕТУ СПЕКТРОФОТОМЕТРА – ЭТО

- 1) полихромный
- 2) поляризованный
- 3) монохромный
- 4) когерентный

22. МОЛЕКУЛА ИЛИ ХИМИЧЕСКАЯ ГРУППА, СПОСОБНАЯ ПОГЛОЩАТЬ ЭНЕРГИЮ КВАНТОВ СВЕТОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ, НЕ ВОЗБУЖДАЯ ВТОРИЧНЫЙ СВЕТОВОЙ ПОТОК – ЭТО

- 1) флуорофор
- 2) ионофор
- 3) хромофор
- 4) люминофор

23. ЭФФЕКТ «МОЛЕКУЛЯРНОГО СИТА» ПРИ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОМ РАЗДЕЛЕНИИ ВЕЩЕСТВ ОБЕСПЕЧИВАЕТ БЫСТРОЕ ДВИЖЕНИЕ

- 1) относительно крупных молекул
- 2) относительно мелких молекул
- 3) молекул глобулярной формы
- 4) молекул фибриллярной формы

24. ДЛЯ ДИСК-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА В КАЧЕСТВЕ НОСИТЕЛЯ ИСПОЛЬЗУЮТ

- 1) гель из крахмала в пластинах
- 2) тонкий слой окиси кремния на стекле
- 3) агаровый гель в стеклянных трубках
- 4) полиакриламидный гель

25. МЕТОД РАЗДЕЛЕНИЯ МАКРОМОЛЕКУЛ, КОТОРЫЙ ОСНОВАН НА БИОЛОГИЧЕСКОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ – ЭТО МЕТОД

- 1) аффинной хроматографии
- 2) адсорбционной хроматографии

- 3) газо-жидкостной хроматографии
- 4) ионообменной хроматографии

26. ПАРЫ СОЕДИНЕНИЙ, КОТОРЫЕ ЯВЛЯЮТСЯ ХИМИЧЕСКИМИ АКТИВАТОРАМИ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ – ЭТО

- 1) кумарин и люцигенин
- 2) родамин и кумарин
- 3) люминол и люцигенин
- 4) родамин и люминол

27. ПРИ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ ИОНИЗИРОВАННЫЕ ЧАСТИЦЫ СОРТИРУЮТСЯ ПО

- 1) отношению массы иона к его заряду
- 2) отношению заряда иона к его массе
- 3) величине заряда и знаку заряда ионов
- 4) массе ионов

28. ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРЕДСТАВЛЯЮТ СОБОЙ

- 1) совокупность химических реакций
- 2) специфическое связывание соединения с антителами
- 3) анализ крови на иммунный статус
- 4) связывание анализируемого вещества с ионофором

29. «ТВЕРДЫЕ ФАЗЫ» ДЛЯ ИФА –

- 1) нитроцеллюлозная бумага
- 2) полистирол, поливинилхлорид
- 3) PVDF
- 4) нитроцеллюлозная бумага в виде стрипов

30. ВЕСТЕРН БЛОТТИНГ – ЭТО МЕТОД

- 1) разделения ДНК
- 2) разделения белков и ДНК
- 3) разделения белков
- 4) разделения липидов

31. ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ – ЭТО

- 1) совокупность методов качественных и количественных анализов веществ, основанных на применении химических реакций.
- 2) методы исследования, основанные на специфическом связывании определяемого соединения с соответствующими антителами
- 3) анализ крови на иммунный статус
- 4) фенотипирование клеток крови методом проточной цитофлуориметрии

32. «СЭНДВИЧ» ИФА – ЭТО

- 1) метод ИФА, в котором антитело специфически связывается с антигеном
- 2) методы исследования, основанные на специфическом связывании определяемого соединения с соответствующими антителами
- 3) метод ИФА, в котором на стадии выявления специфического иммунного комплекса антиген находится между молекулами иммобилизованных и меченных антител
- 4) гомогенный вид ИФА, проводимый в жидкой фазе

33. ОТЛИЧИЕ НЕПРЯМОГО ИФА ОТ ПРЯМОГО

- 1) в прямом ИФА используют антитела, меченные флуорохромной меткой
- 2) ферментативную метку присоединяют не к целевому антигену и не к антителу против целевого антигена, а к так называемым вторым антителам - антивидовым антииммуноглобулиновым антителам
- 3) метод ИФА, в котором на стадии выявления специфического иммунного комплекса антиген находится между молекулами иммобилизованных и меченных антител
- 4) в непрямом ИФА используют антитела, меченные радионуклидной меткой

34. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕТОДА ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА (ИФА) – ЭТО

- 1) метод качественного или количественного определения различных соединений, макромолекул, вирусов и пр., в основе которого лежит специфическая реакция антиген-антитело, и выявление образовавшегося комплекса с использованием фермента в качестве метки для регистрации сигнала
- 2) метод определения различных соединений, макромолекул, вирусов и пр., в основе которого лежит специфическая реакция антиген-антитело, и выявление образовавшегося комплекса проводят с использованием радионуклидной метки в качестве метки для регистрации сигнала
- 3) метод, при котором все стадии реакции осуществляются на твердой фазе
- 4) метод разделения белков по молекулярному весу с помощью электрического тока

35. «ЗОЛОТЫМ» СТАНДАРТОМ, ПОДТВЕРЖДАЮЩИМ РЕЗУЛЬТАТЫ ИФА, ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) Вестерн блоттинг
- 2) Истерн блоттинг
- 3) Сайзерн блоттинг
- 4) Нозерн блоттинг

36. ПРЕИМУЩЕСТВОМ МЕТОДА ИФА ЯВЛЯЕТСЯ

- 1) высокая специфичность и чувствительность метода ИФА (более 90 %)
- 2) низкая специфичность и высокая чувствительность.
- 3) наличие специальных условий, связанных с техникой безопасности.
- 4) низкая специфичность и чувствительность.

37. КЛАССИФИКАЦИЯ МЕТОДОВ ИФА ПО ТИПУ ИММУНОХИМИЧЕСКОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НА ПЕРВОЙ СТАДИИ АНАЛИЗА ИФА

- 1) конкурентный и неконкурентный
- 2) прямой и непрямой
- 3) «сэндвич» и «ловушечный»
- 4) гомогенный и гетерогенный

38. КЛАССИФИКАЦИЯ МЕТОДОВ ИФА ПО ТИПУ ПРОВОДИМЫХ НА КАЖДОЙ ИЗ ИММУНОХИМИЧЕСКИХ СТАДИЙ РЕАКЦИЙ

- 1) гомогенный и гетерогенный
- 2) конкурентный и неконкурентный
- 3) прямой и непрямой
- 4) «сэндвич» и «ловушечный»

39. ПРИ ПОСТАВНОВКЕ ВЕСТЕРН БЛОТТИНГА ДЕНСИТОМЕТРИЯ МОЖЕТ ПРИМЕНЯТЬСЯ НА ЭТАПЕ

- 1) визуализация
- 2) анализ
- 3) подготовка биологических препаратов
- 4) электроперенос

40. ЭЛЕКТРОПЕРЕНОС БЕЛКОВ НА МЕМБРАНУ НЕОБХОДИМ ДЛЯ

- 1) качественного анализа белков
- 2) количественного анализа белков
- 3) проведения реакции связывания со специфическим антителом
- 4) для блокирования «шумовых» белков

41. ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ ВЕСТЕРН БЛОТТИНГА ЗАВИСИТ ОТ

- 1) вида мембраны
- 2) качества первичных антител
- 3) срока годности реактивов
- 4) наличия «шумовых» белков

42. ЯВЛЕНИЕ, КОТОРОЕ МОЖЕТ ПРОИСХОДИТЬ С ПУЧКОМ СВЕТА, НАПРАВЛЕННЫМ НА КЮВЕТУ С ИЗУЧАЕМЫМ РАСТВОРОМ – ЭТО

- 1) отражение, рассеяние, поглощение
- 2) когеренция

- 3) интерференция
- 4) ретракция

43. ОПТИЧЕСКОЕ УСТРОЙСТВО, КОТОРОЕ ПРИНЦИПИАЛЬНО ОТЛИЧАЕТ КОНСТРУКЦИЮ СПЕКТРОФОТОМЕТРА ОТ КОНСТРУКЦИИ ФОТОМЕТРА (КОЛОРИМЕТРА) – ЭТО

- 1) коллиматор
- 2) монохроматор
- 3) секвенсор
- 4) конденсор

44. ЯВЛЕНИЕ, ЛЕЖАЩИЕ В ОСНОВЕ ФЕНОМЕНА ТУШЕНИЯ (ГАШЕНИЯ) ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ, – ЭТО

- 1) энергия квантов вторичного светового потока передаётся молекулам других веществ (не являющихся флуорофорами), присутствующих в растворе, и поглощается ими
- 2) молекула-тушитель не прореагировать с молекулой-флуорофором за то время, пока флуорофор находится в возбужденном состоянии
- 3) низкая концентрация флуорофора в кювете приводит к сокращению среднего времени жизни возбужденного состояния каждой молекулы флуорофора
- 4) энергия квантов первичного светового потока передаётся молекулам других веществ

45. ОТКЛОНЕНИЕМ ОТ ЗАКОНА ЛАМБЕРТА–БУГЕРА–БЭРА ЯВЛЯЕТСЯ ПОТЕРЯ ЛИНЕЙНОСТИ ГРАФИКА ЗАВИСИМОСТИ ЭКСТИНКЦИИ ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ ХРОМОФОРА В ИЗУЧАЕМОМ РАСТВОРЕ. ПРИЧИНА ЭТОГО ОТКЛОНЕНИЯ –

- 1) в кювете продолжают процессы диссоциации и ассоциации молекул раствора или химические взаимодействия между ними
- 2) отсутствие флуоресценции раствора анализируемого соединения в кювете спектрофотометра
- 3) монохроматичность светового потока, проходящего через раствор в кювете, в сочетании с большой шириной спектральной щели оптического канала
- 4) в кювете закончены процессы диссоциации и ассоциации молекул раствора или химические взаимодействия между ними

46. ГРУППА ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ, ОТНОСЯЩИХСЯ К КЛАССУ БИОЛОГИЧЕСКИХ ФЛУОРОФОРОВ, –

- 1) триптофан, рибофлавин, аллофиикоцианин, родамин, пиридиновые нуклеотиды, green fluorescence protein, рибофлавин, фикоэритрин, родамин, кумарин
- 2) липиды, алифатические аминокислоты

- 3) витамин А, витамин Д, витамин Е
- 4) пролин, холестерол

47. ПРИБОР, С ПОМОЩЬЮ КОТОРОГО МОЖНО ИЗМЕРИТЬ ИНТЕНСИВНОСТЬ РАССЕЯННОГО ВОДНОЙ СИСТЕМОЙ СВЕТА, – ЭТО

- 1) фотометр (колориметр)
- 2) нефелометр
- 3) флуориметр
- 4) пикнометр

48. ЯВЛЕНИЕ, КОТОРОЕ НАЗЫВАЕТСЯ «СТОКСОВ СДВИГ» ИЛИ «СДВИГ СТОКСА» ОБУСЛОВЛЕНО

- 1) более низкой энергией квантов флуоресценции (вторичного светового потока), по сравнению с таковой для квантов возбуждающего света
- 2) потерей когерентности светового излучения в результате его взаимодействия с живыми тканями
- 3) явлением поляризации светового пучка
- 4) явлением тушения флуоресценции

49. МОЛЕКУЛА ИЛИ ХИМИЧЕСКАЯ ГРУППА, КОТОРАЯ СПОСОБНА ПОГЛОЩАТЬ ЭНЕРГИЮ КВАНТОВ ВОЗБУЖДАЮЩЕГО СВЕТОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ И ОБУСЛОВЛИВАТЬ ПОЯВЛЕНИЕ ВТОРИЧНОГО СВЕТОВОГО ПОТОКА, – ЭТО

- 1) хромофор
- 2) ионофор
- 3) флуорофор
- 4) люминофор

50. ЛИНЕЙНАЯ ЗАВИСИМОСТЬ ИНТЕНСИВНОСТИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ ФЛУОРОФОРА СОХРАНЯЕТСЯ

- 1) вплоть до очень высоких концентраций флуорофора
- 2) только при очень низких концентрациях флуорофора
- 3) только когда содержание флуорофора не превышает 5 % от объема исследуемого раствора
- 4) только при отсутствии светорассеяния раствором в кювете

51. ВЫСОКАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ БУДЕТ ПРОЯВЛЯТЬСЯ, ЕСЛИ СОБЛЮДАТЬ ПРАВИЛО –

- 1) измерять интенсивность флуоресценции при длине волны, соответствующей максимуму флуоресценции, поскольку флуоресценция происходит независимо от длины волны возбуждающего светового потока

- 2) возбуждать флуоресценцию при длине волны светового потока, соответствующей минимуму его поглощения данным флуорофором и регистрировать интенсивность флуоресценции при длине волны, соответствующей минимуму флуоресценции флуорофора; при этом избегать высоких концентраций флуорофора в кювете, которые могут вызывать тушение флуоресценции
- 3) возбуждать флуоресценцию при длине волны светового потока, соответствующей минимуму его поглощения данным флуорофором, но интенсивность флуоресценции измерять при большей длине волны, поскольку существует «сдвиг Стокса»
- 4) измерять интенсивность флуоресценции при длине волны, соответствующей минимуму флуоресценции, поскольку флуоресценция происходит независимо от длины волны возбуждающего светового потока

52. ПРИ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОМ РАЗДЕЛЕНИИ СМЕСИ ВЕЩЕСТВ, ЭФФЕКТ «МОЛЕКУЛЯРНОГО СИТА» ОБУСЛОВЛИВАЕТ БОЛЕЕ БЫСТРОЕ ДВИЖЕНИЕ ДЛЯ

- 1) относительно крупных молекул
- 2) относительно мелких молекул
- 3) молекул глобулярной формы
- 4) молекул фибриллярной формы

53. НОСИТЕЛЬ ДЛЯ ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА, МАТЕРИАЛ КОТОРОГО ИМЕЕТ СЛАБЫЙ ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ ЭЛЕКТРИЧЕСКИЙ ЗАРЯД, –

- 1) ацетат целлюлозы
- 2) полиакриламидный гель
- 3) тонкий слой окиси алюминия
- 4) хроматографическая бумага

54. ДИСК-ЭЛЕКТРОФЕРЕЗ ПРОВОДЯТ, ИСПОЛЬЗУЯ

- 1) гель из крахмала в пластинах
- 2) тонкий слой окиси кремния на стекле
- 3) агаровый гель в стеклянных трубках
- 4) полиакриламидный гель, состоящий из концентрирующего и разделяющего слоев

55. ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЕ ФОКУСИРОВАНИЕ ПОЗВОЛЯЕТ

- 1) обнаружить в смеси молекул присутствие определенных антигенов благодаря сочетанию электрофореза и иммунодиффузии
- 2) получить высокую степень деления смеси молекул, имеющих близкую электрофоретическую подвижность благодаря нескольким слоям, из которых состоит разделяющий гель

- 3) разделить смесь молекул, которые отличаются по значениям их изоэлектрических точек на сотые доли ед. рН
- 4) обнаружить ранее неизученные белки

56. В ХРОМАТОГРАФИИ КОЭФФИЦИЕНТ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ (K_d) ДЛЯ ЛЮБОГО КОМПОНЕНТА СМЕСИ ПРЕДСТАВЛЯЕТ СОБОЙ

- 1) отношение концентрации компонента смеси в стационарной фазе к его концентрации в подвижной фазе
- 2) отношение элюционных объёмов для высокомолекулярного и низкомолекулярного компонентов смеси для колонки данного объема
- 3) отношение расстояния, пройденного подвижной фазой до линии «финиша», к расстоянию, пройденному данным компонентом смеси

57. ЭФФЕКТ «МОЛЕКУЛЯРНОГО СИТА» В ГЕЛЬ-ХРОМАТОГРАФИИ ОБУСЛОВЛИВАЕТ БОЛЕЕ БЫСТРОЕ ДВИЖЕНИЕ ВДОЛЬ КОЛОНКИ

- 1) молекул с размером больше, чем диаметр пор в гранулах геля
- 2) молекул с размером меньше, чем диаметр пор в гранулах геля
- 3) молекул, электрический заряд которых совпадает по знаку с таковым у ионогенных групп матрицы
- 4) молекул, размер которых точно соответствует диаметру пор в гранулах геля

58. РАЗДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА СМЕСИ МАКРОМОЛЕКУЛ НА ОСНОВЕ ИХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ МОЖЕТ БЫТЬ ПРОВЕДЕНО С ПОМОЩЬЮ

- 1) адсорбционной хроматографии
- 2) газо-жидкостной хроматографии
- 3) аффинной хроматографии
- 4) ионообменной хроматографии

59. ГАЗО-ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ОСНОВАНА НА ПРИНЦИПЕ

- 1) различной степени удержания молекул смеси на поверхности адсорбента
- 2) различий в распределении смеси молекул между жидкой и газообразной фазами
- 3) различий в степени удержания молекул смеси в составе газообразной фазы
- 4) различий в распределении паров смеси молекул в фазе газаносителя

60. ПРИНЦИП ПРОНИКАЮЩЕЙ ХРОМАТОГРАФИИ СОСТОИТ В

- 1) различной степени удержания молекул смеси на поверхности адсорбента

- 2) различиях распределения смеси молекул между двумя жидкими фазами
- 3) разделении смеси молекул на основе эффекта «молекулярного сита»
- 4) различиях химического сродства молекул смеси к стационарной фазе

61. ЯВЛЕНИЯ, КОТОРЫЕ ЛЕЖАТ В ОСНОВЕ СОБСТВЕННОГО (СВЕРХСЛАБОГО) СВЕЧЕНИЯ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ, – ЭТО

- 1) реакции взаимодействия свободных радикалов липидной природы, активных форм кислорода свободнорадикальной природы и радикалов оксида азота
- 2) реакции взаимодействия с молекулой воды
- 3) реакции взаимодействия с гидроксильным радикалом
- 4) реакции взаимодействия с аминокислотами

62. ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ ИСПОЛЬЗУЕТ ЭНЕРГИЮ

- 1) которую поставляют клеточные симбиоты
- 2) которая образуется в результате химических превращений
- 3) которая излучается молекулами, способными поглощать кванты светового потока
- 4) верны все ответы

63. ВЕЩЕСТВА, УНИЧТОЖАЮЩИЕ СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ И ПОДАВЛЯЮЩИЕ СОБСТВЕННОЕ (СВЕРХСЛАБОЕ) СВЕЧЕНИЕ КЛЕТОК, – ЭТО

- 1) оксиданты
- 2) антиоксиданты
- 3) прооксиданты
- 4) все ответы верны

64. ПРИЧИНА НИЗКОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ СВЕЧЕНИЯ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ –

- 1) стационарные концентрации свободных радикалов в клетке чрезвычайно низка в силу их высокой реакционной способности
- 2) не формируются электронно-возбужденные состояния реагирующих молекул
- 3) молекула, оказавшаяся в электронно-возбужденном состоянии, не способна отдать избыток своей энергии в форме кванта светового излучения
- 4) стационарная концентрация свободных радикалов в клетке высока

65. ПРИБОР ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ ИНТЕНСИВНОСТИ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ СУСПЕНЗИИ КЛЕТОК И БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ НАЗЫВАЕТСЯ

- 1) цитофотометр

- 2) электронный фотоумножитель
- 3) двухлучевой спектрофлуориметр
- 4) хемиллюминометр

66. ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЯ ИНТЕНСИВНОСТИ СОБСТВЕННОЙ (НЕАКТИВИРОВАННОЙ) ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ –

- 1) для количественной оценки относительной активности процессов свободнорадикального окисления биомолекул в клетках и тканях
- 2) для подсчета абсолютного числа свободных радикалов, присутствующих в изучаемом биообъекте
- 3) постановка диагноза основного заболевания у пациента
- 4) верны все варианты ответов, кроме 1

67. ПЕРЕЧЕНЬ ПОКАЗАТЕЛЕЙ, КОТОРЫЙ МОЖНО ПОЛУЧИТЬ ПУТЁМ АНАЛИЗА ЗАПИСИ ВСПЫШКИ НЕАКТИВИРОВАННОЙ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ –

- 1) амплитуда вспышки, степень затухания вспышки по тангенсу наклона нисходящей ветви кривой и длительность лаг-фазы
- 2) степень гашения люминесценции, светосумму и амплитуду вспышки
- 3) амплитуда и светосумма вспышки, степень затухания вспышки по тангенсу наклона нисходящей ветви кривой относительно оси «Х», что характеризует суммарную антиоксидантную активность образца
- 4) степень затухания вспышки по тангенсу наклона нисходящей ветви кривой и длительность лаг-фазы, светосумму и амплитуду вспышки

68. АКТИВИРОВАННАЯ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ МОЖЕТ БЫТЬ ИНИЦИИРОВАНА

- 1) химическими и физическими активаторами
- 2) биологическими активаторами
- 3) флуоресцентными активаторами
- 4) хемиллюминесцентными активаторами

69. ПАРА СОЕДИНЕНИЙ, КОТОРЫЕ ЯВЛЯЮТСЯ ФИЗИЧЕСКИМИ АКТИВАТОРАМИ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ –

- 1) родамин и кумарин
- 2) родамин и флуоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ)
- 3) флуоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ) и люминол
- 4) люминол и люцигенин

70. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЯ АКТИВИРОВАННОЙ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

- 1) оценка функционального состояния фагоцитирующих клеток
- 2) диагностика злокачественных новообразований

- 3) оценка морфологии клеток
- 4) сортировка клеток

71. В ПРОТОЧНОМ ЦИТОМЕТРЕ СВЕТОВОЙ ПОТОК, СОЗДАННЫЙ ЛАЗЕРОМ, ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ С ИЗУЧАЕМЫМИ КЛЕТКАМИ В ФОРМЕ

- 1) отражения клетками
- 2) рассеивания клетками и возбуждения собственной флуоресценции клеток
- 3) интерференции
- 4) когеренции

72. ГИДРОДИНАМИЧЕСКАЯ ФОКУСИРОВКА КЛЕТОК В ПРОТОЧНОМ ЦИТОМЕТРЕ ПОЗВОЛЯЕТ

- 1) получить ламинарный поток всех клеток, присутствующих в объеме изучаемой суспензии, независимо от их свойств
- 2) сортировать клетки суспензии по их размерам
- 3) сортировать клетки суспензии по степени зернистости их цитоплазмы
- 4) сортировать клетки суспензии по интенсивности их собственной флуоресценции

73. В ПРОТОЧНОМ ЦИТОМЕТРЕ ОПТИЧЕСКИЙ КАНАЛ ИЗМЕРЕНИЯ РАССЕЯННОГО КЛЕТКАМИ СВЕТА ПОЗВОЛЯЕТ

- 1) сосчитать клетки в объеме изучаемой суспензии и определить размер клеток суспензии
- 2) измерить интенсивность собственной флуоресценции клеток суспензии
- 3) определить количество белка в клеточной суспензии
- 4) получить ламинарный поток всех клеток, присутствующих в объеме изучаемой суспензии, независимо от их свойств

74. В ПРОТОЧНОМ ЦИТОМЕТРЕ ОПТИЧЕСКИЙ КАНАЛ ИЗМЕРЕНИЯ ИНТЕНСИВНОСТИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ КЛЕТОК ПОЗВОЛЯЕТ

- 1) измерить интенсивность собственной флуоресценции клеток суспензии
- 2) определить морфологию и клеточный состав клеток
- 3) определить размеры клеток
- 4) определить количество белка в клеточной суспензии

75. РЕЗУЛЬТАТЫ МУЛЬТИПАРАМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА КЛЕТОК ИЗУЧАЕМОЙ СУСПЕНЗИИ С ПОМОЩЬЮ ПРОТОЧНОГО ЦИТОМЕТРА ПРЕДСТАВЛЯЮТ В ВИДЕ

- 1) графика зависимости интенсивности собственной флуоресценции клеток суспензии от их размеров

- 2) графика зависимости степени зернистости цитоплазмы клеток от интенсивности их флуоресценции после обработки флуоресцентным красителем
- 3) частотной гистограммы распределения: ось «Х» - шкала интенсивности параметра, ось «У» - количество клеток с данным значением параметра;
- 4) графика зависимости интенсивности собственной флуоресценции клеток суспензии от их количества

76. МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ ВЫЯВЛЯЮТ КЛЕТКИ, НАХОДЯЩИЕСЯ НА РАЗНЫХ ФАЗАХ АПОПТОЗА. КЛЕТКИ, ВСТУПИВШИЕ В ИСПОЛНИТЕЛЬНУЮ ФАЗУ АПОПТОЗА БУДУТ

- 1) положительны только по аннексину V, конъюгированному с ФИТЦ
- 2) положительны по аннексину V, конъюгированному с ФИТЦ, и пропидиум йодиду
- 3) положительны только по пропидиум йодиду
- 4) положительны только по пропидиум йодиду, конъюгированному с ФИТЦ

77. МЕТОД ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ ИСПОЛЬЗУЕТСЯ В СЛЕДУЮЩИХ ОБЛАСТЯХ НАУКИ

- 1) иммунология, гематология и онкология
- 2) физиология и биофизика
- 3) биохимия и фармакология
- 4) токсикология и биофизика

78. ПРИ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ ИОНИЗИРОВАННЫЕ ЧАСТИЦЫ ИЗУЧАЕМОГО ОБРАЗЦА СОРТИРУЮТСЯ ПО

- 1) величине и знаку заряда ионов
- 2) отношению заряда иона к его массе
- 3) отношению массы иона к его заряду
- 4) степени диссоциации молекул изучаемого соединения

79. В ОСНОВУ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА БЫЛО ПОЛОЖЕНО ОТКРЫТИЕ, СОГЛАСНО КОТОРОМУ

- 1) предварительно разогнанные ионы движутся в постоянном магнитном поле по параболическим траекториям, кривизна которых пропорциональна отношению их массы к заряду
- 2) ионы движутся в постоянном электрическом поле со скоростями, пропорциональными их массе
- 3) в вакууме ионы движутся от катода к аноду по траекториям, кривизна которых зависит от величины отношения их заряда к массе
- 4) в постоянном магнитном поле положительные ионы движутся быстрее отрицательных ионов

80. МАСС-СПЕКТРОМЕТР СОСТОИТ ИЗ СЛЕДУЮЩИХ БЛОКОВ –

- 1) устройство для ввода пробы и перевода её в газообразное состояние, термостат, собственно анализатор, детектор
- 2) устройство для ввода пробы, вакуумная камера с зоной ионизации, постоянный магнит, детектор
- 3) устройство для ввода пробы и перевода её в газообразное состояние с зоной ионизации и разгона ионов, анализатор массы с зоной сортировки, фотоэлектронный умножитель
- 4) вакуумная камера с зоной ионизации, постоянный магнит, детектор

81. В МАСС-СПЕКТРОМЕТРЕ ВАКУУМ НЕОБХОДИМ ДЛЯ

- 1) того, чтобы атмосферный воздух не влиял на скорость движения ионов образца к детектору
- 2) обеспечения максимальной продолжительности существования ионов образца, что необходимо для полноценного анализа масс
- 3) образования новых соединений между ионами образца и молекулярным кислородом
- 4) обеспечения минимальной продолжительности существования ионов образца, что необходимо для полноценного анализа масс

82. СПОСОБ, С ПОМОЩЬЮ КОТОРОГО В МАСС-СПЕКТРОМЕТРАХ НЕВОЗМОЖНО ИОНИЗИРОВАТЬ ИЗУЧАЕМЫЙ ОБРАЗЕЦ, – ЭТО

- 1) электронная ионизация
- 2) катодная ионизация плазмы
- 3) лазерная десорбция/ионизация из матрицы
- 4) ионизация электроспрея

83. УСТРОЙСТВО, КОТОРОЕ НЕ ПРИМЕНЯЮТ ДЛЯ АНАЛИЗА МАССЫ В МАСС-СПЕКТРОМЕТРАХ, – ЭТО

- 1) магнитный анализатор
- 2) квадрипольный анализатор
- 3) синфазный анализатор
- 4) время-пролётный анализатор

84. ПРИ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ В КАЧЕСТВЕ ДЕТЕКТОРА МАСС ИСПОЛЬЗУЮТ

- 1) частотный дискриминатор
- 2) электронный детектор
- 3) фото-электронный умножитель
- 4) матричный диод

85. ИНФОРМАЦИЯ И СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ОБ ИЗУЧАЕМОМ СОЕДИНЕНИИ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ –

- 1) измерить молекулярную массу изучаемого соединения

- 2) определить количество изотопов определенного элемента в составе изучаемого образца
- 3) определить физическую структуру исследуемого соединения
- 4) измерить валентность исследуемого соединения

ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К ЗАЧЕТУ

Тема 1. Этапы лабораторного исследования

1. Правила взятия капиллярной, венозной крови, мочи для исследования. Получение плазмы, сыворотки крови. Условия хранения материала.
2. Наборы для исследований. Контрольные сыворотки. Извлечение биологического материала для экспериментальных исследований. Получение гомогената и субклеточных фракций. Седиментационный анализ.
3. Методы дифференциального центрифугирования. Стадии проведения биохимического анализа.
4. Способы построения калибровочного графика и определения концентрации веществ. Расчет результатов по калибровочному графику.
5. Методы оценки функциональных нарушений, повреждений органов и тканей, изучения биохимического состава биологических жидкостей.
6. Техника безопасности при работе с биологическим материалом.
7. Критерии качества измерений: точность, погрешность, ошибка измерений, воспроизводимость, правильность, специфичность, чувствительность.
8. Способы оценки и расчет результатов биохимического исследования.
9. Статистические исследования, проверка на нормальность распределения результатов. Параметрические и непараметрические критерии.

Тема 2. Физико-химические методы

1. Скрининговые исследования, использование стрип-технологий.
2. Электрофорез белков сыворотки крови на ацетатцеллюлозной пленке.
3. Принципы оценки функций печени по активности сывороточных ферментов.
4. Использование кинетических методов и фотометрические исследования по конечной точке.

Тема 3. Иммунные и иммуноферментные методы исследования

1. Иммунохимические методы анализа. История открытия. Радиоиммунный метод анализа: принцип метода, применение.
2. Иммунодиффузный и иммуноэлектрофоретический методы исследования. Принцип методов, применение.
3. Иммуноферментный анализ. Принцип метода. Классификация: прямые, непрямые, конкурентные, неконкурентные, гомогенные, гетерогенные. Твердофазный иммуноферментный анализ.
4. Основные типы тест-систем в зависимости от используемых антигенов. Лизатные, рекомбинантные, пептидные. Преимущества и недостатки. «Авидинбиотиновое взаимодействие»

5. Этапы иммуноферментного анализа. Преаналитический (долабораторный), аналитический (доприборный), приборный и постаналитический этапы.
6. Оценка качества. Проведение внутрилабораторного контроля качества при проведении ИФА. Технические ошибки при постановке реакции. Подготовка биологических образцов для проведения ИФА.
7. Причины ложноположительных и ложноотрицательных результатов ИФА. Влияние системных заболеваний пациента. Синдром поликлональной активации.
8. Преимущества и недостатки ИФА. Сравнение с другими методами лабораторной диагностики. Разница между ПЦР и ИФА.
9. Применение ИФА в клинической лабораторной диагностике. Применение в клинической биохимии. Диагностика соматических и инфекционных заболеваний, исследование гормонального статуса, обследование на онкомаркеры.
10. Оборудование, необходимое для проведения ИФА. ИФА-анализатор, промыватель, шейкер. Выбор оборудования в зависимости от задач лаборатории. Автоматический и полуавтоматический анализатор.
11. Принцип метода Вестерн блоттинг. Стандартный протокол метода.
12. Особенности методов Саузерн блоттинг, Истерн блоттинг, Нозерн блоттинг в отличие от метода Вестерн блоттинг.
13. «Твердая» фаза для иммуноблота, нитроцеллюлоза, PVDF-мембраны.
14. Основные принципы подготовки образца для иммуноблота, связь количества биологического материала с качеством иммуноблота.
15. Принципы SDS-гель электрофореза, электрофорез по Лэмми. Окрашивание гелей, обратимое, необратимое.
16. Системы визуализации для Вестерн блоттинга, основные подходы для визуализации результатов иммуноблота.
17. Электроперенос белков на пористую мембрану (блоттинг), виды блоттинга.
18. Применение метода Вестерн блоттинг в клинической лабораторной диагностике.
19. Особенности применения антител в методе Вестерн блоттинг. Значение этапа блокирования, его виды.
20. Окрашивание белков на фильтре, особенности и значение процесса.

Тема 4. Биохимические исследования в клинико-биохимической лаборатории

1. Нефелометрия и турбидиметрия. Тимоловая проба.
2. Электрофоретическое фракционирование смеси белков. Низковольтный электрофорез белков сыворотки крови на ацетатцеллюлозной пленке.
3. Фотометрические исследования по конечной точке. Определение активности аминотрансфераз в сыворотке крови.
4. Кинетические исследования. Определение активности креатинкиназы кинетическим ферментативным методом.

5. Автоматизированные биохимические исследования. Определение активности γ -глутамил-транспептидазы с использованием биохимического анализатора.
6. Иммуноферментные методы исследования в биохимии. Определение содержания тропонина с помощью ИФА.
7. Оборудование для скрининговых исследований. Определение содержания глюкозы сыворотки и плазмы крови с использованием Assu-check и one touch оборудования.

ОТВЕТЫ НА ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

Номер задания	Номер ответа	Номер задания	Номер ответа
1	3	44	1
2	2	45	1
3	4	46	1
4	4	47	2
5	3	48	1
6	4	49	3
7	2	50	3
8	2	51	1
9	3	52	2
10	4	53	4
11	2	54	4
12	4	55	3
13	1	56	1
14	1	57	1
15	1	58	3
16	4	59	2
17	2	60	3
18	2	61	1
19	2	62	2
20	2	63	2
21	3	64	1
22	3	65	4
23	2	66	1
24	4	67	3
25	1	68	1
26	3	69	1
27	1	70	1
28	2	71	2
29	2	72	1
30	3	73	1
31	1	74	1
32	3	75	3
33	2	76	2
34	1	77	1
35	1	78	3
36	1	79	1
37	1	80	3
38	1	81	2
39	2	82	2

Номер задания	Номер ответа	Номер задания	Номер ответа
40	3	83	3
41	2	84	3
42	1	85	1
43	2		

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Основная литература

1. Инвитро диагностика. Лабораторная диагностика / под ред. Е.А. Кондрашевой, А.Ю. Островского. – 3-е изд. перераб. и доп. – М.: Медицина, 2009. – 832 с.
2. Камышников, В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике / В.С. Камышников. – М.: МЕД пресс-информ. – 2009. – 896 с.
3. Кишкун, А.А. Клиническая лабораторная диагностика / А.А. Кишкун – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 978 с.
4. Кушлинский, Н.Е. Клиническая биохимия: учебное пособие / Н.Е. Кушлинский, В.А. Ткачук; под ред. В.А.Ткачука. М.: ГЭОТАР-МЕДИА. – 2008. – 264 с.
5. Масыго, А.В. Некоторые ошибки при постановке ИФА / А.В. Масыго. – Новосибирск, 2001. – 132 с.
6. Методы клинических лабораторных исследований / под ред. В.С. Камышникова – 6-е изд., перераб. – М.: Из-во МЕДпресс-информ, 2013. – 736 с.
7. Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии / под ред. К. Уилсон и Дж. Уолкер ; пер. с англ. – М. : БИНОМ, 2013. – 848 с.
8. Теория и практика иммуноферментного анализа / А.М. Егоров [и др.] – М.: Высш.школа, 1991. – 288 с.

Дополнительная литература

1. Жорина Л.В. Основы взаимодействия физических полей с биологическими объектами: Взаимодействие ионизирующего и оптического излучения. Учебное пособие / Л.В. Жорина, Г.Н. Змиевская. – М: Из-во МГТУ им. Н.Э. Баумана, 2006. – 240 с.
2. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция / Ю.А. Владимиров, Е.В. Проскурина // Успехи биологической химии. – 2009. – Т. 49. – С. 341–388.
3. Лифшиц, В.М. Биохимические анализы в клинике / В.М. Лифшиц, В.И. Сидельникова. – М.: Триада-Х, 2009. – 212 с.

учебное издание

**Галина Алексеевна Суханова
Людмила Викторовна Спирина
Дмитрий Иванович Кузьменко
Ольга Евгеньевна Акбашева**

**Медицинская биохимия:
принципы измерительных технологий
в биохимии**

Под редакцией В.Ю. Сереброва

Редактор Коломийцев А.Ю.
Технический редактор Коломийцева О.В.
Обложка Забоенкова И.Г.

Издательство СибГМУ
634050, г. Томск, пр. Ленина, 107
тел. 8 (3822) 51-41-53
E-mail: otd.redaktor@ssmu.ru

Подписано в печать 25.12.2017
Формат 60x84 $\frac{1}{16}$. Бумага офсетная.
Печать цифровая. Гарнитура «Times». Печ. лист. 8,3. Авт. лист 5,9.
Тираж 100 экз. Заказ №

Отпечатано в Издательстве СибГМУ
634050, Томск, ул. Московский тракт, 2
E-mail: lab.poligrafii@ssmu.ru