

Министерство образования и науки Российской Федерации
Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского
Национальный исследовательский университет

Учебно-научный и инновационный комплекс
«Физические основы информационно-телекоммуникационных систем»

Ежова Г.П.

Бабаев А.А.

**БИОМЕДИЦИНСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ГОМЕОСТАЗА
ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА**
(Учебно-методическое пособие)

Мероприятие 2.2. Развитие сетевой интеграции с ведущими университетами страны, научно-исследовательскими институтами РАН, предприятиями-партнерами, создание новых форм взаимодействия.

2.2.1. Разработка новых и модернизация существующих УМК для подготовки молодых специалистов для академических институтов и предприятий высокотехнологических секторов экономики.

Учебная дисциплина: Спецкурс Биомедицинские исследования гомеостаза организма человека

Специальность: 020200 «Биология»

Нижний Новгород

2010

УДК 577.122
ББК Е4 Р 121.5
Е- 41

Ежова Г.П., Бабаев А.А.

Е-41 Биомедицинские исследования гомеостаза организма человека: Учебно-методическое пособие. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет. - 2010. - 80 с.

Рецензент: д.б.н. Е.Б. Романова

Учебно-методическое пособие к практическим занятиям по дисциплине «Биомедицинские исследования гомеостаза организма человека в норме и патологии» предназначено для студентов биологического факультета ННГУ им. Н.И. Лобачевского, обучающихся по направлению 020200 «Биология».

Нарушения обмена веществ является причиной и следствием патологических состояний у человека, они сложны и многообразны, их выявление требует знаний в различных областях биохимии человека. В пособие в теоретической части представлены основы биохимически важных соединений: белков, ферментов, липидов, углеводов, гормонов; их строение и свойства. Исследования белков, ферментов, липидов, углеводов можно использовать в качестве диагностически важных параметров с целью диагностики тех или иных заболеваний. В практической части даны основные методы исследования этих показателей гомеостаза человека. Имеются контрольные вопросы, направленные на формирование у студентов понимания основ гомеостаза человека.

УДК 577.122
ББК Е4 Р 121.5

@ Нижегородский государственный
университет им. Н.И.Лобачевского, 2010

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1. БЕЛКОВЫЙ ГОМЕОСТАЗ. БЕЛКИ ПЛАЗМЫ КРОВИ, ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ.....	6
1.1 Методы определения общего белка крови.....	7
1.2. Осадочные пробы.....	8
1.2.1. Тимоловая проба.....	8
1.2.2. Сулемовая проба.....	9
1.2.3. Проба Вельтмана.....	10
1.3. Белковые фракции и их диагностическое значение. Основные методы фракционирования белков сыворотки крови.....	10
1.3.1. Метод электрофоретического разделения на пленках целлюлозы.....	21
1.3.2. Разделение белков сыворотки крови методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ).....	21
1.3.3. Определение некоторых индивидуальных белков сыворотки крови.....	25
1.3.3.1. Определение гаптоглобина.....	25
1.3.3.2. Определение церулоплазмينا.....	26
1.3.3.3. Определение гемоглобина.....	26
2. АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ И ИЗОФЕРМЕНТОВ. ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ.....	28
2.1. Методы определения активности ферментов.....	32
2.1.1. Метод определения аспаратаминотрансферазы (АСТ) с динитрофенилгидразином.....	33
2.1.2. Метод определения аланинаминотрансферазы (АЛТ) в сыворотке и плазме крови с динитрофенилгидразином.....	34
2.1.3. Метод определения лактатдегидрогеназы.....	35
2.1.4. Метод определения щелочной фосфатазы.....	36
2.1.5. Определение активности амилазы.....	37
2.1.6. Определение активности липазы.....	39
2.1.7. Определения креатинкиназы.....	40
3. ОНКОМАРКЁРЫ.....	43
4. ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОТДЕЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ УГЛЕВОДОВ И РОДСТВЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ.....	48
4.1. Определение концентрации глюкозы.....	48
4.2. Углеводные компоненты гликопротеидов.....	50
4.2.1 Исследование сиаловых кислот.....	51
4.2.2. Определение связанных с белком гексоз.....	52
4.2.3. Метод определения гексоз, связанных с серомукоидом.....	53
5. ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА.....	55

5.1. Унифицированный метод определения общего холестерина (метод Илька)	58
5.2. Унифицированный метод определения общего холестерина по реакции с хлорным железом (метод Златкис-Зака)	59
5.3. Унифицированный метод определения триглицеридов по реакции с ацетилацетоном	60
5.4. Фракционирование липопротеидов в полиакриламидном геле.....	61
6. НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ АЗОТИСТЫЕ ВЕЩЕСТВА	63
6.1. Уреазный метод определения мочевины.....	63
6.2. Уреазный метод определения мочевины по салицилатно-гипохлоритной реакции.....	65
6.3. Унифицированный метод определения креатина по цветной реакции Яффе.....	66
7. ПИГМЕНТЫ.....	68
7.1. Унифицированный метод определения билирубина по диазореакции.....	70
8. ГОРМОНЫ.....	73
8.1. Метод совместного определения гистамина и серотонина.....	76
ОЦЕНКА НАДЕЖНОСТИ ЛАБОРАТОРНЫХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	78
ВОПРОСЫ ДЛЯ КОНТРОЛЯ.....	80
ЛИТЕРАТУРА.....	82
Программа Большого практикума.....	83

ВВЕДЕНИЕ

Любой патологический процесс, в какой бы степени он не проявлялся, начинается на уровне ультраструктур, то есть на субклеточном уровне. Не существует ни одного повреждающего фактора, который не приводил бы к структурным изменениям клетки. Сущность того или иного патологического процесса в тканях, механизмы возникновения болезни, особенности ее течения помогают лабораторные методы исследования химического и клеточного состава биологических жидкостей, они дают возможность диагностировать патологию, а также проводить контроль за лечением больных.

Нормальное функционирование клетки зависит от:

- состояния окружающей клетку среды (гомеостаза),
- своевременности поступления в клетку питательных веществ (кислорода, глюкозы, аминокислот),
- уровня содержания продуктов метаболизма, особенно CO_2 .

Воздействие тех или иных внутренних, внешних факторов приводит сначала к повреждению структур клеток, к нарушению их функций, а в дальнейшем возможно развитие патологии отдельной клетки, так и клеточной кооперации, ткани, органа.

В ответ на любой повреждающий фактор: физическая травма, хирургическая операция, ожог, бактериальная инфекция, химические агенты, рост и развитие опухоли в организме развивается целый комплекс физиологических реакций, направленных на локализацию очага повреждения и скорейшее восстановление нарушенных функций. Этот сложный процесс, направленный на сохранение гомеостаза, известен как воспаление, а комплекс местных и системных изменений, возникающих непосредственно вслед за повреждением, в совокупности составляет понятие острой фазы воспаления.

При воспалении происходят изменения в белой крови (нейтрофилы, лимфоциты) и в концентрации плазматических белков. По биохимическим тестам белковых, ферментных и изоферментных проб, гормональных, липидных, углеводных и других компонентов, участвующих в обмене веществ при целом ряде патологических процессов, проводится оценка состояний, характерных для определенных заболеваний.

1. БЕЛКОВЫЙ ГОМЕОСТАЗ. БЕЛКИ ПЛАЗМЫ КРОВИ, ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Основную массу растворимых веществ крови образуют белки. Плазма крови содержит сложную смесь нескольких сотен различных белков, суммарная концентрация которых в норме составляет 65-85 г/л. При различных состояниях организма возможны изменения содержания общего белка в крови:

- при уменьшении процессов синтеза белка,
- при нарушении водного баланса,
- при усиленном распаде и потере белка.

В связи с огромной физиологической ролью белков плазмы крови количественная оценка содержания белка крови является важным показателем.

Гипопротеинемия – уменьшение общего содержания белков плазмы крови наблюдается при нефротическом синдроме, синдроме мальабсорбции (энтерит, хронический панкреатит), эксудативной энтеропатии, заболеваниях кожи (ожоги, экзема), массовых кровотечениях, задержке солей и воды (хронические почечные заболевания), агаммаглобулинемии, гипогаммаглобулинемии, неправильном питании, голодании. Уменьшение содержания белка в плазме крови может наступить также в результате задержки воды при сердечной декомпенсации, заболеваниях, сопровождающихся отеками или большими потерями белка с мочой, например при нефритах.

Гиперпротеинемия - увеличение общего содержания белков плазмы чаще всего имеет в своей основе гиперглобулинемию, которая вызывается следующими причинами:

- компенсаторное нарастание глобулинов, как неспецифическая реакция организма, направленная на поддержание онкотического давления;
- раздражение клеток ретикулоэндотелиальной системы продуктами тканевого распада, бактериальной флорой;
- переход мелкодисперсных белков в крупнодисперсные белки при распаде тканей.

Гиперпротеинемия – увеличение общего содержания белков плазмы наблюдается при плазмоцитоме, макроглобулинемии Вальденстрема, хронических воспалительных заболеваниях (ревматоидный артрит, диффузные болезни соединительной ткани – коллагенозы, бронхоэктазы, цирроз печени), состояниях и болезнях, сопровождающихся дегидратацией (диарея, рвота, сахарный диабет). В сыворотке крови больных плазмоцитарной миеломой обнаруживаются специфические белки – структурно-аномальные, функционально инертные белки из группы иммуноглобулинов, не существующие в плазме крови в норме, их называют парапротеины. Появление таких белков в крови называется парапротеинемией, то есть это появление в крови белков, отличающихся в физическом, химическом и иммунологическом отношении от обычных белков плазмы.

При тяжелых травмах увеличение содержания общего белка в плазме крови может наступить за счет потери части внутрисосудистой жидкости. При острых инфекционных заболеваниях к гиперпротеинемии приводит усиленный

синтез белков острой фазы, при хронических заболеваниях – повышение синтеза иммуноглобулинов.

Большинство специфических свойств белков зависит от химического строения и пространственной конфигурации макромолекул. Белки обладают гидрофильными свойствами, т.е. имеют большое сродство к воде, образуя с водой коллоидные растворы, отличающиеся неустойчивостью. Под влиянием разнообразных воздействий белки легко выпадают в осадок. На этом свойстве белковых растворов основаны различные осадочные пробы. Белки относятся к веществам, обладающим амфотерными свойствами, т.е. содержат кислые гидроксильные группы и основные аминокруппы, поэтому заряд их зависит от рН раствора, что важно учитывать при электрофоретическом разделении белков.

В настоящее время показан колоссальный полиморфизм белков. Обнаружено существование множественных молекулярных форм белков, в том числе изоферментов. Известно наличие генетического полиморфизма белков в популяции (аллоэнзимы). При абсолютном большинстве заболеваний, болезней полигенных и мультифакториальных, первичная структура белков не меняется, но возникают конформационные перестройки, нарушения, модификации, качественные изменения структуры и функций. В больном или стареющем организме происходит повышение конформационной стабильности белков, что ведет к нарушениям физиологических функций.

1.1. Методы определения общего белка крови

Методы определения общего белка в сыворотке крови основаны на различных принципах:

- спектрофотометрические – на определении поглощения при 280 нм,
- фотометрические – на измерении окрашенных продуктов реакции,
- рефрактометрические – на определении коэффициентов рефракции или преломления света.

Наиболее распространены рефрактометрические и фотометрические биуретовые методы. В биуретовой реакции атом меди связывает атомы азота белка с образованием цветных соединений.

Принцип метода: пептидные связи белка с солями меди в щелочной среде образуют комплекс фиолетового цвета (биуретовая реакция).

Реактивы:

1. Хлорид натрия: 9 г в 1 л. воды.
2. Натр едкий: 8 г. На 1 литр воды.
3. Калий иодид: 30 ммоль/л раствор иодида калия в 0,2 моль/л растворе едкого натрия; 0,5 г иодида калия помещают в мерную колбу на 100 мл, доводят до метки 0,2 мол/л раствором едкого натра.
4. Калий-натрий виннокислый 4-водный (сегнетова соль).
5. Сульфат меди 5-ти водный.
6. Биуретовый реактив: 4,5 г сегнетовой соли растворяют в 40 мл 0,2 моль/л растворе едкого натра, прибавляют 1,5 г сульфата меди и

0,5 г йодида калия и растворяют. Доливают до 100 мл 0,2 моль/л раствором едкого натра. Реактив стабилен при хранении в посуде из темного стекла

7. Рабочий раствор биуретового реактива: 20 мл биуретового реактива смешивают с 80 мл 0,5% раствора йодида калия. Раствор стабилен.
8. Калибровочный раствор альбумина: 100 г/л раствор альбумина в 154 ммоль/л растворе хлорида натрия.

Ход определения: Опытная проба: к 0,1 мл сыворотки крови прибавляют 5 мл рабочего раствора биуретового реактива и смешивают. Через 30 мин измеряют на фотометре в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 500-560 нм, (зеленый светофильтр) против холостой пробы. Холостая проба: к 5 мл рабочего биуретового реактива прибавляют 0,1 мл 154 ммоль/л раствора хлорида натрия, далее обрабатывают как опытную пробу. Расчет ведут по калибровочному графику.

Построение калибровочного графика: из калибровочного раствора 10% альбумина готовят разведения. Берут 0,2 мл; 0,4 мл; 0,6 мл; 0,8 мл; 1,0 мл доводят раствором хлорида натрия соответственно каждую до 1 мл. Концентрация в первой пробирке равна 20 г/л альбумина, во второй - 40 г/л, в третьей - 30 г/л, в четвертой - 80 г/л, в пятой - 100 г/л. Из каждого разведения берут по 0,1 мл рабочего раствора и прибавляют по 5 мл рабочего биуретового реактива; через 30- 60 мин измеряют на фотометре, как в опыте, против холостой пробы. По полученным данным строят калибровочный график.

Нормальные величины: 65-85 г/л (6,5-8,5 г/100 мл).

1.2. Осадочные пробы

Применение осадочных проб с диагностической целью основано на изменениях устойчивости белков плазмы при некоторых заболеваниях. В норме белки в плазме крови находятся в коллоидном состоянии и отличаются высокой устойчивостью. При постановке осадочных проб, которые сопровождаются химическим или физическим вмешательством, наступает преципитация белков, приводящая к помутнению или образованию хлопьев. Основные осадочные пробы: тимоловая проба, сулемовая проба, проба Вельтмана.

1.2.1. Тимоловая проба

Тимоловый реактив представляет собой насыщенный водный раствор тимола в буфере. Проба является положительной при уменьшении альбуминов и увеличении β - и γ -глобулинов.

Принцип метода: при взаимодействии сыворотки крови с тимолово-вероналовым раствором появляется помутнение вследствие образования глобулинолипидного комплекса.

Реактивы:

1. Тимол, 10%-ный спиртовой раствор: 10 г очищенного тимола растворяют в 96%-ном этиловом спирте в мерной колбе вместимостью 100 мл.
2. 5,5 Диэтилбарбитуровая кислота (веронал).
3. Мединал (диэтилбарбитуровой кислоты натриевая соль).
4. Буферный раствор: 2,76 г веронала и 2,06 г мединала растворяют и доводят до 1 л водой.
5. Тимоло-вероналовый буфер рН 7,55-7,6: в мерной колбе на 100 мл смешивают 80 мл буферного раствора и 1 мл 10%-ного спиртового раствора тимола, встряхивают и доливают буферным раствором до метки.
6. Бария хлорид.
7. Калибровочный раствор - суспензия сульфата бария: 3 мл раствора хлорида бария (1,175 г хлорида бария растворяют и доводят до 100 мл водой) наливают в мерную колбу на 100 мл и доводят объем до метки 0,1 моль/л раствором серной кислоты.
8. Материал для исследования: сыворотка свободная от гемолиза.

Ход определения: К 6 мл тимолово-вероналового буферного раствора прибавляют 0,1 мл сыворотки, оставляют на 30 минут и затем измеряют оптическую плотность при длине волны 630-690 нм (красный светофильтр) против тимолово-вероналового буфера в кюветах с толщиной 1 см. Реакцию проводят при комнатной температуре. Расчет ведут по калибровочному графику.

Построение калибровочного графика: из калибровочного раствора сульфата бария (суспензия) готовят разведения, соответствующие единицам помутнения. Калибровочные растворы хорошо встряхивают и при длине волны 630-690 нм в кюветах с толщиной слоя 1 см против воды измеряют.

Суспензия бария BaSO ₄ , мл	0,1 моль/мл раствор серной кислоты, мл	Единицы помутнения
1,35	4,65	5
2,7	3,3	10
5,4	0,6	20

Нормальные величины: 0-4 ед.

1.2.2. Сулемовая проба

Принцип метода: Сулема в присутствии мелкодисперсных коллоидов (белков) образует коллоидный раствор солей ртути. Нарушение дисперсности белковых фракций сыворотки крови вызывает осаждение грубодисперсных частиц.

Реактивы:

1. Сулема, 1 г/л раствор: 0,1 г двуххлористой ртути растворяют в воде в мерной колбе на 100 мл.
2. Натрия хлорид, 154 ммоль/л.

3. Материал для исследования. Сыворотка крови, свободная от гемолиза.

Ход определения: К 0,5 мл сыворотки крови добавляют 1 мл 154 ммоль/л раствора NaCl и титруют 1 г/л раствором сулемы. После появления первоначально обратимого помутнения титруют медленно с интервалом 20-30с до стойкого помутнения. Результаты сулемовой реакции выражают в количестве мл раствора сулемы, пошедшего на титрование.

Нормальные величины: 1,6 – 2,2 мл сулемы.

1.2.3. Проба Вельтмана

В пробе коагуляция наступает при прибавлении меньшего количества раствора хлорида кальция при паренхиматозном поражении печени. Коагуляция при прибавлении большего количества раствора хлорида кальция наблюдается при ревматизме, туберкулезе легких.

Принцип метода: При добавлении к сыворотке крови раствора хлорида кальция и нагревании происходит уменьшение коллоидной устойчивости сыворотки крови.

Реактивы:

1. Кальция хлорид 0,5 %.
2. Материал для исследования: сыворотка крови без гемолиза.

Ход определения: К 0,1 мл сыворотки крови прибавляют 4,9 мл воды, перемешивают, прибавляют 0,1 мл 0,5-ного раствора хлорида кальция, встряхивают и прогревают пробирку над пламенем спиртовки. Охлаждают пробирку и смотрят на свету, если хлопьев нет, то в эту же пробирку добавляют еще 0,1 мл хлорида кальция и вновь греют. Процедуру повторяют пока не выпадут хлопья.

Нормальные величины: В норме коагуляция наступает при прибавлении 0,4-0,5 мл раствора хлорида кальция.

1.3. Белковые фракции и их диагностическое значение. Основные методы фракционирования белков сыворотки крови

Состав фракций белков, выделяемых в биологических жидкостях, в значительной степени зависит от применяемого метода. Основные методы исследования белков сыворотки крови:

- высаливание нейтральными солями,
- электрофоретическое фракционирование,
- иммунологические методы,
- седиментационный способ,
- хроматография,
- гель-фильтрация,
- осаждение этиловым спиртом при низкой температуре.

Наиболее информативными являются электрофоретические методы разделения.

При электрофоретическом разделении через исследуемую сыворотку, помещенную в камеру с буферным раствором, пропускают электрический ток определенной силы и напряжения (рис. 1).



Рис. 1. Прибор для электрофореза

В зависимости от электрического заряда и других физических и химических свойств белковые фракции передвигаются к одному из полюсов. Количество выделенных белковых фракций зависит от применяемой поддерживающей среды. В качестве поддерживающей среды при электрофорезе применяют бумагу, пленки ацетат целлюлозы, гели крахмала, сефадекса, полиакриламида, агара и комбинированные среды.

Электрофорез на бумаге. Оценка результатов производится фотометрически после элюирования отдельных фракций белков или на денситометре (рис. 2).

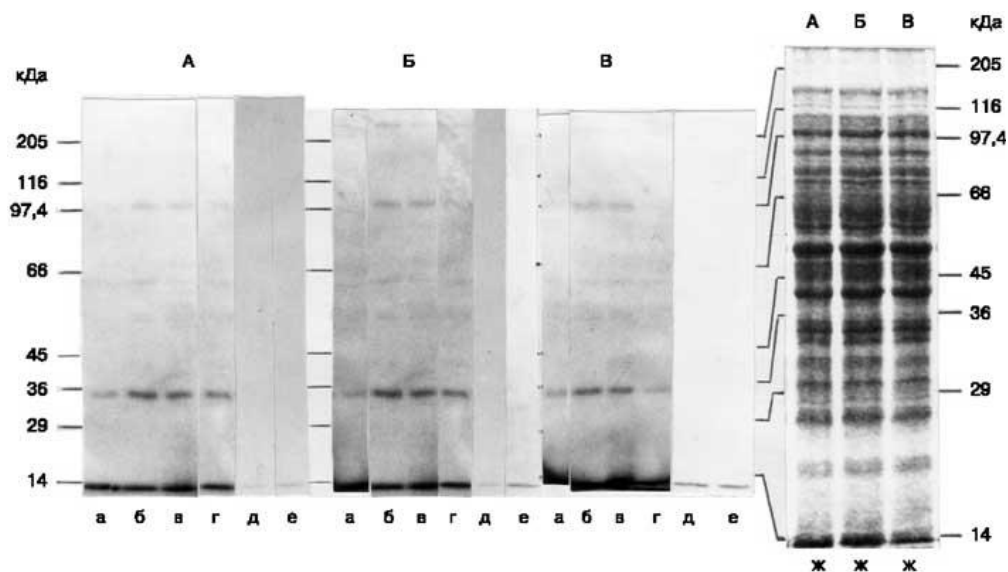


Рис. 2. Электрофорез белков на бумаге

Общее количество фракций получается небольшое:

- альбумин, самая большая и наиболее быстро движущаяся к аноду фракция, выявляется обычно в виде одного белка, составляет наиболее заметную фракцию,
- α 1-глобулины, включает многие индивидуальные белки, в том числе: α 1 антитрипсин, серомукоид, антихимотрипсин, транскортин, тироксин-связывающий глобулин,
- α 2-глобулины, зона в которой много белков, например, антитромбин III, эритропоэтин, плазминоген, церулоплазмин, гаптоглобин, холинэстераза, макроглобулин и другие,
- β -глобулины включают трансферрин, фибриноген, транскобаламин, C-реактивный белок, липопротеины,
- γ -глобулины - наиболее медленно движущаяся к аноду фракция содержит иммуноглобулины Ig G, IgA, Ig M, Ig D, Ig E.

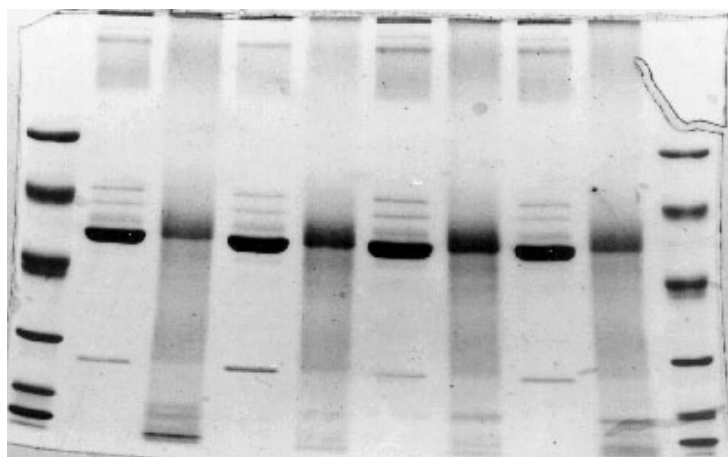


Рис. 3. Электрофорез белков сыворотки крови

Электрофорез на пленках из ацетата целлюлозы, гелях полиакриламида обладает рядом преимуществ: одинаковый размер пор позволяют увеличить четкость разделения, время, необходимое для разделения, значительно меньше, чем при электрофорезе на бумаге. Для получения четкой электрофореграммы достаточно 0,1-0,3 мкл образца.

Альбумин. Данный белок, имеющий относительную молекулярную массу 65 кДа, синтезируется в печени. Концентрация альбумина в плазме крови поддерживается на высоком уровне благодаря относительной непроницаемости для этого белка стенок кровеносных сосудов. Этот концентрационный градиент важен для поддержания постоянства объема плазмы крови. Содержание в норме: 3,5-5,5 г%. Альбумин не содержит углеводных остатков, образован одной длинной полипептидной цепью с большим количеством дикарбоновых аминокислот, имеет отрицательный заряд. Поэтому удерживает много положительных ионов натрия и создает основную часть осмотического давления крови.



Рис. 4. Глобулярная структура альбумина

Уникальность его пространственной структуры заключается в том, что он способен формировать высоко и низко специфичные сайты для связывания различных молекул, он обратимо соединяется с билирубином, жирными кислотами, ионами кальция, хлора, лекарственными веществами. Структурно-функциональная изменчивость является источником дополнительных функциональных способностей, в частности возможности формирования буферной антиоксидантно-проксидантной системы.

Определение его концентрации в сыворотке крови является важным диагностическим показателем в лабораторной практике. Снижение концентрации приводит к выраженному нарушению метаболизма. Гипоальбуминемия вызывается следующими факторами:

- ослаблением синтеза альбуминов биоэнергетических процессов, истощением ферментных систем;
- нарушением утилизации белка тканями при одновременном повышении его распада;
- нарушением динамического равновесия белков крови и тканей;
- использованием белка для энергетических целей при нарушении энергетического и углеводного метаболизма;
- пропотеванием альбуминов в межтканевые пространства в силу повышенной проницаемости клеток эндотелия капилляров;
- потерей белка через почки, раневые и ожоговые поверхности;
- нарушением усвоения белка вследствие поражения желудочно-кишечного тракта.

Лизоцим – белок, секретируется во всех организмах, от вирусов до человека. Имеется в сыворотке крови человека, в слезах, секретах из носа. Белок с молекулярной массой 14 кДа. Действует на пептидогликаны гр⁺ бактерий, поэтому называют мурамидазой, т.е. расщепляет основное вещество клеточной

стенки – муреин. Гидролизует 1,4 гликозидные связи между N-ацетилмурамовой кислотой и N-ацетилглюкозамином. Представляет собой глобулярный белок из 129 аминокислот, содержит 4 дисульфидных мостика. 30 % это альфа-спираль, 70% - бета-структура. Лизоцим быстро синтезируется, накапливается в лизосомах и поступает в среду в зависимости от различных стимулов. Особенно велика его активность на слизистых оболочках. В сыворотке крови он менее активен из-за самоассоциации в гуморальной среде. Но он придает сыворотке крови 50 % бактерицидности. Лизоцим повышает свертываемость крови, способен связывать биогенные амины и другие БАВ, участвует во многих физиологических процессах, способствует выработке антител.

С-реактивный белок (СРБ) - свое название получил за способность вступать в реакцию преципитации с С-полисахаридом пневмококков. В сыворотке крови здоровых людей его мало – до 5 мг/мл. Обнаруживается при многих заболеваниях, которые сопровождаются воспалением, некрозом тканей, он самый чувствительный маркер, увеличивается в 20-100 раз и до 1000 в первые 6-8 часов. Имеет важное диагностическое значение при ревматизме, инфаркте миокарда и является в этом случае более чувствительным тестом, чем РОЭ, лейкоцитоз.

СРБ может находиться в виде пентапексина, имея в составе 5 одинаковых негликозилированных субъединиц, нековалентно связанных друг с другом с молекулярной массой 100 кДа, а также в виде одиночной цепи – нео СРБ. Пентамер СРБ переходит в мономер, который индуцирует воспалительный процесс. Он является мультифункциональным белком острой фазы, играет решающую роль при воспалении, в защите от чужеродных антигенов, в аутоиммунных процессах: он связывается с бактериальными полисахаридами, гликолипидами и это ведет к активации по классическому пути системы комплемента, участвует в регуляции функции иммунокомпетентных клеток. СРБ активизирует моноциты, регулирует функцию нейтрофилов, усиливает фагоцитоз, индуцирует хемотаксис и выработку супероксидазы.

Гаптоглобин (Hr) – гликопротеид, образует прочный комплекс с гемоглобином и таким образом предохраняет организм от потери железа. Hr составляет 1,2-1,4% от общего количества протеинов сыворотки. Имеется 2 типа гаптоглобина: Hr I с молекулярной массой 85 кДа, константой седиментации 4,5 S и Hr II с молекулярной массой 165 кДа, константой седиментации 7 S. Фенотип Hr I-I у гомозигот, химически однороден, он способен связывать одну молекулу гемоглобина (Hb), а Hr II-II гомозиготный и Hr II-I гетерозиготный связывают по 2 молекулы гемоглобина. Молекулярный вес комплекса Hb и Hr I-I - 155 кДа, а вес комплексов Hb и Hr II-II, а также Hb с Hr II-I по 310 кДа. Комплексы при внутрисосудистом гемолизе быстро выводятся из кровотока купферовскими клетками печени.

Наследование Hr зависит от двух аутомных генов Hr1 и Hr2, которые кодируют пептидные $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - и β -цепи. У гомозигот Hr I-I имеется только $\alpha 1$ -цепь, у Hr II-II только $\alpha 2$ -цепь, а у гетерозигот Hr II-I есть и $\alpha 1$ -, и $\alpha 2$ -цепи в

равном соотношении. Типы передаются по наследству, поэтому фенотипирование используют в судебно-медицинской практике.

Гаптоглобин является реактантом острой фазы, неспецифически увеличивается его содержание на различные патологические стимулы. Он комплексируется со многими веществами, которые образуются при распаде клеток, является естественным ингибитором катепсина В. Комплекс Нр-Нв является пероксидазой, вместе с церулоплазмином тормозит перекисное окисление.

Церулоплазмин (Ср) - медьсодержащий гликопротеин плазмы крови, состоит из 8 субъединиц. В состав активного центра церулоплазмينا входит 6-7 ионов меди, это 95% всей меди организма. Церулоплазмин осуществляет транспорт меди в организме. Выявлен генетический полиморфизм церулоплазмينا. Основным источником синтеза этого белка является печень, но и некоторые ткани также способны его вырабатывать: лимфоциты, клетки селезенки, ткани мозга, бронхов.

Функции церулоплазмينا многообразны:

- является ферроксидазой – окисляет 2-х валентное железо до 3-х валентного, которое встраивается в трансферрин. Трансферрин транспортирует железо в костный мозг, где происходит синтез гема. Таким образом церулоплазмин способствует кроветворению;
- обладает антиоксидантным действием, усиливая связывание окисленных ионов железа с трансферрином – исключает их из реакции перекисного окисления, удаляет радиотоксины, сохраняет систему кроветворения и таким образом повышает выживаемость организма;
- церулоплазмин оказывает противовоспалительное действие, значительно увеличивается в сыворотке крови при различных инфекционных заболеваниях;
- церулоплазми регулирует уровень биогенных аминов в организме, участвует также в метаболизме других медиаторов нервной системы, регулирует уровень норадреналина, адреналина, серотонина.

Трансферрин (Тf) – железосодержащий гликопротеид с молекулярной массой 76-80 кДа. Молекула скручена и имеет 2 глобулярных домена, в каждом имеется сайт для связывания железа. Комплекс металл-белок устойчив. Синтезируется в гепатоцитах. Трансферрин получает железо от гемоглобина. Старые эритроциты захватываются макрофагами, которые освобождают железо из протопорфиринового кольца путем действия гемоксикиназы и отдают его трансферрину.

Трансферрин находится при электрофорезе в β -глобулиновой фракции. Комплекс трансферрина с железом окрашивается в оранжевый цвет, здесь железо находится в 3-х валентной форме. Концентрация у здоровых людей от 200 до 400 мг%. Выявлено 19 типов трансферрина, различающихся по величине заряда белков молекулы, аминокислотному составу и числу молекул сиаловых кислот. Типы связаны с наследственными особенностями. В норме трансфер-

рин насыщен железом на 1/3, дополнительное количество железа, которое может связаться с трансферрином, составляет ненасыщенную (латентную) железосвязывающую способность сыворотки крови.

В плазме здорового человека трансферрин может находиться в 4-х молекулярных формах:

- апотрансферрин - не связанный с железом;
- моножелезистый трансферрин С – железо занимает один сайт для связывания в С-терминальном домене;
- моножелезистый трансферрин N – железо только в N-концевом домене;
- дижелезистый трансферрин – железо находится в С- и N-доменах.

Сывороточный трансферрин является источником железа для всех клеток тела. Для поступления железа в клетки есть специальные механизмы – трансферриновый рецептор, он состоит из двух доменов с молекулярной массой 180 кДа. На каждом домене возможно связывание двух молекул трансферрина. Уровень экспрессии рецептора отражает потребности клетки в поглощении железа, которые определяются скоростью клеточного деления. При присоединении трансферрина к рецептору комплекс подвергается эндоцитозу, и железо освобождается от трансферрина при низком рН. Затем железо через эндосомальную мембрану транспортируется во внутриклеточный пул железа, а комплекс апотрансферрин-рецептор с помощью анутриклеточных везикул возвращается на наружную поверхность клетки. Рецептор остается включенным в мембрану, а апотрансферрин освобождается в окружающую среду.

Повышение уровня трансферрина наблюдается при дефиците железа, оно может предшествовать развитию анемии. Понижение уровня трансферрина отмечается при многих хронических процессах, при циррозе печени, потери белка при ожогах, нефротическом синдроме и гастроэнтеритах, злокачественных опухолях.

Гемоглобин – комплекс, содержащий в своем составе железо, составляет молекулярную основу дыхательной функции крови, транспортирует кислород и углекислый газ. Молекулярный вес равен 66 кДа, форма молекулы шарообразная. В воде гемоглобин хорошо растворяется.

Гемоглобин состоит из белка глобина и гемма (ферропротопорфирина), нековалентно связанных между собой (рис. 5). Гемм представляет плоскую молекулу, в которой ион железа в центре ядра протопорфирина. Белок глобин представляет собой тетрамер, состоящий из двух α - и двух β -цепей, имеет внутри полость, в которую обращены неполярные группы аминокислот. Они защищают молекулу изнутри от контакта с водой и стабилизируют молекулу в целом.

Уровень гемоглобина в норме составляет 132-164 г/л, повышается при гипоксии, при хронической легочной недостаточности, врожденных пороках сердца, при потере жидкости организмом, при отравлении угарным газом. Снижается при расстройстве всасывательной способности железа, при острых

кровотечениях, при гемолизе, остеомиеломах, фиброзе, остеобластах, раке, поражениях почек.

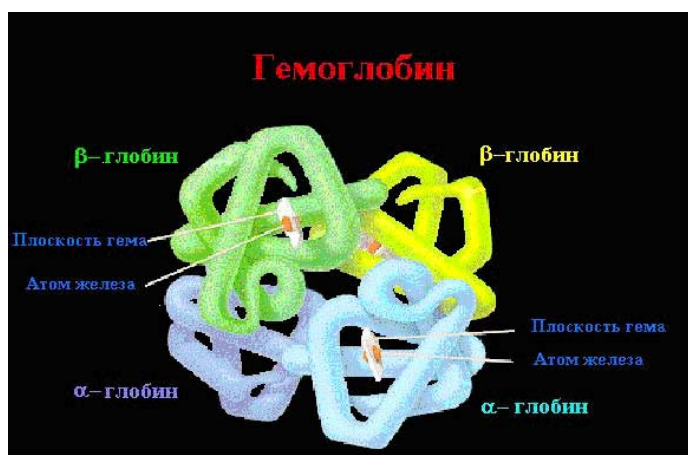


Рис. 5. Структура гемоглобина

Миоглобин – хромпротеин, содержащийся в миокарде и скелетной мускулатуре, поэтому увеличивается его содержание в крови при инфаркте миокарда и при повреждении мышц. Значение его определения имеет в первые часы инфаркта миокарда (ИФМ), особенно при атипичном течении. Снижение концентрации происходит по разным типам, что имеет прогностическое значение:

- литический – характеризуется одним пиком повышения концентрации с постепенным снижением к 16-36 часам. Он характерен для неосложненного течения ИФМ.
- гектический протекает в форме скачкообразных изменений от высоких цифр до нормы в первые 24 часа.
- постоянный - характеризуется постоянным высоким содержанием миоглобина с небольшими колебаниями. Наблюдается при осложненном тромбоэндокардитом ИФМ.

Компоненты системы комплемента – это сложная система белков, включающая около 20 взаимодействующих компонентов: C1, C2, C3.....C9, фактор В, фактор D и ряд регуляторных белков. Все эти компоненты – растворимые белки с молекулярной массой от 24 до 400 кДа, циркулирующие в крови и тканевой жидкости. Большинство из них не активны до тех пор, пока не будут приведены в действие или в результате иммунного ответа (с участием антител), или непосредственно внедрившимся микроорганизмом.

Один из возможных результатов активации комплемента - последовательное объединение так называемых поздних компонентов (C5, C6, C6, C7, C8 и C9) в большой белковый комплекс, вызывающий лизис клеток (мембранатакующий, комплекс). Агрегация поздних компонентов происходит в результате ряда последовательных реакций протеолитической активации с участием ран-

них компонентов (C1, C2, C3, C4, фактора в и фактора D). Большинство этих ранних компонентов – проферменты, последовательно активируемые путем протеолиза. Когда какой-либо из этих проферментов расщепляется, он становится активным протеолитическим ферментом и расщепляет следующий профермент, и т.д. Так как многие из активированных компонентов прочно связываются с мембранами, большинство этих событий происходит на поверхности клеток.

Центральный компонент этого протеолитического каскада C3-компонент. Его активация путем расщепления представляет собой главную реакцию всей цепи системы комплемента. Он может быть активирован классическим и альтернативным путем. В обоих случаях C3 расщепляется C3-конвертазой.

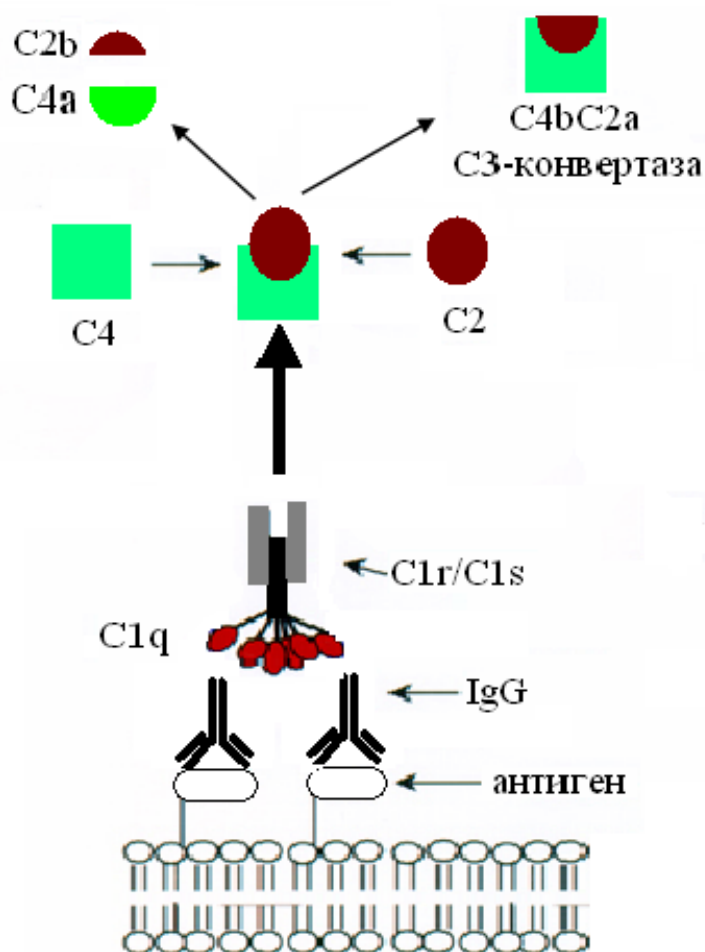


Рис. 6. Образование C3 конвертазы

C3-конвертаза расщепляет C3 на 2 фрагмента – большой C3b и C3a. C3b связывается с мембраной клетки мишени и с C3-конвертазой. В результате образуется большой ферментный комплекс с измененной специфичностью - C5-конвертаза. Затем C5-конвертаза расщепляет C5 и тем самым инициирует сборку литического комплекса из поздних компонентов от C5 до C9. Каждый активированный фермент расщепляет много молекул следующего профермента.

Каскад активации ранних компонентов действует как усилитель: каждая молекула, активированная в начале всей цепи, приводит к образованию множества литических компонентов.

Функции белков системы комплемента:

- опсонизирующая – т.е. присоединяются к микроорганизмам, привлекая тем самым клетки иммунной системы и усиливая фагоцитоз.
- участие в воспалительных реакциях, активация системы комплемента приводит к выделению из тканевых базофилов БАВ, которые стимулируют воспалительную реакцию. С3а способен вызывать миграцию нейтрофилов к месту воспаления, индуцировать их прикрепление к эндотелию сосудов, вызывать в них развитие респираторного взрыва и дегрануляцию. С5а содействует хемотаксису, агрегации и дегрануляции нейтрофилов и образованию свободных радикалов кислорода.
- цитотоксическая или литическая функция. В конечной стадии активации комплемента образуется мембраноатакующий комплекс, который атакует мембрану бактериальной клетки и разрушает ее.

мембраноатакующий комплекс

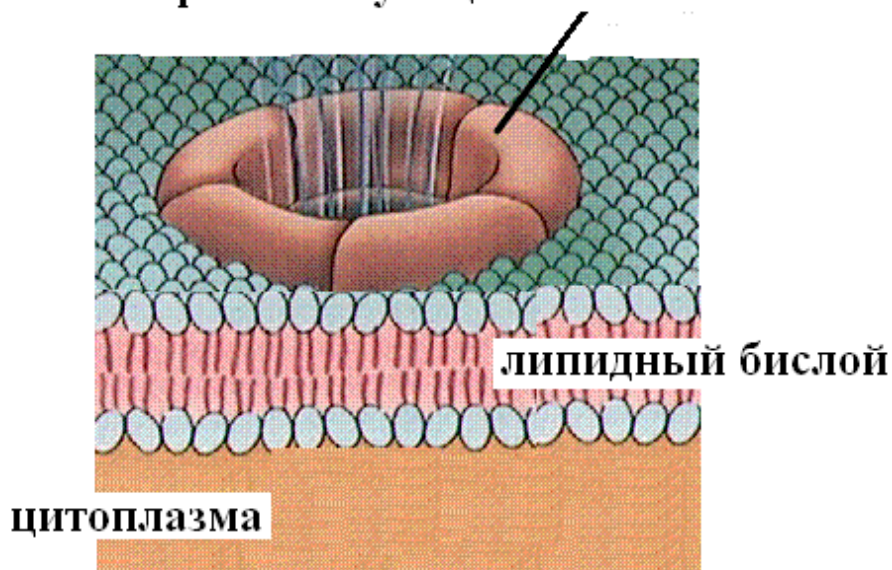


Рис. 7. Мембраноатакующий комплекс

α 2-макроглобулин – ингибитор протеаз, регулирует активность различных протеолитических ферментов. Это гликопротеин с молекулярной массой 720 кДа, состоит из 2-х субъединиц нековалентно связанных. В молекуле имеются ионы кальция и магния. α 2-макроглобулин устойчив к действию температуры, чувствителен к кислым реакциям среды. Синтезируется в печени, присутствует в сыворотке крови, во внеклеточной, синовиальной, амниотической, спинномозговой, лимфатической жидкости. Потеря этого белка приводит к летальному исходу.

На долю α_2 -макроглобулина приходится до 12% ингибиторной активности крови. Образование комплекса между ферментом и ингибитором – это сложная многоступенчатая реакция. На первом этапе активная протеаза реагирует с α_2 -макроглобулином, образуется непрочная связь, на втором этапе фермент расщепляет пептидную связь и это приводит к конформационному изменению α_2 -макроглобулина, а на третьем этапе протеаза ковалентно присоединяется к особому участку в молекуле α_2 -макроглобулина. Это приводит к образованию компактной структуры, к фактическому захвату протеазы и ее блокированию, т.е. α_2 -макроглобулин как бы ловит фермент и лишает его протеолитической активности, поэтому его еще называют рестриктор протеаз.

α_2 -макроглобулин влияет на способность макрофагов и нейтрофилов мигрировать в участки воспаления и на синтез различных медиаторов. Ингибирует активность НК-клеток. α_2 -макроглобулин способен связываться с мембранами клеток РЭС, лимфоцитами, макрофагами. Белок изменяет реакции лимфоцитов на чужеродные антигены, лимфокины. Имея широкую специфичность в отношении различных протеаз, выполняет защитные функции, инактивируя большинство протеаз, которые при патологии накапливаются. Образует защитный барьер против патогенных микроорганизмов и паразитов, которые выделяют протеолитические ферменты.

Уровень α_2 -макроглобулина снижается при вирусном гепатите, на ранних стадиях ожоговой болезни. Увеличение отмечается при нефротическом синдроме, у больных сахарным диабетом. Особая роль белка имеется при злокачественных опухолях. При далеко зашедшем процессе снижается его уровень в 2-5 раз на фоне повышения массы опухоли.

Фибриноген – гликопротеин с молекулярной массой 340 кДа, представляет собой тетрамер в каждом по 3 полипептидных цепи. Фибриноген вырабатывается паренхимными клетками печени. Фибриноген под влиянием тромбина превращается в фибрин по типу протеолитического дробления молекулы. Сначала тромбин отщепляет от молекулы фибриногена два пептида А, образуя неполноценные мономеры фибрина – дезА-мономеры. Затем отщепляются два пептида В. Возникают А-В мономеры или полные мономеры фибрина.

Фибринопептиды А иногда появляются в крови – это говорит о внутрисосудистом свертывании крови. Оставшаяся молекула фибриногена – фибрин-мономер приобретает способность соединяться с себе подобными и образовывать фибрин-полимер, который представляет гель. Сборка мономеров проходит этапы формирования димеров, которые в продольном и поперечном сшивании образуются полимеры фибрина – протофибриллы, а затем нити фибрина. Тромб из такого фибрина легко растворяется фибринолизинем и он не может обеспечить полноценный гомеостаз. Это бывает причиной кровотечений и плохого заживления ран.

1.3.1. Метод электрофоретического разделения на пленках целлюлозы

Принцип метода: коллоидные частицы белка перемещаются в электрическом поле постоянного тока: в щелочной среде - к аноду, в кислой среде - к катоду. В щелочной среде в электрическом поле наиболее быстро перемещаются альбумины, затем α 1-глобулины, α 2-глобулины и γ -глобулины.

Реактивы:

1. 5,5 Диэтилбарбитуровой кислоты натриевая соль (мединал).
2. Лимонная кислота.
3. Барбитал- цитратный буфер рН 8,6: 7,36 г диэтилбарбитурата натрия, 0,3 г лимонной кислоты растворяют в 700 мл воды в мерной колбе вместимостью 1 л, проверяют рН и доводят водой до метки.
4. Бромфеноловый синий водорастворимый, индикатор.
5. Уксусная кислота ледяная.
6. Трихлоруксусная кислота (5%-ный раствор).
7. Раствор для окрашивания: 0,5 г бромфенолового синего и 20 мл ледяной уксусной кислоте довести до 1 литра водой.
8. Отмывающий раствор – уксусная кислота, (5%-ный раствор).

Ход определения: Смочить пленки из ацетата целлюлозы буферным раствором 5 минут. Удалить избыток влаги. Фильтровальной бумагой. Поместить пленки в камеру, закрыть камеру крышкой и пропустить ток напряжением 150В в течение 5 минут, после чего выключают ток. Нанести 1-4 мкл сыворотки крови узкой полосой на катодный край пленки. Провести электрофоретическое разделение сыворотки крови при напряжении 150 В и силе тока 1 мА на 1 см поперечного сечения полоски в течение 20 минут. Затем достать пленки, высушить в течение 5-10 минут в сушильном шкафу при температуре 100°C в течение 10 минут. Окрашивание проводят красителем в течение 15 минут. Избыток красителя отмывают 5%-ным раствором уксусной кислоты до исчезновения фона.

Нормальные величины у взрослых: альбумины - 58%, α 1-глобулины - 3,9%, α 2-глобулины - 8,8%, β -глобулины - 13,0%, γ -глобулины - 18,5%.

1.3.2. Разделение белков сыворотки крови методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ)

Принцип метода: коллоидные частицы белка перемещаются в электрическом поле постоянного тока: в щелочной среде – к аноду, в кислой – к катоду. В щелочной среде в электрическом поле наиболее быстро перемещаются альбумины, затем α 1-глобулины, α 2-глобулины и γ -глобулины.

ПААГ как поддерживающая среда для электрофореза обладает рядом необходимых качеств: хорошими механическими свойствами, отсутствием сорбции биомолекул, прозрачностью для видимой части света и ультрафиолета, низкими эндоосмическими показателями, возможностью получения геля с заданными размерами микропор.

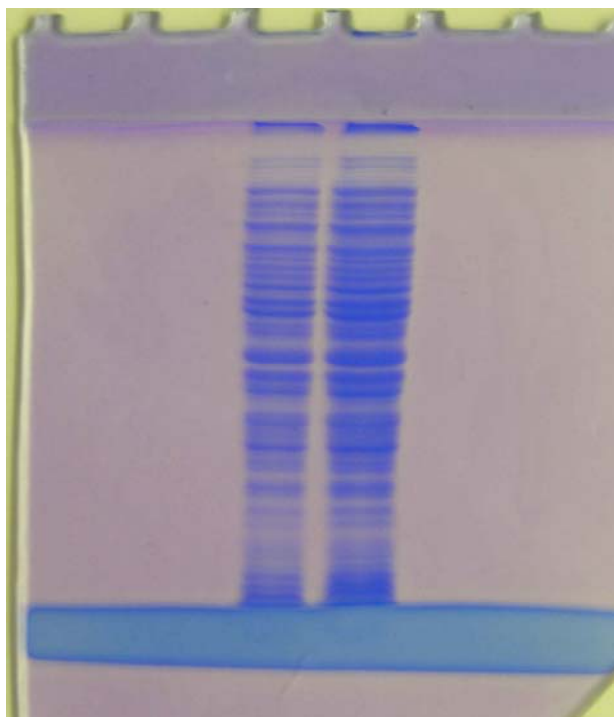


Рис. 8. Электрофорез белков в геле

Структура геля имеющая поры соизмеримые с величиной макромолекул обуславливает возможность фракционирования в электрическом поле не только по заряду, но и по молекулярной массе за счет «ситового эффекта».

Трехмерная структура ПААГ образуется в результате сополимеризации акриламида с метиленбисакриламидом в присутствии катализатора персульфата аммония и тетраметилэтилендиамида (ТЭМЭД).

Характеристика ПААГ должна соответствовать диапазону молекулярных масс разделяемых смесей. В ряде случаев эффективно применяются гели с градиентом концентрации и, соответственно, размеров пор, что позволяет значительно расширить диапазон фракционирования и увеличить разрешающую силу метода за счет нарастания «ситового эффекта» и формирования более узких зон.

Под действием электрического поля смесь белков сначала концентрируется в очень узкую зону, а затем происходит разделение ее за счет действия «ситового эффекта». Имеется много неоднородных буферных систем, позволяющих исследовать разнообразные кислые и щелочные белки при различных значениях рН и параметрах гелей, а также в присутствии детергентов. Особенно часто в электрофорезе белков применяется додецилсульфат натрия (ДСН). Являясь сильным анионным детергентом он взаимодействует со всеми белками. Комплексируясь с молекулой белка, ДСН нивелирует ее собственный заряд, превращая ее в полианион. Так как большинство белков связывает примерно одинаковое количество ДСН на единицу массы, то подвижность этих комплексов в ПААГ зависит практически только от молекулярной массы белка.

Реактивы:

1. Электродный буфер (10-кратный) 1,92М глицин-трис, 1% SDS-Na, pH 8,5. Для приготовления 1 л буфера берется 144 г глицина, 25 г триса, 10 г SDS-Na.
2. Буфер для разделяющего геля (4-кратный) 1,5М трис-HCl, pH 8,8; 18,05 г на 100 мл H₂O.
3. Буфер для концентрирующего геля (4-кратный) 0,5М трис- HCl, pH 6,8; 6,05 г на 100 мл H₂O.
4. 40%-ный акриламид/метиленабисакриламид (Аа/МБА) на 100 г раствора 38,1 г акриламида и 1,9 г метиленабисакриламида.
5. 10%-ный SDS-Na.
6. 10%-ный персульфат аммония (ПСА) – иницирующий раствор.
7. Тетраметил этилендиамин (ТЕМЕД) – катализатор.
8. Разделяющий гель: 3 мл 40%-ного Аа/МБА; 2,5 мл 4-кратного буфера для разделяющего геля; 4,3 мл H₂O; 0,1 мл 10%-ного SDS-Na; 0,2 мл ТЕМЕД; 0,8 мл 10%-ного персульфата аммония.
9. Концентрирующий гель 5%: 0,63 мл 40%-ного Аа/МБА; 6,05 мл 4-кратного буфера для разделяющего геля; 1,25 мл 4-кратного буфера для концентрирующего геля; 3,02 мл H₂O; 0,5 мл 10%-ного SDS-Na; 0,1 мл ТЕМЕД; 0,4 мл 10%-ного персульфата аммония.

Ход работы: Приготовить разделяющий гель. Смешать все компоненты, 10%-ный ПСА добавляется непосредственно перед заливкой. Смесь перемешивают, заливают на высоту 6,5-7 см. Затем на гель наслаивают 0,5 мл H₂O для предотвращения доступа воздуха. Через 15 минут воду сливают, остатки удаляют фильтровальной бумагой.

Готовят концентрирующий гель в том же порядке и заливают его поверх разделяющего геля доверху и вставляют гребенку. Полимеризация геля длится не менее 1 часа с момента заливки концентрирующего геля. Образцы белка растворяются в 10-15 мл буфера для образцов (1 мл 10-кратного электродного буфера, 1,0 мл 10%-ного SDS, 0,8 мл H₂O). Образец кипятится на водяной бане 1-2 мин, в него добавляется мочевины для утяжеления и БФС в качестве лидирующего красителя. Для фореза берется по 6-8 мкг на каждый белок или 30-40 мкг общего белка. Перед форезом из геля вынимается гребенка, снизу убирается скотч, пластины устанавливаются в аппарат.

Электродный буфер разбавляется в 10 раз и заливается в аппарат. В ячейки наносятся образцы и подается напряжение 50 V, после вхождения образцов в разделяющий гель, напряжение увеличивают до 150 V. Форез прекращают, когда краситель находится у нижней кромки геля. После фореза пластинку геля отделяют от стеклянных пластин и погружают в фиксирующий раствор 50%-ного этанола, 5%-ной уксусной кислоты на 15 минут. При этом происходит отмывка SDS, облегчающая дальнейшее окрашивание. После этого гель погружают в окрашивающий раствор 3,5%-ной хлорной кислоты, 0,04%-ного кумаси G 250 на несколько часов. После окрашивания гель отмывают в 5%-ной уксусной кислоте.

Имеются и другие прописи приготовления реактивов:

Запасной раствор акриламида $T=30$, $C=2,2$ (акриламид 28,8 г, метиленисакриламид – 1,2 г; H_2O до 100 мл) для приготовления гелей с концентрацией 10-20 %.

1. Запасной раствор акриламида $T=30$, $C=6$ для приготовления гелей с концентрацией 2-5 %.
2. Буфер для разделяющего геля: 3М трис-НСI, рН 8,8 (трис-оксиметиламинометан) – 1,6 г; H_2O до 100 мл; рН 8,8.
3. Буфер для концентрирующего геля 0,5М трис-НСI, рН 6,8 (трис 6,0 г, H_2O – до 100 мл; рН 6,8).
4. Электродный буфер рН 8,4 (0,0125М трис: 0,364М глицин; 0,1% ДСН; рН 8,4).
5. Диссоциирующий буфер (0,05 М трис-НСI, рН 6,8; 2%-ный ДСН; 10%-ный глицерин; 0,001%-ный бромфеноловый синий).
6. Раствор красителя (0,25%-ный кумасси R-250 в смеси этанола: вода: уксусная кислота – 5 : 4 : 1).
7. Отмывочный раствор (этанол : вода: уксусная кислота – 2 : 7 : 1).
8. Консервирующий раствор для сушки геля (глицерин – 15 мл; уксусная кислота – 10 мл; этанол – 5 мл; H_2O – 80 мл).
9. Раствор для приготовления разделяющего геля до 15 % (запасной раствор акриламида $T=30$, $C=2,2$ (№1) – 7,5 мл; буфер для разделяющего геля (№ 3) – 3,75 мл; H_2O – 2,5 мл; 10%-ный персульфат аммония – 0,038 мл; ТЕМЕД – 0,003мл; глицерин – 1,2 мл).
10. Раствор для приготовления концентрирующего 3% геля (запасной раствор акриламида $T=30$, $C=6$ (№ 2) – 1 мл; буфер для концентрирующего геля (№ 4) – 2,5 мл; H_2O – 6,45 мл; 10%-ный персульфат аммония – 0,05 мл; ТЕМЕД – 0,005 мл).

Все растворы, хранящиеся в холодильнике, перед употреблением нагревают до комнатной температуры.

Ход работы: Собрать пластинки вертикального электрофореза. Раствором акриламида № 10 заполнить камеру с помощью длинной тонкой иглы до уровня 20-25 мм ниже края вырезки на стекле. Сверху осторожно наслоить насыщенный водой бутанол и пластинку установить вертикально для полимеризации геля на 30-40 минут.

Перед формированием концентрирующего геля бутанол сливают, верхний край геля промывают раствором буфера для концентрирующего геля, вставляется гребень так, чтобы его зубцы были на 5-7 мм выше геля и заливают концентрирующий гель (№ 11). После полимеризации геля вынимают гребень, заполняют электродным буфером и в образовавшиеся карманы вносятся приготовленные образцы сыворотки крови человека в количестве 8-10 мкл. Сыворотку крови предварительно смешивают в соотношении 1:1 с диссоциирующим буфером, в который добавлен детергент и капля бромфенолового синего и смесь прогревают на водяной бане 2-3 минуты.

Нижний электрод прибора соединяется с «+», а верхний с «-» источника постоянного тока. Электрофорез проводят при комнатной температуре при токе 18-25 мА, до того как маркерный краситель подойдет к нижнему краю геля.

Пластинка вынимается из прибора, гель помещают в кювету, ополаскивают водой и заливают красящим раствором на 30 минут при комнатной температуре. Затем гель многократно промывают отмывочной смесью до исчезновения фона. Отмытый гель помещают в консервирующий раствор на 30 минут.

1.3.3. Определение некоторых индивидуальных белков сыворотки крови

1.3.3.1. Определение гаптоглобина

Принцип метода: сывороточный гаптоглобин образует с раствором гемоглобина комплекс, осаждаемый риванолом. По уровню оставшегося в растворе гемоглобина фотометрически определяют содержание гаптоглобина в сыворотке крови.

Реактивы:

1. Риванол. К 100 мг риванола добавить 15 мл дистиллированной воды, встряхнуть до полного растворения.
2. Гемоглобин. К 100 мг гемоглобина добавить 10 мл дистиллированной воды, встряхнуть и центрифугировать 10 минут при 3000 об/мин для удаления агрегатов.
3. раствор сульфата аммония 10 %.

Ход определения: Для проведения исследования необходимо поставить 3 пробы: опытную, контрольную и стандартную.

В опытную пробу вносят 0,3 мл дистиллированной воды, 0,5 мл негемолизированной сыворотки, 0,2 мл раствора гемоглобина и перемешивают.

В контрольную пробу вносят 0,5 мл дистиллированной воды, 0,5 мл сыворотки крови и перемешивают. Обе пробы инкубируют 10 минут при комнатной температуре, после чего добавляют по 3 мл раствора риванола.

В стандартную пробу вносят 2,8 мл дистиллированной воды и 0,2 мл гемоглобина, перемешивают. Через 5 минут все три пробы центрифугируют при 3000 об/мин в течение 6-7 минут. К надосадочной жидкости добавляют 0,2 мл 10 %-ного раствора сульфата аммония и инкубируют 60 минут при комнатной температуре.

Далее измеряют оптическую плотность опытной, контрольной и стандартной проб по отношению к дистиллированной воде в кюветах с толщиной слоя жидкости 5 мл на ФЭК (зеленый светофильтр, № 6)

Оценка результата; расчет ведут по формуле:

$$X = ((E_c - (E_o - E_k) \times 2) / E_c,$$

где X - концентрация гаптоглобина г/л; E_c, E_o, E_k – оптическая плотность стандартной, опытной, контрольной проб.

Содержание гаптоглобина в сыворотке крови составляет 0,4-1,8 г/ л .

1.3.3.2. Определение церулоплазмина

Принцип метода: реакция основана на том, что церулоплазмин окисляет диамины. Окисленный диамин, соединяясь с диметилпарафенилендиамином, дает розовое окрашивание, интенсивность которого пропорциональна ферментативной активности церулоплазмина.

Реактивы:

1. 0,5%-ный раствор солянокислого парафенилендиамина (ПФД) в ацетатном буфере рН 5,2.
2. Ацетатный буфер рН 5,2: 20 мл ледяной уксусной кислоты и 163 г ацетата натрия ($\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) разводят в 1 л дистиллированной воды.
3. 0,25%-ный раствор роданистого калия.

Ход определения: К 1мл раствора ПФД прибавляют 0,1 мл сыворотки, инкубируют 30 минут при 37°C, затем ингибируют добавлением 5 мл роданистого калия и помещают пробирки в лед. Определяют оптическую плотность на ФЭК при длине 525 нм против контрольного опыта.

Для построения калибровочной кривой надо взять чистый препарат церулоплазмина, сделать разведения от 0,05 до 1, 0 мг% и провести работу как в опыте.

1.3.3.3. Определение гемоглобина

Принцип метода: присоединение к гему различных химических групп сопровождается изменением окраски, на этом основано определение концентрации гемоглобина в крови. Гемоглобин окисляют в метгемоглобин железосинеродистым калием. Образующийся с ацетонциангидрином окрашенный цианметгемоглобин определяют колориметрически.

Исследование содержания гемоглобина в крови включает определение гемоглобина и его дериватов, которые присутствуют в крови здоровых людей или появляются при различных патологических состояниях. У здоровых людей в крови гемоглобин находится в виде оксигемоглобина, восстановленного гемоглобина и в небольшом количестве – метгемоглобина, карбоксигемоглобина и вердоглобина.

Реактивы:

1. Трансформирующий раствор: 0, 5 мг ацетонциангидрина; 0, 2 г калия железосинеродистого; 1 г натрия гидрокарбоната; дистиллированная вода – до 1 л. Раствор желтого цвета, прозрачный. При обесцвечивании или появлении осадка непригоден.
2. Калибровочный раствор гемиглобинцианида.

Ход определения: В пробирку к 5 мл трансформирующего раствора добавляют 0,02 мл крови (разведение в 251 раз), тщательно перемешивают и оставляют стоять на 10 минут. Измеряют на ФЭКе при длине волны 500-560 нм

(зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 1 см против холостой пробы. Измеряют при тех же условиях стандартный раствор.

Расчет содержания гемоглобина производят по калибровочному графику, построенному по стандартному раствору гемиглобинцианида, или по формуле:

$$\text{Hb (г\%)} = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \times C \times K \times 0,001,$$

Где $E_{\text{оп}}$ – экстинкция опытной пробы, $E_{\text{ст}}$ – экстинкция стандартного раствора, C – концентрация гемиглобинцианида в стандартном растворе, мг%, K – коэффициент разведения крови, 0,001 – коэффициент для перерасчета мг/100 мл в г/ 100 мл.

2. АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ И ИЗОФЕРМЕНТОВ. ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Ферменты присутствуют в биологических объектах в малых концентрациях, поэтому больший интерес представляет не количественное содержание ферментов, а их активность. Принятая международная единица активности ферментов (МЕ) соответствует такому количеству фермента, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата за 1 мин в оптимальных для данного фермента условиях. В Международной системе единиц (СИ) единицей активности ферментов является катал (кат) - количество фермента, необходимое для каталитического превращения 1 моля субстрата за 1 сек.

По субстратной специфичности - способности избирательно ускорять определенную реакцию – различают:

- ферменты, обладающие абсолютной специфичностью (т.е. действующие только на одно конкретное вещество и катализирующие только определенное превращение этого вещества). К этой группе относятся, в частности, ферменты, использующие в качестве субстрата определенные стереоизомеры (например, сахара и аминокислоты L или D ряда). Например, уреазы, катализирующая гидролиз мочевины до NH_3 и CO_2 , лактатдегидрогеназа, оксидазы D и L аминокислот.
- ферменты, обладающие относительной или групповой специфичностью (т.е. катализирующие превращения молекул, обладающих определенным сходством). Относительная специфичность характерна для многих ферментов, в т.ч. для ферментов класса гидролаз: протеаз, эстераз, фосфатаз.

Скорость катализируемых ферментами реакций зависит от ряда факторов, в первую очередь - от природы фермента, обладающего низкой или высокой активностью, а также от концентрации субстрата, наличия в среде активаторов или ингибиторов, температуры и реакции среды (рН). В определенных пределах скорость реакции прямо пропорциональна концентрации субстрата, а начиная с определенной (насыщающей) его концентрации скорость реакции не меняется с возрастанием концентрации субстрата.

Оптимальная температура для активности ферментов составляет обычно 40-50°C. При более низкой температуре скорость ферментативной реакции, как правило, снижается, а при 0°C функционирование ферментов прекращается. При превышении оптимальной температуры скорость реакции снижается, а затем реакция полностью прекращается вследствие постепенной денатурации белков и инактивации. Отдельные ферменты различаются по оптимальному для их действия значению рН. Многие ферменты наиболее активны при величине рН, близкой к нейтральной (рН около 7,0), но ряд ферментов имеет оптимум рН вне этой области. Так, пепсин наиболее активен в сильноокислой среде (рН 1,0-2,0), а трипсин - в слабощелочной (рН 8,0-9,0).

Существенное влияние на активность ферментов оказывает наличие в среде определенных химических веществ: активаторов, повышающих активность ферментов, и ингибиторов, подавляющих ее. Часто одно и то же вещество служит активатором одних ферментов и ингибитором других. Ингибирование ферментов может быть обратимым и необратимым. Определяемая в норме активность ферментов в сыворотке крови есть результат сбалансированности скорости, с которой ферменты синтезируются внутри клеток и выходят из них, со скоростью удаления ферментов из внеклеточной жидкости путем инактивации и разрушения и их экскреции.

При различных заболеваниях часто наблюдается изменение активности ферментов в биологических жидкостях. Это может быть обусловлено рядом причин. Повышение активности может быть результатом ускорения процессов синтеза (например, щелочная фосфатаза при рахите, гепатите), некроза клеток (например, креатинкиназа, аспарагиновая трансаминаза при инфаркте миокарда), понижения выведения (например, щелочная фосфатаза при закупорке желчных путей), повышения проницаемости клеточных мембран (например, аспарагиновая трансаминаза, аланинаминотрансфераза при вирусном гепатите).

Большинство ферментов функционирует в тех клетках, в которых происходит их биосинтез. Исключение составляют пищеварительные ферменты, секретируемые в пищеварительный тракт, ферменты плазмы крови, участвующие в процессе свертывания крови, и некоторые другие.

Многие ферменты характеризуются наличием изоферментов - молекулярных разновидностей ферментов. Катализируя одну и ту же реакцию, изоферменты могут различаться по ряду физико-химических свойств (по первичной структуре, субъединичному составу, оптимуму рН, термостабильности, чувствительности к активаторам и ингибиторам, сродству к субстратам и т.д.). Множественные формы ферментов включают:

- генетически детерминированные изоферменты (например, лактат-дегидрогеназа)
- негенетические изоферменты, образующиеся в результате химической модификации исходного фермента или его частичного протеолиза (например, изоферменты пируваткиназы).

Различные изоформы одного фермента могут быть специфичны для разных органов и тканей или субклеточных фракций. Как правило, многие ферменты присутствуют в тканях в разных концентрациях и часто в разных изоформах, хотя известны и ферменты, специфичные для определенных органов.

Регуляция активности ферментативных реакций многообразна. Она может осуществляться за счет изменения факторов, влияющих на активность ферментов, в т.ч. рН, температуры, концентрации субстратов, активаторов и ингибиторов. Так называемые аллостерические ферменты способны в результате присоединения к их некаталитическим участкам метаболитов - активаторов и ингибиторов - изменять стерическую конфигурацию белковой молекулы (конформацию). За счет этого изменяется взаимодействие активного центра с субстратом и, следовательно, активность ферментов. Возможна регуляция актив-

ности ферментов за счет изменения количества его молекул в результате модуляции скорости его биосинтеза или деградации, а также за счет функционирования различных изоферментов.

Ферменты, которые обнаруживаются в норме в плазме или сыворотке крови, условно можно разделить на 3 группы: секреторные, индикаторные и экскреторные

Секреторные ферменты, синтезируясь в печени, в норме выделяются в плазму крови, где играют определенную физиологическую роль. Типичными представителями данной группы являются ферменты, участвующие в процессе свертывания крови, и сывороточная холинэстераза

Индикаторные (клеточные) ферменты попадают в кровь из тканей, где они выполняют определенные внутриклеточные функции. Один из них находится главным образом в цитозоле клетки (лактатдегидрогеназа, альдолаза), другие – в митохондриях (глутаматдегидрогеназа), третьи – в лизосомах (β -глюкуронидаза, кислая фосфатаза) и т.д. Большая часть индикаторных ферментов в сыворотке крови определяется в норме лишь в следовых количествах. При поражении тех или иных тканей ферменты из клеток «вымываются» в кровь; их активность в сыворотке резко возрастает, являясь индикатором степени и глубины повреждения этих тканей.

Экскреторные ферменты синтезируются главным образом в печени (лейцинаминопептидаза, щелочная фосфатаза и др.). В физиологических условиях эти ферменты в основном выделяются с желчью. При многих патологических процессах выделение экскреторных ферментов с желчью нарушается, а активность в плазме крови повышается.

Особый интерес энзимодиагностики представляет исследование активности индикаторных ферментов в сыворотке крови, так как по появлению в плазме или сыворотке крови ряда тканевых ферментов в повышенных количествах можно судить о функциональном состоянии и поражении различных органов (например, печени, сердечной и скелетной мускулатуры). При остром инфаркте миокарда особенно важно исследовать активность креатинкиназы, АсАТ, ЛДГ и оксипутират-дегидрогеназы.

При заболеваниях печени, в частности при вирусном гепатите в сыворотке крови значительно увеличивается активность АлАТ и АсАТ, глутаматдегидрогеназы и некоторых других ферментов. Большинство ферментов, содержащихся в печени, присутствуют и в других органах. Органоспецифическими ферментами для печени считаются также гистадаза, сорбитолдегидрогеназа, аргиназа и орнитинкарбамоилтрансфераза. Изменение активности этих ферментов в сыворотке крови свидетельствует о поражении печеночной ткани.

В настоящее время особо важным лабораторным тестом стало исследование активности изоферментов в сыворотке крови, в частности изоферментов ЛДГ. Известно, что в сердечной мышце наибольшей активностью обладают изоферменты ЛДГ₁ и ЛДГ₂, а в ткани печени – ЛДГ₄ и ЛДГ₅. Установлено, что у больных с острым инфарктом миокарда в сыворотке крови резко повышается активность изоферментов ЛДГ₁ и отчасти ЛДГ₂. Изоферментный спектр ЛДГ в сыворотке крови при инфаркте миокарда напоминает изоферментный спектр

сердечной мышцы. Напротив, при паренхиматозном гепатите в сыворотке крови значительно возрастает активность изоферментов ЛДГ₄ и ЛДГ₅ и уменьшается активность ЛДГ₁ и ЛДГ₂.

Диагностическое значение имеет также исследование активности изоферментов креатинкиназы в сыворотке крови. Существуют по крайней мере 3 изофермента креатинкиназы: ВВ, ММ и МВ. В мозговой ткани в основном присутствует изофермент ВВ (от англ. brain – мозг), в скелетной мускулатуре – ММ-форма (от англ. muscle – мышца). Сердце содержит гибридную МВ-форму, а также ММ-форму. Изоферменты креатинкиназы особенно важно исследовать при остром инфаркте миокарда, так как МВ-форма в значительном количестве содержится практически только в сердечной мышце. Повышение активности МВ-формы в сыворотке крови свидетельствует о поражении именно сердечной мышцы.

Уровень липазы, амилазы, трипсина и химотрипсина в крови резко увеличен при сахарном диабете, злокачественных поражениях поджелудочной железы, болезнях печени и др. Активность кислой фосфатазы (уровень повышен при карциноме предстательной железы), щелочной фосфатазы, холинэстеразы и некоторых других органоспецифических ферментов (например, гистидазы, уруканиназы, глицинамидинотрансферазы) в сыворотке крови при патологии костной ткани, печени, метастатических карциномах

Возрастание активности ферментов сыворотки крови при многих патологических процессах объясняется: выходом в кровяное русло ферментов из поврежденных участков органов или тканей на фоне продолжающегося их биосинтеза в поврежденных тканях; одновременным повышением каталитической активности некоторых ферментов, переходящих в кровь. Возможно, что повышение активности ферментов при «поломке» механизмов внутриклеточной регуляции обмена веществ связано с прекращением действия соответствующих регуляторов и ингибиторов ферментов, изменением под влиянием различных факторов строения и структуры макромолекул ферментов.

Повышение уровня внутриклеточных ферментов в плазме крови прямо зависит от природы повреждающего воздействия, времени действия и степени повреждения биомембран клеток и субклеточных структур органов. В оценке ферментных тестов для диагностических целей особое значение имеет знание периода полужизни (полураспада) в плазме крови каждого из диагностических ферментов, что делает важным выбор точного времени для ферментного анализа крови. Весьма существенным является также знание особенностей распределения ферментов в индивидуальных органах и тканях, а также их внутриклеточной локализации.

Многие факторы, приводящие к развитию воспалительного процесса, способны повышать проницаемость мембран для белков и таким образом вызывать утечку внутриклеточных ферментов. Скорость выхода различных ферментов из поврежденных тканей неодинакова. На этот процесс воздействуют следующие факторы: концентрационный градиент, он неодинаков для различных типов клеток. Так в клетках печени содержание ЛДГ выше в 3 тысячи раз, чем вне клеток: 3000:1, а в эритроцитах этот перепад только в 200 раз внутри

выше, чем в сыворотке крови. Установлено, что ферменты с высоким концентрационным градиентом быстрее уходят из клетки, чем ферменты с меньшим градиентом.

Вторым фактором, влияющим на скорость выхода ферментов из клетки, является размер форменных молекул. Более мелкие диффундируют с большей скоростью, чем крупные. И мелкие высвобождаются на ранней стадии повреждения.

Третий фактор – это внутриклеточная локализация ферментов. Легко из тканей высвобождаются ферменты цитоплазмы клетки. Выход митохондриальных ферментов возможен при распаде органелл.

На характер выхода ферментов из поврежденного органа влияет масса пораженного органа. Например, поражение печени обычно приводит к увеличению уровня ферментов в сыворотке крови, тогда как при заболеваниях легких они не обнаруживаются, так как масса их несколько граммов

Природа повреждения – инфекционная, химическая, механическая и другие тоже влияет на характер выхода ферментов. При обратимых воспалительных процессах, при которых происходит увеличение проницаемости мембран, высвобождаются ферменты цитоплазмы и не освобождаются митохондриальные ферменты, а при некротических состояниях разрушение клетки приводит к появлению в сыворотке крови митохондриальных ферментов (глутаматдегидрогеназы, аспарататрансамилазы и других).

Методы количественной оценки ферментативных реакций сводятся к созданию оптимальных условий для проведения реакции и регистрации изменения концентрации субстрата, продукта или кофермента в реакционной среде. Широко применяются спектрофотометрические, флюориметрические, манометрические, поляриметрические, электродные, цито- и гистохимические методы исследования.

2.1. Методы определения активности ферментов

Из-за низкой активности ферментов в биологических жидкостях, а также из-за трудности дифференциации различных ферментов химическим способом на практике не применяется химическое определение активности ферментов, а измеряется каталитический эффект ферментов путем измерения скорости реакции, при которой субстрат под действием фермента превращается в продукт реакции. Эта величина известна как «скорость реакции» и при определенных условиях прямо пропорциональна количеству присутствующего фермента.

По способу измерения различают: кинетическое измерение, двухточечное измерение, измерение по конечной точке. Преимущество кинетического измерения состоит в возможности прямого непрерывного измерения скорости ферментативной реакции в начальной линейной части кривой при оптимизированной концентрации реактивов. С этой точки зрения наиболее точными являются методы, основанные на оптическом тесте Варбурга. Принцип Варбурга основан на разнице спектрофотометрического поглощения при определенной длине

волны (340 нм) восстановленной (NaDH) и окисленной (NaD) форм никотинамидеиннуклеотида. При длине волны 340 нм NaDH имеет максимальную абсорбцию, тогда как NaD не имеет поглощения при данной длине волны. Прямой оптический тест применяется для определения активности дегидрогеназ.

Фотометрические методы основаны на образовании окрашенных соединений с продуктами ферментативной реакции. Измерение проводят по конечной точке, что является недостатком методов этой группы, и точность их ниже, чем методов, основанных на оптическом тесте Варбурга. Исключение составляют методы, в которых в ходе реакции непосредственно из субстрата образуется окрашенное соединение.

Основным принципом ферментной диагностики является выбор оптимального спектра ферментов, изменение активности которых характерно для патологии определенных органов и тканей. Спектр ферментов для диагностики заболеваний некоторых органов:

- сердце – КК, ЛДГ, АСТ;
- скелетные мышцы – КК, АЛД;
- кости – ЩФ;
- кровь – ЛДГ 2, ЛДГ 3;
- поджелудочная железа – α -амилаза, липаза;
- предстательная железа – КФ;
- печень, желчные пути – АЛТ, ХЭ, ЩФ.

2.1.1. Метод определения аспаратаминотрансферазы (АСТ) с динитрофенилгидразином

В основе определения активности АСТ с динитрофенилгидразином лежит метод Райтмана-Френкеля. АСТ в присутствии α -кетоглутарата катализирует реакцию переаминирования L-аспартата с образованием оксалоацетата, который декарбоксилируется до пирувата.

Принцип метода: пируват с 2,4-динитрофенилгидразином в щелочной среде образует динитрофенилгидразон, интенсивность окраски которого прямо пропорциональна активности АСТ и измеряется фотометрически при длине волны 500-560 нм.

Реагенты:

1. Реагент 1: субстратно-буферный раствор, рН 7,4, содержащий калий фосфорнокислый однозамещенный, 100 ммоль/л; DL- аспартат 200 ммоль/л, α -кетоглутарат, 2 ммоль/л; динатриевую соль этилендиамина тетрауксусной кислоты (ЭДТА), 5 ммоль/л; азид натрия, 0,095 %.
2. Реагент 2: раствор, содержащий 2,4-динитрофенилгидразин, 1 ммоль/л; соляную кислоту, 1 моль/л.
3. Реагент 3: концентрированный раствор гидроокиси натрия, 4,0 моль/л
4. Реагент 4. калибровочный раствор пирувата натрия, 1 ммоль; азид натрия, 0,095%.

Ход определения: В мерную колбу на 1000 мл внести 100 мл реагента 3, довести объем до метки дистиллированной водой и перемешать.

В опытную, холостую и контрольную пробу на сыворотку добавить по 0,25 мл реагента 1. Инкубировать при температуре 37°C 5 минут, добавить в опытную 0,05 мл сыворотки крови, а в холостую 0,05 мл дистиллированной воды. Все перемешать и инкубировать при температуре 37°C точно 30 минут. Добавить реагент 2 в опытную, холостую и контрольную пробы по 0,25 мл, и в контрольную добавить сыворотку крови 0,05 мл. Перемешать и выдержать при комнатной температуре (20-25°C) в течение 20 минут, добавить во все пробирки по 2,5 мл щелочного раствора. Пробы перемешать и выдержать при комнатной температуре в течение 5 минут. Измерить оптические плотности опытной пробы (E 1) и контрольной пробы на сыворотку (E 2) против холостой пробы в кювете с длиной оптического пути 10 мм при длине волны 500-560 нм.

Для определения активности АСТ использовать разность оптических плотностей (E) опытной пробы и контрольной пробы на сыворотку: $E = E_1 - E_2$.

Расчет активности АСТ в сыворотке крови проводят по калибровочному графику. Для его выполнения берут 5 пробирок, в которые добавляют калибратор: 0,05 мл; 0,10 мл; 0,15 мл; 0,20 мл; 0,25 мл, дистиллированной воды во все по 0,1 мл, реагента 1 по 0,5 мл; 0,45 мл; 0,40 мл; 0,35 мл; 0,30 мл; 0,25 мл соответственно и реагента 2 по 0,5 мл во все пробирки.

После добавления реагента 2 пробы тщательно перемешать, выдержать при комнатной температуре в течение 20 минут, затем во все пробирки добавить по 5 мл щелочного раствора, тщательно перемешать. Выдержать при комнатной температуре в течение 5 минут. Измерить оптическую плотность раствора в пробирках против раствора дистиллированной воды - 0,1 мл, в которую добавлены реагенты 1 и 2 по 0,5 мл. Кювета на 10 мм оптического пути, длина волны 500-560 нм.

Построение калибровочного графика: на оси ординат откладывают оптическую плотность для каждой пробы, а на оси абсцисс – соответствующие им значения активности АСТ.

2.1.2. Метод определения аланинаминотрансферразы (АЛТ) в сыворотке и плазме крови с динитрофенилгидразином

Принцип метода: в основе метода лежит метод Райтмана-Френкеля. В результате реакции переаминирования под действием АЛТ образуется пируват, который в щелочной среде образует с 2,4-динитрофенилгидразином окрашенный гидразон, поглощающий в области 500-560 нм (зеленый светофильтр). Концентрация образовавшегося гидразона пропорциональна активности АЛТ.

Реактивы:

1. Реагент 1: субстратно-буферная смесь, содержащая трис-буфер 50 ммоль/л, ЭДТА 5 ммоль/л; Д, L- аланин 200 ммоль/л, α -кетоглутарат 2 ммоль/л. Перенести в мерную колбу на 50 мл и довести дистиллированной водой до метки.
2. Реагент 2: раствор 2,4-динитрофенилгидразона 1 ммоль/л.

3. Реагент 3: концентрат щелочного раствора.
4. Калибратор. Раствор пирувата натрия 1 ммоль/л.

Ход определения: В опытную и холостую пробы внести по 0,25 мл реагента 1, выдержать при 37°C в течение 5 минут. В опытную пробирку внести 0,05 мл сыворотки, тщательно перемешать и инкубировать в течение 30 минут при 37°C. Затем внести в обе пробирки по 0,25 мл реагента 2 и в холостую пробу 0,05 мл сыворотки. Тщательно перемешать и выдержать в течение 20 минут при комнатной температуре. Затем внести по 2,5 мл в каждую пробирку реагента 3. Тщательно перемешать, выдержать в течение 5 минут при комнатной температуре и измерить при длине волны 500-560 нм (зеленый светофильтр) в кювете на 1 см против холостой пробы. Расчет активности фермента в сыворотке крови произвести по калибровочному графику.

Построение графика: из калибратора приготовить ряд разведений: в первую пробирку прилить 0,025 мл в следующие соответственно по 0,05 мл; 0,10 мл; 0,15 мл; 0,20 мл; 0,25 мл. Добавить воды с первой по пятую соответственно по: 0,325 мл; 0,3 мл; 0,25 мл; 0,2 мл; 0,15 мл; 0,1 мл. Добавить во все пробирки по 0,25 мл реагента 1. Тщательно перемешать и добавить 0,5 мл реагента 2, тщательно перемешать и выдержать при комнатной температуре в течение 20 минут. Затем добавить 5 мл реагента 3 и оставить для развития окраски.

Активность АЛТ в первой пробирке составляет : 9 Е/Л или 150 нмоль/л и в следующих соответственно: 18 Е/л, 37 Е/л, 56 Е/л, 77 Е/л, 92 Е/л или 300 нмоль/л, 617 нмоль/л, 934 нмоль/л, 1284 нмоль/л, 1534 нмоль/л.

Нормальные значения АЛТ в сыворотке крови человека не более 12 Е/л или 200 нмоль/л.

2.1.3. Метод определения лактатдегидрогеназы (ЛДГ)

ЛДГ – гликолитический фермент, катализирует обратимую реакцию восстановления пировиноградной кислоты в молочную. Скорость окисления NADH в NAD пропорциональна активности ЛДГ.

ЛДГ состоит из 5 изоферментов, представляющих собой различные комбинации двух типов (Н и М) полипептидных цепей. ЛДГ₁ представляет собой идентичные Н цепи (ЛДГ₁), преобладает в ткани сердца.

ЛДГ₅ состоит из 4 полипептидных цепей М – преобладает в мышечной ткани, остальные три фермента представляют собой различные сочетания М и Н-цепей. Для определения изоферментов наиболее распространенными являются электрофоретические методы.

Имеются методы, основанные на различном отношении ЛДГ₁ и ЛДГ₅ к температуре и действию мочевины. Мочевина действует как ингибитор и тормозит ЛДГ₅ почти на 100%. Унифицированным методом является колориметрический динитрофенилгидразиновый метод.

Принцип метода: различие спектров поглощения окисленной и восстановленной форм NAD при 340 нм.

Реактивы:

1. Фосфат калия однозамещенный (KH₂PO₄);

2. Калий фосфат двузамещенный 3-водный ($\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$);
3. Натрия пируват.
4. Никотинамиддениндинуклеотид восстановленный, динатриевая соль;
5. Фосфатный буфер 0,1 моль/л, рН 7,4 с раствором NADH 0,165 ммоль/л и раствором пирувата натрия 0,00103 моль/л : 0,16 г однозамещенного фосфата калия, 2,07 г двузамещенного фосфата калия, 0,0117 г NADH и 0,0114 г пирувата натрия растворяют в 40- 60 мл 0,1 моль/л фосфатном буфере, доводят рН и доливают водой в мерной колбе до 100 мл.
6. Натрия хлорид, 154 ммоль/ л.

Ход определения: в рабочий реагент (буфер с NADH и пируватом) добавить сыворотку крови в соотношении 50: 1 (например, 1,0 мл рабочего реагента + 0,02 мл сыворотки), перемешать и через 1 мин. Начинать считывать изменение экстинкции за 1 минуту:

Расчет: при 25°C.

U/л 15000. E 365/мин

U/л 8095. E 340/мин

U/л 8250. E 334/мин

1 U/л = 16,67 нмоль/с.л.

Нормальные величины в сыворотке крови при 25 °C 120-240 U/л.

2.1.4. Метод определения щелочной фосфатазы (ЩФ)

Фосфатазы – ферменты, гидролизующие эфиры фосфорной кислоты. В зависимости от значения рН, при котором действует фермент, различают щелочную и кислую фосфатазу. Щелочная фосфатаза (ЩФ) содержится практически во всех животных тканях, но наиболее богаты ферментом печень, костная ткань, кишечник, плацента. ЩФ - негомогенный фермент: различают 5 тканеспецифических изоферментов ЩФ: плацентарный, костный, печеночный, кишечный, почечный. Множественные формы ЩФ обусловлены как генетическими факторами, так и посттрансляционной модификацией. Для плацентарной формы существует отдельный генетический локус и аллельные варианты, которые не обнаруживаются для других изоформ. Фракции ЩФ различаются по своим каталитическим свойствам, электрофоретической подвижности, устойчивости к тепловой инактивации.

В норме при электрофорезе выявляется 1-2 фракции ЩФ в зоне α_2 -глобулинов. При патологии количество изоферментов и их расположение при электрофорезе могут меняться. ЩФ образует комплексы с белками и липидами.

Методы определения фосфатаз различаются по используемому субстрату: В- глицерофосфат, фенилфосфат натрия, п-нитрофенилфосфат натрия. Однако наибольшие преимущества имеет использование п-нитрофенилфосфата, который легко гидролизуется и дает минимальные различия для изоферментов ЩФ.

Принцип метода: субстрат п-нитрофенилфосфата натрия гидролизуется с образованием п-нитрофенола, дающего в щелочной среде желтое окрашивание.

Реактивы:

1. п-нитрофениловый эфир фосфорной кислоты динатриевая соль.
2. HCl, 0,001 моль/л.
3. п-нитрофенилфосфат натрия, 4 г помещают в колбу на 100 мл и доливают до метки 0,001 моль/л раствором HCl.
4. Аминоуксусная кислота.
5. Магния хлорид 6-водный.
6. Натр едкий
7. Буферный раствор – 0,05 моль/л глициновый буфер с добавлением катализатора хлорида магния – 95 мг/л; 375 мг глицина и 10 мг $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ растворяют в 42 мл 0,1 моль/л раствора едкого натра и доводят объем водой до 100 мл.
8. Субстратно-буферный раствор готовят смешиванием равных частей растворов 3 и 7, pH раствора 10,5.
9. п-нитрофенол – калибровочный раствор: 696 мг п-нитрофенола растворяют в 0,02 моль/л растворе едкого натра и доводят этим же раствором объем до 1 л; 1 мл раствора содержит 5 мкмоль п-нитрофенола.

Ход определения: Опытная проба: в пробирки вносят по 1 мл субстратно-буферного раствора, прогревают при 37 °С в течение 5 мин, затем добавляют по 0,1 мл сыворотки. Содержимое пробирок перемешивают и инкубируют в течение 30 мин при 37 °С. После инкубации пробирки переносят в водяную баню со льдом, а затем добавляют по 10 мл 0,02 моль/л раствора едкого натра и тщательно перемешивают. Через 5 мин пробы измеряют на ФЭК при длине волны 400- 420 нм (фиолетовый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 1 см против холостой пробы. Холостую пробу ставят так же, как опытную, но сыворотку добавляют после инкубации.

Расчет производят по калибровочному графику.

Для его построения готовят ряд разведений и измеряют оптическую плотность при условиях, аналогичных опытному, против 0,02 моль/л раствора едкого натра.

В 5 пробирок соответственно добавляют по 1 мл, 2 мл, 3 мл, 5 мл, 7 мл калибровочного раствора. Содержание п-нитрофенола в них соответствует: 0,05 мкмоль; 0,1 мкмоль; 0,15 мкмоль; 0,25 мкмоль; 0,35 мкмоль. В пробирки добавляют с первой по пятую: 10,1 мл; 9,1 мл; 8,1 мл; 6,1 мл; 4,1 мл раствора 0,02 моль/л NaOH. Активность ЩФ в пробирках с первой по пятую составляет: 278 нмоль/л; 556 нмоль/л; 834 нмоль/л; 1390 нмоль/л; 1946 нмоль/л.

Нормальные величины: 278-830 нмоль /с.л.

2.1.5. Определение активности амилазы

Амилаза катализирует 1,4- гликозидные связи крахмала, гликогена и родственных им полисахаридов до мальтозы, декстринов и других полимеров. У человека амилаза секретируется поджелудочной и слюнными железами, небольшая ее активность обнаруживается в тканях печени и скелетной мускулатуры. Молекулярная масса ее низкая, равна 48 000 Да, в отличие от большинства ферментов она фильтруется в клубочках почек и содержится в моче. Амила-

за состоит из двух изоферментов: панкреатического и слюнного. У здоровых людей в сыворотке крови около 70% амилалитической активности приходится на слюнный изофермент, в моче приблизительно такой же процент приходится на панкреатическую изоамилазу.

Гиперамилаземия наблюдается при многих заболеваниях, но наиболее выражена при остром панкреатите, при котором активность увеличивается за счет панкреатического изофермента. При данном заболевании наибольший подъем содержания амилазы в крови отмечается в первые сутки.

В качестве субстрата в методах определения амилазы чаще применяют крахмал. Крахмал - полисахарид, состоящий из 10-20% из амилозы и амилопектина, нерастворимого в воде. Активность фермента возрастает в присутствии ионов хлора. в молекулу амилазы входит атом кальция. Ионы кальция не только активируют амилазу, но и предохраняют ее от потери активности и распада под влиянием протеолитических ферментов.

Ингибирование активности амилазы фторидами, цитратом, оксалатом и ЭДТА объясняется связыванием ионов кальция. Унифицированным методом является метод Смита-Роя и Каравея.

Принцип метода: амилаза гидролизует расщепление крахмала с образованием конечных продуктов, не дающих цветной реакции с йодом. Об активности амилазы судят по уменьшению интенсивности окраски.

Реактивы:

1. Бензойная кислота.
2. Натрия фосфат двузамещенный безводный (Na_2HPO_4).
3. Крахмал растворимый.
4. Натрия хлорид, 0,154 моль/л.
5. Субстратно-буферный раствор рН 7,0: 13,3 г Na_2HPO_4 и 2 г бензойной кислоты растворяют в 250 мл 0,154 моль/л хлорида натрия и доводят до кипения. Суспендируют 0,2 г растворимого крахмала в небольшом количестве холодной воды и вводят в кипящий буферный раствор. Кипятят 1 мин. Охлаждают и доводят водой до 500 мл.
6. Калия йодит.
7. Калий йодноватокислый.
8. Калия фторид.
9. HCl концентрированная.
10. 0,01 Н раствор йода: 0,036 г йодноватокислого калия и 0,45 г йодида калия растворяют в 40 мл воды и медленно при помешивании добавляют 0,09 мл концентрированной HCl . 5 г фторида калия растворяют в 50 мл воды, фильтруют в мерную колбу, приливают 40 мл раствора йода и доливают водой до 100 мл.

Ход определения: Опытная проба: 0,5 мл субстратно-буферного раствора помещают в пробирку, нагревают 5 минут при 37 °С, добавляют 0,01 мл сыворотки. Инкубируют 7,5 мин при 37 °С. После инкубации добавляют 0,5 мл 0,1 н раствора йода и доводят объем водой до 5 мл. Измеряют на ФЭК в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 630-690 нм (красный светофильтр) против воды.

Холодную пробу ставят так же, как опытную, сыворотку добавляют после инкубации вместе с 0,1 н раствором йода. Измеряют при тех же условиях, что и опытную пробу, против воды.

Активность амилазы выражают в миллиграммах или граммах крахмала, гидролизованного 1 л биологической жидкости за 1 с инкубации при 37 °С. Расчет производят по формуле:

$$\text{Активность амилазы, мг/с.л.} = (E1 - E2) \cdot C \cdot t \cdot K / E1,$$

где E1 – экстинкция холостой пробы,

E2 - экстинкция опытной пробы,

C- количество крахмала, введенного в опытную и холостую пробы,

t – коэффициент пересчета на 1 с инкубации,

K – коэффициент пересчета на 1 л биологической жидкости с учетом разведения.

Нормальные величины. Сыворотка крови: 3,3-8,9 мг/с.л или 120 мг/ч.мл.

2.1.6. Определение активности липазы

Панкреатическая липаза относится к группе эстераз, гидролизует в эфирные связи с освобождением жирных кислот.

Фермент секретируется поджелудочной железой. В сыворотке крови активность низкая. Липаза может существовать в двух изоформах. Кроме панкреатической липазы в сыворотке крови содержится липопротеиновая липаза. Липаза является термолабильным ферментом и при 37 °С частично инактивируется.

В сыворотке здоровых людей активность липазы низкая, при остром панкреатите активность может увеличиться до 200 раз по сравнению с нормой.

Методы определения активности липазы отличаются по используемому субстрату и основаны на определении количества освобожденных под действием фермента жирных кислот. В качестве субстратов часто применяют: оливковое масло, трибутирин, 2-нафтилмеристат, твин-80, триолеин и др.

Оптимум pH для липазы 8,8-9,0. Липаза поджелудочной железы водорастворима, ее липолитическое действие проявляется на поверхности жировых гранул. Липазу активируют желчные кислоты, ионы кальция. Желчные кислоты приводят к уменьшению поверхностного натяжения, это ведет к образованию эмульсий и увеличению контакта между жирами и липазой.

Свободные жирные кислоты, образовавшиеся в результате ферментативной реакции, ингибируют липазу. Связывание жирных кислот ионами кальция с образованием нерастворимых соединений является причиной активации липазы в присутствии ионов кальция.

Принцип метода: При определении липазы с использованием оливкового масла в качестве субстрата, активность фермента пропорциональна количеству гидролизованного оливкового масла или количеству жирных кислот, образующихся при гидролизе.

Реактивы:

1. Оливковое масло.

2. Окись алюминия.
3. Меди сульфат 5-водный (CuSO₄) для получения абсолютного спирта.
4. Этиловый спирт.
5. Основной раствор оливкового масла. В колбу наливают 100 мл абсолютного спирта, добавляют 1,1 мл масла и встряхивают долго (1 час) для приготовления эмульсии.
6. Рабочая эмульсия оливкового масла : 1,5 мл основного раствора оливкового масла медленно добавляют к 100 мл буфера рН 8,8.
7. Трис (оксиметил)аминометан.
8. Дезоксихолевой кислоты натриевая соль.
9. HCl концентрированная.
10. Буфер, содержащий трис 0,025 моль/л и натриевую соль дезоксихолевой кислоты, 0,014 моль/л, рН 8,8: 0,3 г триса и 0,6 г дезоксихолата натрия растворяют в 40 –60 мл воды, доводят рН до 8,8 концентрированной HCl (3-8 капель) и доливают водой в мерной колбе до 100 мл.

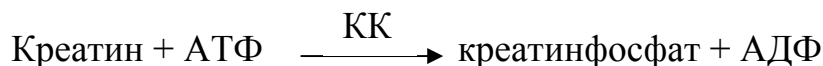
Ход определения: В кювету приливают 3 мл рабочей эмульсии оливкового масла, добавляют 0,1 мл сыворотки, смешивают и ставят в термостат при 30 или 37 °С. Через 2 мин измеряют экстинкцию (E1) против воды или воздуха при длине волны 340 нм в кювете с толщиной слоя 1 см, затем кювету снова помещают в термостат при той же температуре и через 5 мин измеряют экстинкцию (E2), рассчитывают разницу за одну минуту (E).

Для расчета активности липазы можно использовать контрольную сыворотку с известной активностью липазы. Активность липазы в контрольной сыворотке определяют так же, как в исследуемой.

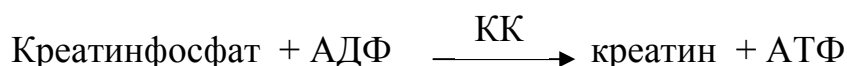
Нормальные величины 0-470 нмоль /с.л или 0-28 мкмоль/мин.л.

2.1.7. Определения креатинкиназы (КК)

Креатинкиназа катализирует обратимую реакцию фосфорилирования креатинина. Креатинкиназа человека состоит из двух субъединиц – М и В, которые образуют три формы изоферментов. ММ-фракция - мышечный тип; МВ-фракция - сердечный тип, ВВ-фракция - мозговой тип.



В обратной реакции с использованием креатинфосфата в качестве субстрата реакция протекает:



Образующийся в данной реакции креатин может быть определен фотометрически по реакции с а-нафтолом.

Реакция с субстратом креатинфосфатом более чувствительна, чем с креатином, ее используют чаще для определения активности КК. Более простыми

являются фотометрические методы, основанные на определении неорганического фосфора, освобожденного в результате гидролиза креатинфосфата.

Принцип метода: Активность фермента пропорциональна количеству неорганического фосфора, образующегося в результате кислотного гидролиза синтезированного ферментом креатинфосфата. Неорганический фосфор определяется по цветной реакции с молибдатом аммония.

Реактивы:

1. Аденозин 5- трифосфорной кислоты динатриевая соль.
2. Цистеин 0,024 моль/л: 2, 9 мг растворяют в 1 мл воды. Готовят раствор перед употреблением.
3. Креатин.
4. Магния сульфат 7-водный.
5. Аммоний молибденовокислый 4-водный 0,02 моль/л: 2,5 г молибденово-кислого аммония растворяют в мерной колбе до 100 мл водой.
6. Натрия сульфат.
7. Натрий сернистоокислый пиро(метабисульфит натрия).
8. Амино 2-нафтол-4-сульфо кислота (эйконоген).
9. Серная кислота, 2,5 моль/л.
10. HCl, 0,1 моль/л.
11. Трис-(оксиметиламинометан).
12. Трис-буфер, 0,133 моль/л, рН 9,0: 1,61 г трис растворяют в мерной колбе вместимостью 100 мл в 50-60 мл воды, устанавливают рН буфера 0,1 моль/л раствором HCl и доводят до метки водой.
13. Раствор эйконогена растворяют в 70-80 мл воды, взбалтывают, доводят объем водой в мерной колбе до 100 мл и дважды фильтруют.
14. Основная смесь реактивов, содержащая 0,02 моль/л сульфата магния, 0,033 моль/л креатина и 0,0067 моль/л АТФ растворяют в 70-80 мл трис буфера (можно подогреть). Затем объем основной смеси реактивов доводят трис-буфером в мерной колбе до 100 мл.
15. Трихлоруксусная кислота 4,9 моль/л: 80 г ТХУ растворяют в 50-60 мл воды и объем раствора доводят в мерной колбе до 100 мл.
16. Смесь растворов для проведения кислотного гидролиза креатинфосфата. Смесь готовят перед употреблением. Она состоит из 0,25 мл раствора молибденовокислого аммония, 0,25 мл раствора серной кислоты и 1,5 мл воды (соотношение 1:1:6).
17. Калия фосфат однозамещенный безводный для приготовления калибровочного раствора 0,0169 г $\text{KН}_2\text{PО}_4$ растворяют в мерной колбе в воде и объем доводят до 100 мл.

Ход определения: Опытная проба: в пробирку вносят 1,5 мл основной смеси реактивов, 0,1 мл раствора цистеина и 0,4 мл сыворотки крови. Содержимое пробирки осторожно перемешивают и ставят в термостат при 37°C на 30 мин. Затем прибавляют 0,2 мл раствора ТХУ, перемешивают стеклянной палочкой и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 минут. Холостую пробу ставят так же, как опытную, но сыворотку добавляют после прибавления раствора ТХУ.

Из опытной и холостой проб забирают по 1 мл надосадочной жидкости и переносят в пробирки в которых содержится по 2 мл смеси растворов для проведения специфического гидролиза креатинфосфата. Полученную смесь растворов перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 30 минут (время гидролиза креатинфосфата). После этого в пробы добавляют с интервалом 1 мин по 0,25 мл раствора эйконогена и точно через 15 мин опытную пробу измеряют против холостой пробы при длине волны 600-700 нм (красный светофильтр) в кювете с толщиной слоя 0,5 см.

Расчет производят по калибровочному графику. Для построения которого берут 5 пробирок, в каждую прибавляют по 1,0 мл калибровочного раствора, затем приливают дистиллированную воду с первой по пятую в количестве: 14,4 мл; 7,7 мл; 5,13 мл; 2,85 мл; 2,08 мл. Из каждого раствора берут по 0,4 мл и обрабатывают, как опытные пробы. В холостую пробу вместо калибровочных растворов берут по 0,4 мл воды.

Количество фосфора в калибровочных пробах соответствует с первой по пятую соответственно: 1 мкг; 2 мкг; 3 мкг; 4 мкг; 5 мкг. А активность креатинкиназы (КК) соответствует: 45 нмоль /с.л; 90 нмоль /с.л; 135 нмоль /с.л; 180 нмоль /с.л; 225 нмоль /с.л.

Активность изоферментов КК в сыворотке крови у здоровых людей колеблется в значительных пределах. Активность ММ-фракции составляет более 90 %, а КК МВ менее 2% от общей активности.

3. ОНКОМАРКЁРЫ

Опухолевые маркеры это молекулы с разными характеристиками. Они могут быть полезными в дифференциальной диагностике, например, при новообразованиях, которые могут быть вызваны клетками разного гистогенеза и особенно, когда определяется метастатическое поражение без выявленного первичного очага, например, NSE при раке легкого, СА 15.3 – при раке молочной железы.

Главная цель диагностических методов в онкологии – более раннее выявление опухоли, до клинических проявлений. Опухоль – это не изолированный узелок, а вершина айсберга, который зреет в организме десятилетиями и состоит из множества дефектных клеток на разных стадиях трансформации. По мере старения организма, увеличения мутагенной нагрузки и ослабления механизмов репарации растет число дефектных клеток.

Трансформированная опухолевая клетка обладает набором из нескольких фенотипических признаков: самообеспечение митогенными стимулами, способна избегать апоптоза, способность к индукции ангиогенеза, неограниченная репликация, способность к инвазии и метастазированию. Генетические дефекты могут быть разными, и конкретные сочетания дают молекулярный профиль.

Опухоль является источником множества веществ, которые не являются строительным материалом человека, или веществами, обнаруживаемых в количествах нехарактерных для нормы. Открыто много разнообразных антигенов, ассоциированных с ростом и развитием опухоли. Это антигены – компоненты опухолевых клеток измененные по структуре или экспрессии относительно нормальных клеток организма. Некоторые антигены имеют несколько названий. Их определение дает дополнительную информацию о наличии, отсутствии опухолевого процесса, помогает оценить эффективность терапии, помогает контролировать заболевание.

В настоящее время выделяют 5 групп антигенов, связанных с опухолями:

Дифференцировочные тканеспецифические антигены – это наиболее распространенная группа антигенов, которые имеются в нормальных тканях и гиперсекретированы на опухолевых клетках. Это меланомные антигены MART-1 / Melan-A, gp75, тирозиназа и белки, вовлеченные в синтез меланина.

Мутированные антигены (опухольспецифические) экспрессируются только на опухолевых клетках. Это мутантные антигены, экспрессируемые клетками с повреждениями ДНК. Например, антигены связанные с перестройкой генов иммуноглобулинов при В-клеточных лимфомах, В- катенин, СДК4, р53 и другие.

Немутированные эмбриональные белки, присутствуют на ранних стадиях развития эмбриона и отсутствующие у взрослой особи, они вновь могут появиться при некоторых опухолях. Это онкофетальные антигены, им принадлежит важная роль в опухолевом росте. В фетальных тканях эти антигены присутствуют в виде полипептидов, затем их гены утрачивают свою активность и их синтез прекращается, а в опухолевых клетках повторно активизируются гены. Однако, в отличие от фетальных тканей, онкофетальные антигены являются

гликопротеинами. Это происходит в результате посттрансляционного гликозилирования фетальных белков. Они обеспечивают опухолевым клеткам повышенный метаболизм. Например, РЭА, который обнаруживается в пищеварительном тракте, поджелудочной железе и печени на 2-6 неделе гистогенеза и присутствует при раке толстой кишки, легких, молочной железы.

Антигены вирусного происхождения – этот тип антигенов характерен для вирусиндуцированных опухолей. Например, антигены E, G, E7 папилломавирусов, ассоциированных с раком шейки матки.

Раково-тестикулярные антигены (неоантигены), которые в норме проявляются в эмбриогенезе, а затем исчезают. Большинство в норме экспрессируются в сперматогониях, в плаценте. Белки этой группы характерны для большинства типов опухолей различного гистогенеза. К ним относят представителей нескольких десятков семейств белков, являющихся чаще всего транскрипционными факторами: MAGE, RAGE, GAGE, SSX, LAGE/NY-ESO-1 и другие. В опухолевых клетках раково-тестикулярные гены экспрессируются гетерогенно. Функция белковых продуктов известна лишь для некоторых из них. Так, показано участие членов семейства MAGE-A в предотвращении клеточной дифференцировки, а также участие продукта гена GAGE-7 в предотвращении Fas-опосредованного пути апоптоза. Наличие в опухолевых клетках мРНК раково-тестикулярных антигенов ассоциирована с прогрессированием опухоли и высоким метастатическим потенциалом. Экспрессия раково-тестикулярных генов часто кластеризована, гены экспрессируются опухолевыми клетками в разных сочетаниях и с разной частотой.

Гены, кодирующие раково-тестикулярные антигены, существуют в виде мультигенных семейств в X-хромосоме и в соматических клетках, они не экспрессируют из-за метилирования нуклеотидных оснований, а повторное появление их может быть из-за гипометилирования генома.

ДНК-маркеры. Некоторое количество ДНК-маркеров попадает в кровь, мочу, в сок поджелудочной железы, в слюну, в мокроту при раке легких. Несмотря на малое количество опухолевой ДНК современные высокочувствительные методы способны ее обнаруживать.

Опухолевые маркеры должны отвечать в практической онкологии нескольким требованиям:

- быть селективно связанными с опухолевым ростом;
- их концентрация в сыворотке крови должна коррелировать с размером опухолей;
- должны обнаруживаться до клинического проявления рецидивов;
- к ним не должно быть рецепторов на клетках не опухолевых.

Однако до настоящего времени не существует маркеров, полностью отвечающих перечисленным требованиям. Диагностическая значимость известных маркеров различается, что связано с их различной специфичностью и чувствительностью. Несмотря на то, что известно несколько десятков молекул, претендующих на роль маркеров, только несколько из них имеют практический интерес. Основным применением опухолевых маркеров является мониторинг течения заболевания, а также эффективности хирургического лечения, радио-, хи-

мио-, или гормонотерапии. Основным интересом представляет динамика уровня маркера, а не единичное количественное определение маркера. Скорость возрастания позволяет делать заключение о прогрессировании заболевания, о метастазировании.

РЭА – гликопротеин 175-200 кДа, содержит до 60% углеводов, имеет 6 доменных детерминант. У эмбриона вырабатывается в тканях пищеварительного тракта и определяется в сыворотке крови плода. После рождения ребенка синтез РЭА подавляется, у взрослых обнаруживается в ничтожных количествах за счет небольшого его синтеза в кишечнике, печени, поджелудочной железе.

Пригоден для скрининга группы риска развития рака желудочно-кишечного тракта, аденокарцином. Содержание РЭА коррелирует со стадией опухолевого роста, послеоперационный уровень коррелирует с продолжительностью безрецидивного периода и степенью выживаемости. Падение уровня РЭА свидетельствует об уменьшении объема опухоли. Вторичный подъем уровня РЭА предполагает наличие рецидивов или метастазов.

АФР (альфа-фетопропротеин) - гликопротеин 70 кДа, 4% углеводов, сходен с альбумином, имеет 7 эпитопов, обладает способностью связывать эстрогены. При беременности вырабатывается клетками желточного мешка, затем печенью, органами желудочно-кишечного тракта плода. Обнаруживается в сыворотке плода с 4 недели беременности с максимальным уровнем между 12 и 16 неделями, затем уровень падает. В материнской сыворотке обнаруживается на 32 – 36 неделях. К году у ребенка уровень существенно падает.

Имеет несколько клинических применений: во-первых, мониторинг течения и эффективности терапии первичной гепатоцеллюлярной карциномы, во-вторых – выявление пороков плода с целью выявления дефектов нервной трубки и брюшной стенки, а также определения синдрома Дауна и мониторинга состояния плода в течение беременности.

СА 19-9 - сиалированный антиген, используют с целью диагностики карциномы поджелудочной железы. Гликопротеин около 1000 кДа. Обнаруживается в эпителии желудочно-кишечного тракта плода. Вырабатывается клетками карциномы поджелудочной железы, реже опухолей желудка. Повышается при карциноме поджелудочной железы, может быть повышен при раке желудка, воспалительных процессах желудочно-кишечного тракта и печени. Как онкомаркер не обладает высокой специфичностью, поэтому не пригоден для скринингового обследования.

СА 72-4 - гликопротеин 400 кДа, обнаруживается в эпителиальных клетках плода. Высокоспецифичный маркер для диагностики карциномы желудка. При дифференциации с доброкачественным заболеванием желудочно-кишечного тракта рекомендуется применение совместно с РЭА. При метастазировании чувствительность повышается.

СА 15-3 - относится к высокомолекулярным гликопротеинам муцинового типа с молекулярной массой 300 кДа. Этот антиген возникает из мембран клеток карциномы молочной железы. Он определяется на эпителии секретирующих клеток и в секретах. Увеличивается на поздних стадиях развития опухолей яичников, шейки матки. Динамика уровня маркера представляет боль-

ший интерес, чем единичное значение уровня маркера. При рецидивах или метастазах рост концентрации СА 15-3 может опережать появление клинических симптомов на 6-9 месяцев. Исследование важно в дифференциальной диагностике рака молочной железы и доброкачественной мастопатии.

SCC (антиген плоскоклеточной карциномы) применяют в качестве маркера первого порядка для мониторинга течения заболевания и эффективности терапии при плоскоклеточной карциноме шейки матки, носоглотки, уха, пищевода и лёгких.

СА 125 - маркер первого порядка для диагностики, мониторинга течения заболевания и эффективности терапии при серозных карциномах яичника. Высокомолекулярный гликопротеин 200-1000 кДа. СА 125 присутствует в нормальной ткани эндометрия и в серозной и муцинозной жидкости матки. Он не проникает в кровоток за исключением случаев разрушения природных барьеров. У больных с первой стадией рака яичников содержание маркера не отличается от контроля, но при последующих стадиях заболевания уровни СА 125 значительно повышаются.

Данный тест имеет невысокую специфичность, двукратное повышение уровня в крови СА 125 имеет достоверное указание на наличие рака яичников. Снижение уровня маркера говорит о благоприятном прогнозе и хорошей реакцией на лечение. СА 125 незначительно повышается при беременности, аутоиммунных заболеваниях, гепатите, циррозе печени.

PSA (простата-специфический антиген) имеет два основных применения в клинической практике: во-первых для мониторинга течения и эффективности терапии карциномы простаты; во-вторых, для мониторинга состояния пациентов с гипертрофией простаты в целях как можно более раннего обнаружения карциномы простаты. PSA – физиологический экскреторный продукт простаты, гликопротеин 34 кДа. По функции это протеаза, уменьшающая вязкость спермы. Содержится в цитоплазме эпителиальных клеток протоков простаты. Обнаруживается также в ткани нормальной простаты.

У здоровых мужчин в сыворотке в норме до 4 нг/мл. В сыворотке PSA содержится в 2-х формах: свободной и связанной с различными антипротеазами. Свободная форма составляет 10% от общего количества, 90% связана с альфа-1-антихимотрипсином и доступна для лабораторного определения. Небольшая часть связана с альфа-2-макроглобулином и недоступна для исследования, так как находится внутри комплекса. Свободная и связанная фракции составляют общий PSA. Рекомендован для скринингового обследования мужчин старше 50 лет, на ранней стадии может быть диагностирован рак.

Нейронспецифическая енолаза (НСЕ) используется для диагностики эффективности терапии мелкоклеточной карциномы легких. Фермент углеводного обмена. В норме обнаружен в нейронах, эритроцитах, тромбоцитах. Граница нормы не выше 12,5 нг/мл. Повышенный уровень обнаруживается у больных мелкоклеточной карциномой легких, нейроblastомах. Повышена концентрация может быть при доброкачественных заболеваниях легких.

Хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) определяют при ранней диагностике беременности, для мониторинга эффективности терапии и диагно-

стики рецидивов трофобластических опухолей карцином яичника или плаценты, хориоаденом. Чувствительность 100%. ХГЧ - гликопротеиновый гормон, димер, состоит из двух субъединиц α и β . α -субъединица идентична α -субъединице лютеинизирующего и фолликулостимулирующего гормонов, а также тиреотропина гипофиза. β -субъединица уникальна, поэтому для точной оценки уровня ХГЧ используют тесты на β -субъединицу гормона.

В первом триместре беременности ХГЧ обеспечивает синтез прогестерона и эстрогенов, необходимых для поддержания беременности, желтым телом яичника. ХГЧ действует на желтое тело подобно лютеинизирующему гормону, т.е. поддерживает его существование. Это происходит до тех пор, пока комплекс плод-плацента не приобретет способность самостоятельно формировать необходимый гормональный фон. Действуя на плаценту, ХГЧ стимулирует выработку эстриола и прогестерона. У плода мужского пола ХГЧ стимулирует клетки Лейдинга, синтезирующие тестостерон, необходимый для формирования половых органов по мужскому типу.

В сыворотке крови взрослых мужчин и небеременных женщин содержание ХГЧ составляет 5 мЕд/мл. Повышение его уровня является признаком наличия злокачественной опухоли.

Наибольшее количество ХГЧ вырабатывается при хорионэпителиоме - высокозлокачественная опухоль. Может быть повышено содержание у больных раком легкого, новообразованиях желудочно-кишечного тракта, раке органов мочеполовой системы, раке толстой и прямой кишки, матки, тератоме яичника.

4. ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОТДЕЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ УГЛЕВОДОВ И РОДСТВЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ

4.1. Определение концентрации глюкозы

Более 90% всех растворимых низкомолекулярных углеводов крови приходится на глюкозу, кроме того, в небольших количествах могут присутствовать фруктоза и пентозы, а при патологии и галактоза.

Глюкоза распределена почти равномерно между плазмой и эритроцитами, поэтому может определяться в цельной крови, плазме и сыворотке крови. Нормальное содержание в крови составляет 3,3-5,5 мМ/л. В физиологических условиях в крови может повышаться после обильной углеводной пищи, физиологических нагрузок, сильных эмоций.

Гипергликемия наблюдается при многих патологических состояниях: сахарном диабете, панкреатите, травмах и сотрясениях головного мозга, энцефалите, муковисцидозе, психическом возбуждении, отравлениях окисью углерода, ртутью. В зависимости от тяжести сахарного диабета уровень глюкозы натощак составляет : при легкой степени – 6,7-7,8 мМ/л.

Гипогликемия бывает при передозировке инсулина, заболеваниях поджелудочной железы, злокачественных заболеваниях, некоторых инфекционных и токсических поражениях печени, гипотиреозе, наследственных заболеваниях, связанных с дефицитом ферментов.

Глюкозурия отмечается при сахарном диабете, гиперплазии коры надпочечников, нарушениях функции почек, сепсисе, травмах и опухолях головного мозга, отравлениях морфином, панкреатите, синдроме Фанкони.

Однократная нагрузка глюкозой вызывает у больных сахарным диабетом медленное нарастание гликемической кривой, при этом гипогликемическая фаза обычно не выявляется, понижение кривой очень медленное. В моче также определяется сахар.

В современной диагностике сахарного диабета критерием является повышение содержания глюкозы в крови натощак до 7,0 мМ/л, проводят пробу на выявление нарушения толерантности к глюкозе. Пробу проводят с сахарной нагрузкой, исследуют содержание глюкозы в крови натощак после приема внутрь 75 г глюкозы, растворенной в 200-300 мл воды. Кровь из пальца для определения содержания глюкозы берут каждые 30 минут в течение 2 часов. Проводится также тест на определение гликозилированного гемоглобина. В крови глюкоза связывается с молекулой гемоглобина (HbA_{1c}) внутри эритроцитов. Число, связанных частиц глюкозы с молекулой гемоглобина напрямую связано с концентрацией глюкозы в крови, так как эритроциты живут 90 дней. По анализу гликозилированного гемоглобина можно установить концентрацию глюкозы за 3 месяца. Повышение уровня с определенного уровня на 5% говорит о хорошо скомпенсированном сахарном диабете, на 10% - частично компенсированный диабет, на 12% и более – некомпенсированный сахарный диабет.

Важно также для диагностики сахарного диабета определение концентрации инсулина и С-пептида. В молекуле преинсулина есть С-пептид, состоящий из 31 аминокислоты, соединяющий А и В цепи. При синтезе инсулина он вырезается пептидазами и вместе с инсулином он попадает в кровоток. До отщепления пептида инсулин не активен. Это позволяет поджелудочной железе образовывать запасы инсулина. С-пептид и инсулин выделяется в равных количествах, поэтому по С-пептиду можно оценить секрецию инсулина. Но надо знать, что скорость выведения из кровотока этих веществ разная. С-пептид дольше находится в крови, чем инсулин и он стабильнее инсулина в 5 раз. У здоровых С-пептид находится в пределах 1-4 нг/мл, инсулин от 6 до 27 мЕ/мл. Повышение уровня С-пептида может свидетельствовать о гипертрофии В-клеток, об инсулин независимом сахарном диабете (ИНСД). Понижение С-пептида отмечается при инсулинзависимом сахарном диабете (ИЗСД).

В диагностике сахарного диабета применяют определение концентрации альбумина в моче. В суточной моче у здоровых людей может обнаруживаться до 8 мг белка. При сахарном диабете белок повышается до 20-300 мг/л.

Дополнительным критерием на риск возникновения сахарного диабета является определение липидного обмена. Уровень триглицеридов в крови изменяется параллельно повышению содержания сахара в крови.

Методы определения глюкозы разделяют на три группы:

- ферментативные,
- редуктометрические,
- методы с использованием цветных реакций, в которых участвуют продукты, образующиеся при нагревании углеводов с концентрированными кислотами.

Ферментативные методы исследования сочетают в себе высокую точность, они основываются на одной из двух реакций – гексокиназной или глюкооксидазной. При гексокиназной глюкоза сначала фосфорилируется за счет АТФ благодаря действию гексокиназы; образовавшийся глюкозо-6-фосфатный эфир в присутствии глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы восстанавливает NADP, количество которого определяется по увеличению светопоглощения в ультрафиолетовой области.

Легче выполнимы глюкозооксидазные методы, в которых глюкозооксидаза окисляет глюкозу кислородом воздуха с образованием перекиси водорода, количество которой определяется или химическим путем, или по ее способности в присутствии пероксидазы окислять диамины с образованием окрашенных продуктов.

Принцип метода: Глюкозооксидаза окисляет глюкозу с образованием перекиси водорода, которая под действием пероксидазы окисляет ортотолидин с образованием синего хромогена.

Реактивы:

1. Натрия хлорид 9 г/л (0,9г NaCl в 100 мл воды).
2. Сульфат цинка, 50 г/л: 5г сульфата цинка растворяют в воде, объем доводят до 100 мл.
3. Натр едкий, 0,3 моль/л: готовят, растворяя 1,2 NaOH в 100 мл воды.

4. Ортотолидин, 1% раствор: 1г препарата растворяют в 100 мл абсолютного спирта.

5. Ацетатный буферный раствор рН 4,8: смешивают 4 части 0,25 Н уксусной кислоты и 6 частей 0,25 Н ацетата натрия.

7. Peroксидаза хрена.

8. Рабочий реактив в 80 мл ацетатного буфера растворяют 2 мг глюкозооксидазы и 1 мг пероксидазы, прибавляют 1 мл 1%-ного раствора ортотолидина, перемешивают и доводят объем буферным раствором до 100 мл.

9. Калибровочные растворы глюкозы. Сначала готовят основной раствор с концентрацией 50 ммоль/л, для чего 180 мг глюкозы растворяют в 20 мл бензойной кислоты. Из этого раствора готовят рабочие калибровочные растворы, содержащие: 3 ммоль/л; 6 ммоль/л; 9 ммоль/л; 12 ммоль/л; 15 ммоль/л; 18 ммоль/л; 21 ммоль/л, для чего берут 0,6 мл; 1,2 мл; 1,8 мл; 2,4 мл; 3,6 мл; 4,2 мл основного раствора и доводят насыщенным раствором бензойной кислоты до 10 мл. Эти растворы содержат глюкозу в тех же концентрациях, в которых она бывает в крови.

Ход определения: В центрифужные пробирки вносят 1,1 мл хлорида натрия, 0,4 мл раствора сульфата цинка и 0,4 мл 0,3 Н раствора NaOH, перемешивают; при этом образуется очень тонкий гель гидрата окиси цинка, в него выпускают 0,1 мл крови или калибровочного раствора, снова перемешивают и через 10 мин. центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин.

К 1 мл надосадочной жидкости добавляют 3 мл рабочего реактива и осторожно перемешивают. Через 15 минут развивается окраска и фотометрируют в кюветах с длиной оптического пути 1 см с красным светофильтром (625 нм) против холостого опыта, который ставят одновременно с рабочими пробами, но вместо крови берут физиологический раствор хлорида натрия. При приготовлении калибровочного графика вместо проб крови берут 0,1 мл соответствующего калибровочного раствора.

Нормальные величины натощак: 3,5- 5,7 ммоль/л (60-100 мг в 100 мл).

4.2. Углеводные компоненты гликопротеидов

Вещества, содержащие белковый и углеводный компоненты, называются гликопротеидами. Различают гликопротеиды и протеогликаны. Гликопротеиды содержат короткие углеводные группы, в которых нет периодически повторяющихся олигосахаридных последовательностей. Протеогликаны или гликозаминпротеогликаны или аминополисахариды или мукополисахариды значительно богаче углеводами, каждая углеводная цепь состоит из повторяющихся дисахаридных фрагментов, содержащих аминсахар и уроновую кислоту или галактозу.

Большинство белков плазмы крови содержит некоторое количество углеводов, поэтому формально относятся к гликопротеинам (трансферрин, церулоплазмин, гаптоглобин и др.). Содержание их увеличивается при воспалительных процессах, в связи с чем их называют белками острой фазы и определяют в

тех случаях, когда надо выявить воспалительный процесс или оценить его активность. При этом возможно несколько подходов:

- Определение индивидуальных гликопротеидов острой фазы специфическими методами и
- Выявление электрофоретических фракций богатых гликопротеидами
- Определение суммы углеводов, связанных с сывороточными белками.

В состав гликопротеидов входят углеводы:

- 1) гексозы – галактоза и манноза и в небольших количествах глюкоза;
- 2) пентозы – ксилоза и арабиноза;
- 3) дезоксисахара – фукоза и рамноза;
- 4) аминасахара – ацетилглюкозамин и ацетилгалактозамин;
- 5) нейраминовая кислота и ее уксуснокислые эфиры, которые называются

сиаловыми кислотами.

О количестве сывороточных гликопротеидов можно судить, определяя любой из этих компонентов, но широкое распространение нашло определение связанных с белком гексоз и сиаловых кислот.

Многие богатые углеводами белки обладают выраженными кислотными свойствами, растворимы в хлорной и трихлорной кислотах и составляют группу серомукоидов. О количестве серомукоидов можно судить по содержанию белкового или углеводного компонента. Содержание в плазме гексоз, связанных с белком, свидетельствует об общем количестве гликопротеидов, а определение гексоз, которые растворимы в хлорной кислоте и нерастворимы в фосфорновольфрамовой, служит показателем количества серомукоидов.

Протеогликанами богато межклеточное вещество соединительной ткани, патологические процессы в которой отражаются на обмене углеводного компонента. Протеогликаны очень гидрофильны, они способны впитывать большое количество воды, в связи с чем их раньше называли мукополисахаридами.

Протеогликаны (гликозаминогликаны, ГАГ) состоят из повторяющихся дисахаридных единиц, каждая из которых содержит аминасахар и уроновую, глюкуроновую кислоту. Глюкуроновую кислоту содержит гиалурионовая кислота, хондроитин- 4-сульфат, гепарин и гепарансульфат; дерматансульфат содержит идуроновую кислоту, а кератансульфат – галактозу.

Увеличение экскреции ГАГ с мочой служит признаком повреждения соединительной ткани вследствие иммунного процесса, воспаления, при тяжелых, деструктивных процессах, при преобладании фибротических, склеротических и дистрофических процессах.

4.2.1. Исследование сиаловых кислот

Принцип метода: При нагревании гликопротеидов плазмы с трихлоруксусной кислотой отщепляются сиаловые кислоты, которые гидролизуются с образованием свободной нейраминовой кислоты и уксусной кислоты. Резорцин в присутствии солей меди дает с нейраминовой кислотой синее окрашивание.

Реактивы:

1. Меди сульфат, 0,1 моль / л: растворяют 624 мг сульфата меди $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ в 25 мл воды.

2. Резорцин 2 г/л. Резорциновый реактив готовят, растворяя 200 мг резорцина в 10 мл воды, затем добавляют концентрированной HCl и 0,25 мл раствора сульфата меди, после смешивания общий объем доводят до 100 мл водой.

3. Экстрагирующий реактив: смешивают 85 мл бутилацетата и 15 мл бутилового спирта.

4. Трихлоруксусная кислота, 50 г/л (ТХУ).

5. Калибровочные растворы. Основной раствор содержит 0,5 мг кристаллической ацетилнейраминовой кислоты в 1 мл воды. Из него готовят калибровочные растворы. В пять пробирок добавляют по: 0,1 мл; 0,2 мл; 0,3 мл; 0,4 мл; 0,5 мл основного раствора, доводят объем каждой пробирки до 1мл водой. Содержание нейраминовой кислоты соответствует с первой по пятую пробирки: 50 мкг/мл; 100 мкг/мл; 150 мкг/мл; 200 мкг/мл; 25 мкг/мл.

Ход определения: К 1 мл плазмы или сыворотки приливают 1,9 мл раствора ТХУ, ставят на 7 минут в кипящую водяную баню для гидролиза, затем охлаждают и фильтруют через бумажный фильтр. К 0,5 мл прозрачного фильтрата добавляют 0,5 мл воды и 1 мл резорцинового реактива, ставят на водяную кипящую баню на 15 минут. После этого охлаждают, добавляют 3 мл экстрагирующего реактива, встряхивают и оставляют на 15 минут для расслоения фаз. Окраска переходит в верхний слой, который берут для фотометрии, которую проводят на ФЭК при длине волны 575-590 нм в кювете на 0,5 см против холостого опыта, при постановке которого к 1 мл воды добавляют 1 мл резорцинового реактива. Остальные процедуры те же, что и в основном опыте. Для построения калибровочного графика берут по 1 мл калибровочных растворов, добавляют по 1 мл резорцинового реактива и обрабатывают так же, как в основном опыте.

Расчет проводят по калибровочному графику.

Нормальные величины. Содержание сиаловых кислот составляет 2,0-2,3 ммоль/л или 620-730 мг/л.

Содержание сиаловых кислот возрастает при самых разнообразных воспалительных процессах, а также при опухолях, инфаркте миокарда.

4.2.2. Определение связанных с белком гексоз

Принцип метода: Гликопротеиды осаждают вместе с белками сыворотки или плазмы спиртом, осадок отмывают, растворяют в щелочи и определяют в нем гексозы по реакции с орцином. Количество гексоз характеризует общее содержание гликопротеидов.

Реактивы:

1. Орциновый реактив. Готовят смешиванием двух реактивов: А – серная кислота и Б – раствор орцина, 16 г/л. Реактив А готовят, осторожно добавляя к 40 мл воды 60 мл концентрированной серной кислоты. Реактив Б готовят, рас-

творяя 1,6 г орцина в 100 мл воды. Перед определением смешивают 7,5 мл реактива А и 1 мл реактива Б.

2. 96%-ный этиловый спирт.

3. Натр едкий, 0,1 Н раствор.

4. Хлорная кислота, 0,6 моль/л, содержит 6% HClO_4 .

5. Фосфорновольфрамовая кислота, 50г/л. Готовят растворяя 5 г ее в 100 мл 2Н HCl .

6. Калибровочный раствор, содержащий 45 мг галактозы и 45 мг маннозы в 100 мл воды.

Ход определения: К 0,1 мл сыворотки или плазмы приливают 5 мл 96 %-ного спирта, перемешивают и центрифугируют 5 мин. Осадок тщательно взбалтывают в 5 мл спирта, снова центрифугируют и удаляют надосадочную жидкость. Осадок растворяют в 1 мл 0,1 NaOH , добавляют 8,5 мл орцинового реактива, перемешивают и ставят на водяную баню при 80°C на 15 мин. Охлаждают и фотометрируют в кювете с длиной оптического пути 1 см при длине волны 500 нм против холостого опыта, при постановке которого берут вместо осадка, растворенного в щелочи, воду или 0,1 Н NaOH .

Построение калибровочной кривой. 0,05-0,3 мл основного калибровочного раствора доводят водой до 1 мл, приливают 8,5 мл орцинового реактива и обрабатывают так же, как и опыт. Окраска раствора, в которой взято 0,3 мл калибровочного раствора, соответствует окраске опытной пробы, в которую взята сыворотка, содержащая 15 ммоль/л гексоз. Окраска раствора, в которую взято 0,2 мл калибровочного раствора соответствует содержанию 10 ммоль/л гексоз и т.д.

4.2.3. Метод определения гексоз, связанных с серомукоидом

Серомукоиды – это особый вид гликопротеидов, которые растворимы в хлорной кислоте, но нерастворимы в фосфорновольфрамовой кислоте. Для их определения остальные белки осаждают хлорной кислотой, добавляя к надосадочной жидкости фосфорновольфрамовую кислоту, осаждают серомукоиды, осадок отмывают, растворяют в щелочи и определяют содержание гексоз по реакции с орцином. Количество гексоз характеризует общее содержание серомукоидов.

Самые разнообразные воспалительные процессы приводят к увеличению содержания связанных с белками или серомукоидом сыворотки гексоз. Наибольшее диагностическое значение имеет их определение для выявления вялотекущих воспалительных процессов, повышение этих показателей свидетельствует об активации процесса, даже если клинические симптомы еще не проявились. Чаще всего связанные с белками гексозы исследуют ревматологи.

Реактивы:

1. Орциновый реактив. Готовят смешиванием двух реактивов: А – серная кислота и Б – раствор орцина, 16 г/л. Реактив А готовят, осторожно добавляя к 40 мл воды 60 мл концентрированной серной кислоты. Реактив Б готовят, рас-

творяя 1,6 г орцина в 100 мл воды. Перед определением смешивают 7,5 мл реактива А и 1 мл реактива Б.

2. 96%-ный этиловый спирт.

3. Натр едкий, 0,1 Н раствор.

4. Хлорная кислота, 0,6 моль/л, содержит 6% HClO_4 .

5. Фосфорновольфрамовая кислота, 50г/л. Готовят растворяя 5 г ее в 100 мл 2Н HCl .

6. Калибровочный раствор, содержащий 45 мг галактозы и 45 мг маннозы в 100 мл воды.

Ход определения:

К 1 мл сыворотки или плазмы добавляют 1 мл воды и после перемешивания осторожно приливают 2 мл 0,6 Н хлорной кислоты, перемешивают и оставляют стоять на 10 минут, после чего центрифугируют при 4000 об/мин. Надосадочную жидкость сливают в чистую пробирку, добавляют 2 мл 5%-ного раствора фосфорновольфрамовой кислоты, перемешивают и центрифугируют. Надосадочную жидкость удаляют, к осадку добавляют 2 мл 96 %-ного спирта, снова перемешивают и центрифугируют 10 мин при 4000 об/мин. Надосадочную жидкость удаляют, осадок растворяют в 1 мл 0,1 Н NaOH , приливают 8,5 мл орцинового реактива. Дальнейшее определение проводят так же, как определение общего количества связанных с белками гексоз.

Построение калибровочного графика. 0,05-0,5 мл калибровочного раствора доводят водой до объема 1 мл и приливают 8,5 мл орцинового реактива; дальнейшее определение проводят так же, как и в опыте. Окраска раствора, в которой взято 0,5 мл калибровочного раствора, соответствует содержанию гексоз, связанных с серомукоидом, - 2,5 ммоль/л. Окраска раствора, в который взято 0,4 мл калибровочного раствора, соответствует содержанию в сыворотке 2 ммоль/л связанных с серомукоидом гексоз и т.д.

Общее количество гексоз, связанных с белками сыворотки или плазмы, составляет в норме 5,8-6,6 ммоль/л, из них с серомукоидом связано 1,2-1,6 ммоль/л.

5. ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА

Общие липиды сыворотки крови – это обобщенное понятие, включающее неэстерифицированные жирные кислоты, триглицериды, фосфолипиды, свободный и эстерифицированный холестерин, сфингомиелины.

Липиды нерастворимы в воде, поэтому в плазме крови они присутствуют только в составе липопротеидов, которые являются высокомолекулярными водорастворимыми соединениями, молекулы которых образуются при гидрофобных и электростатических взаимодействиях белков с неполярными липидами. В этом комплексе белки вместе с полярными липидами формируют поверхностный гидрофильный слой, окружающий и защищающий внутреннюю гидрофобную липидную сферу от водной среды и обеспечивают транспорт липидов в кровяном русле и их доставку в органы и ткани.

Липопротеиды плазмы крови являются транспортной формой липидов в организме человека. Они транспортируют экзогенные и эндогенные липиды. Отдельные липопротеиды осуществляют захват избыточного холестерина из стенок периферических тканей и осуществляют его обратный транспорт.

Плазменные липопротеины (ЛП) – это сложные комплексные соединения, имеющие характерное строение: внутри липопротеиновой частицы находится жировая капля (ядро), содержащая неполярные липиды (триглицериды, эстерифицированный холестерин); жировая капля окружена оболочкой, в состав которой входят фосфолипиды, белок и свободный холестерин. Толщина наружной оболочки липопротеиновой частицы составляет 2,1-2,2 нм, что соответствует половине толщины липидного бислоя клеточных мембран. Плазменные липопротеины представляют собой сложные надмолекулярные комплексы, в которых химические связи между компонентами комплекса носят нековалентный характер, поэтому их называют не молекулой, а частицей.

Белки, расположенные на поверхности липопротеинов, называют апопротеинами или просто апо. Апопротеины – это коферменты, активаторы ферментов, обеспечивающих метаболизм холестерина и триглицеридов. Эти белки обозначают буквами латинского алфавита (А, В, С, Е и др.). Для каждого липопротеида специфична его белковая часть, она и определяет свойства комплекса в целом и его значение. Липидная часть менее специфична, так как разные липопротеиды содержат одни и те же липидные вещества, но в разных соотношениях.

Существует несколько классификаций липопротеинов, основанных на различиях в их свойствах: гидратированной плотности, скорости флотации, электрофоретической подвижности, а также на различиях в апопротеиновом составе частиц. При ультрацентрифугировании в солевых растворах можно получить отдельные фракции ЛП:

- хиломикроны (ХМ) – самые легкие частицы,
- липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП),
- липопротеины низкой плотности (ЛПНП),

- липопротеины высокой плотности (ЛПВП).

В основе другой классификации липопротеинов – по различиям электрофоретической подвижности по отношению к глобулинам плазмы крови, выделяют:

- ХМ,
- пре β - липопротеины, что соответствует подвижности ЛПОНП,
- β -липопротеины, что соответствует ЛПНП,
- α - липопротеины, что соответствует ЛПВП.

В состав ЛПВП входят два главных белка А-I и А-II. Основным апобелком ЛПНП является апобелок В, он входит также в состав ЛПОНП и хиломикронов. Апобелки С-I, С-II и С-III представляют собой небольшие полипептиды, которые могут свободно переходить от одного липопротеина к другому и тем самым меняется специализация липопротеинов.

ХМ – самая крупная липопротеиновая частица с очень низкой плотностью, богатая триглицеридами, содержит до 90% эндогенных триглицеридов, фосфолипидов 6%, холестерина 2% и только 1% белка, в основном апоА и апоС. Образуются после всасывания продуктов, обогащенных жиром в стенке кишечника и осуществляют транспортную функцию – перенос липидов к тканям, нуждающимся в них, а также служат для отложения запаса в подкожной жировой клетчатке. ХМ поступают в кровь через лимфатические сосуды. В норме из крови исчезают через 8-12 часов после приема пищи.

ЛПОНП – это широкий спектр частиц различающихся размером. Содержат больше белка – 9 %, это апо-В, апо-С, апо-Е, и до 91% липидов, в состав которых входят: фосфолипиды – 14-20%, холестерин – 15-17%, триглицериды – 50-70%. Они также осуществляют транспортную функцию жиров к месту утилизации, но в основном это триглицериды эндогенного происхождения, которые синтезируются в слизистой оболочке кишечника, но главным образом в печени. У ЛПОНП по сравнению с ХМ существенно повышено содержание холестерина. Период полужизни ЛПОНП от 2 до 4 часов, их расщепление происходит при действии липолитических ферментов.

ЛПНП содержат в своем составе 21% белка и 70% липидов, в составе липидов: триглицеридов – от 8 до 33 %, фосфолипидов от 10 до 30 % и общего холестерина от 25 до 48 %. Таким образом в этом классе превалирует холестерин, в связи с этим ЛПНП имеют наибольшее отношение к атерогенезу. В их составе белки: апо-В, апо-С, апо-Д, апо-Е, апо-А, апо-Ф. Образуются ЛПНП в печени, а также в результате метаболизма их предшественников, то есть ЛПОНП. Все клетки организма способны синтезировать холестерин сами, но при невозможности обеспечить себя им получают его через ЛПНП и в меньшей степени от ЛПОНП. При необходимости неостребованный холестерин вместе с этими липопротеидами вновь возвращается в печень, где он идет на образование желчных кислот. Период полужизни ЛПНП от 2 до 4 суток, расщепление происходит в надпочечниках, печени, селезенке, половых железах, а также в других органах.

ЛПВП богаты белками, содержат 52%, в основном апо-АI, апо-АII, апо-С; липидов приблизительно 48%, из которых наибольшее количество относится к группе фосфолипидов – до 40%, на долю ТГ приходится примерно 5%, холестерин – от 20 до 35%. Образование ЛПВП происходит в печени, в плазме крови синтез может происходить за счет расщепления предшествующих классов ЛП, то есть из ХМ и ЛПОНП. Частицы ЛПВП после возникновения имеют дисковидную форму, снаружи покрыты апо-белками, внутри двойной слой фосфолипидов. Вид и размер частиц зависит от количества молекул апо-АI на их поверхности. Во время нахождения в кровотоке эти частицы накапливают внутри себя холестерин. Апо-АI активирует сывороточный фермент лецитин-холестеринацетилтрансферазу, которая катализирует расщепление фосфолипидов и, ацетилируя холестерин, переводит его в биологически неактивную форму. Поэтому считают, что основная роль ЛПВП связана со способностью убирать избыточный холестерин с наружной поверхности тех липопротеидов, которые обогащены им, а также из различных органов и тканей, нуждающихся в освобождении от холестерина для его обратного транспорта в печень, где он подвергается окислению. Таким образом, ЛПВП обладает антиатерогенным эффектом. Чем выше уровень ЛПВП, тем быстрее происходит липолиз ЛПОНП и частота развития атеросклероза, заболеваемость ИБС и другими ишемическими формами снижена, поэтому ЛПВП рассматриваются как фактор, способствующий здоровью и долголетию.

Помимо этих классов липопротеидов выделяют еще ЛППП (промежуточной) плотности, они образуются в плазме крови в качестве промежуточных комплексов на пути превращения ЛПОНП в ЛПНП. ЛППП относительно богаты не только холестерином, но и триглицеридами.

В плазме крови человека присутствуют четыре основных класса **липидов**:

- 1) холестерин и его эфиры;
- 2) триглицериды;
- 3) фосфолипиды;
- 4) неэтерифицированные жирные кислоты (НЭЖК).

Холестерин, триглицериды и фосфолипиды образуют комплексы с апо-протеидами и входят в состав липопротеидов. НЭЖК в основном адсорбированы на альбумине.

Для определения холестерина используются характерные для него цветные реакции, триглицериды определяют по количеству входящего в их состав глицерина, НЭЖК – титрометрическим методом, а фосфолипиды - по входящему в их состав фосфору.

Холестерин и его эфиры. Находящийся в тканях свободный (неэтерифицированный) холестерин входит в состав клеточных мембран. Переходя в плазму крови, он там этерифицируется, образуя сложные эфиры с жирными кислотами, источником которых служит фосфатидилхолин (лецитин). Реакция переэтерификации ускоряется плазмаспецифическим ферментом фосфатидилхолин-холестерин-ацил-трансферазой, которая вырабатывается печенью. При заболеваниях печени, когда нарушена выработка фермента, количество эфиров холестерина в плазме крови уменьшается. Среди жирных кислот, которые со-

единяются эфирной связью с холестерином, больше всего линолевой, олеиновой и пальмитиновой кислот. В меньших количествах присутствуют другие жирные кислоты с 16-20 атомами углерода; соотношение их может сильно варьировать и зависит от состава поступающих с пищей жиров. Помимо холестерина, в организме, в плазме крови присутствуют продукты его неполного биосинтеза и распада, растительные стероиды из пищи, сульфатированные производные и т.д.

В эритроцитах, так же, как и в других клетках. Содержится свободный холестерин, количество которого значительно отличается от содержания в плазме.

При окислении холестерина, так же как и при его дегидратировании, могут образовываться самые разнообразные окрашенные продукты. На этом основано несколько цветных реакций на холестерин. Широкое распространение получил метод Либермана-Бурхарда и Златкиса-Зака.

Метод Либермана заключается в том, что в сильно кислой среде в присутствии уксусного ангидрида от холестерина отщепляется вода и образуется окрашенное в зеленовато-синий цвет соединение, содержащее несколько сопряженных двойных связей. Реакция может протекать в самых разнообразных растворах, содержащих кроме уксусного ангидрида, уксусную и серную кислоты, а также органические растворители, необходимо, чтобы бы среда была абсолютно безводной. Эфиры холестерина в этих условиях расщепляются, и окрашивание развивается, но реакция идет медленнее, чем со свободным холестерином. Кроме холестерина ряд растворенных продуктов дает такое же окрашивание, но в связи с тем, что в биологических жидкостях их мало, реакция оказывается достаточно специфичной для холестерина.

Другая цветная реакция Златкиса-Зака основана она том, что при окислении холестерина хлорным железом в концентрированной серной кислоте развивается красно-фиолетовое окрашивание. Эта реакция более чувствительна.

Присутствующие в плазме крови эфиры холестерина образуются непосредственно в плазме в результате переноса остатков жирных кислот фосфатидилхолинов (лецитина) на свободный холестерин. Эта реакция ускоряется плазмаспецифическим ферментом ЛХАТ, который вырабатывается печенью. При ее поражении синтез фермента нарушается, и количество эфиров холестерина уменьшается. Поэтому степень этерификации холестерина имеет определенное диагностическое значение. Для ее определения чаще всего используют способность свободного холестерина образовывать нерастворимые соединения с дигитонином, пиридин сульфатом и другими веществами.

5.1. Унифицированный метод определения общего холестерина (метод Илька)

Принцип метода: Присутствующий в плазме или сыворотке крови холестерин и его эфиры дают цветное окрашивание при обработке смесью уксусного ангидрида, серной и уксусной кислот.

Реактивы:

1. Ледяная уксусная кислота.
2. Концентрированная серная кислота.
3. Уксусный ангидрид.
4. Абсолютный спирт.

5. Кислотная смесь: в сухую колбу наливают 10 мл ледяной уксусной кислоты и 50 мл уксусного ангидрида, затем при постоянном перемешивании и охлаждении добавляют 10 мл концентрированной серной кислоты.

6. Калибровочный раствор: 232 мг холестерина растворяют в 2-3 мл хлороформа и доводят до объема 100 мл абсолютным спиртом. Раствор содержит холестерин в концентрации 6 ммоль/л.

Ход определения: К 2,1 мл кислотной смеси медленно по стенке пробирки добавляют 0,1 мл плазмы или сыворотки без гемолиза, перемешивают, ставят на 20 мин в термостат или водяную баню при 37°C, затем фотометрируют в кювете с длиной оптического пути 0,5 см при длине волны 625 нм.

Построение калибровочной кривой. К 0,05-0,2 мл калибровочного раствора добавляют такое же количество кислотной смеси, чтобы общий объем был 2,2 мл, перемешивают и выдерживают 20 мин при 37°C, так же как опытные пробы, а затем фотометрируют. Окраска калибровочной пробы, в которую взято 0,05 мл калибровочного раствора, соответствует содержанию холестерина в плазме 3 ммоль/л пробы, в которую взято 0,1 мл – содержанию 6 ммоль/л и т.д.

5.2. Унифицированный метод определения общего холестерина по реакции с хлорным железом (метод Златкис-Зака)

Принцип метода: Содержащийся в плазме или сыворотке крови свободный и эфирносвязанный холестерин окисляется хлорным железом в присутствии уксусной, серной и фосфорной кислот с образованием ненасыщенных продуктов, окрашенных в красно-фиолетовый цвет. Фосфорная кислота повышает стойкость реактива, содержащего хлорное железо.

Реактивы:

1. Ледяная уксусная кислота.
2. Серная кислота концентрированная.
3. Железо хлорное $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.
4. Ортофосфорная кислота; содержит 85%-ный H_3PO_4 .
5. Раствор хлорного железа: 2,5 г хлорного железа растворяют в 80 мл ортофосфорной кислоты. Нагревая до полного растворения, затем охлаждают и доводят объем до 100 мл ортофосфорной кислотой.
6. Цветной реактив: к 8 мл раствора хлорного железа добавляют серную кислоту так, чтобы суммарный объем был 100 мл.
7. Калибровочный раствор холестерина в уксусной кислоте: 116 мг холестерина растворяют в 100 мл ледяной уксусной кислоты. Раствор содержит холестерин в концентрации 3 ммоль/л.

Ход определения: К 1,3 мл уксусной кислоты осторожно добавляют 0,05 мл плазмы или сыворотки крови без гемолиза, перемешивают, а затем добавляют 1 мл цветного реактива, хорошо перемешивают встряхиванием и остав-

ляют на 30 мин при комнатной температуре, после чего фотометрируют при длине волны 530 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см против холостого опыта, в который берут 1,3 мл уксусной кислоты, 0,05 мл исследуемой сыворотки или плазмы и 1 мл концентрированной серной кислоты.

Для приготовления калибровочного графика вместо исследуемого материала берут 0,05-0,2 мл калибровочного раствора, к которому добавляют уксусную кислоту до суммарного объема 1,35 мл, а затем добавляют 1 мл цветного реактива. Проба, в которую взяли 0,05 мл калибровочного реактива по окраске соответствует опытной пробе с содержанием холестерина в исследуемом материале 3 ммоль/л; проба, в которую взяли 0,1 мл калибровочного раствора, соответствует содержанию холестерина 6 ммоль/л и т.д. Расчет проводят по калибровочному графику.

5.3. Унифицированный метод определения триглицеридов по реакции с ацетилацетоном после экстракции смесью гептана и изопропилового спирта

Триглицериды или нейтральные жиры представляют собой эфиры глицерина и трех остатков жирных кислот, чаще всего с 16-18 атомами углерода. Точный состав жирно кислотных остатков может колебаться в определенных пределах и зависит от характера питания. Наибольшее значение имеет определение триглицеридов для типирования гиперлипидемий. Кроме того повышенное содержание триглицеридов бывает при нефротическом синдроме, гипотиреозе. Количество триглицеридов определяют по содержанию глицерина, который образуется при щелочном или ферментативном гидролизе.

Принцип метода: Триглицериды экстрагируются смесью гептана и изопропилового спирта, в которую переходят только неполярные липиды, а более полярные фосфолипиды остаются в водной фазе. Триглицериды омыляются (гидролизуются) щелочью, глицерин окисляется йодной кислотой до формальдегида, который определяется по цветной реакции с ацетилацетоном.

Реактивы:

1. Гептан.
2. Изопропиловый спирт.
3. 0,08N серная кислота (примерно 2,2 мл концентрированной H_2SO_4 на 1 воды.
4. Едкое кали, 6,25 моль/л: 17,8 г КОН растворяют в 50 мл воды.
5. Уксусная кислота, 50 г/л.
6. Йодная кислота: растворяют 0,6 г $HO_4 \times 2H_2O$ (перйодная кислота) в 100 мл 5%-ной уксусной кислоты.
7. Аммония ацетат 2 моль/л: растворяют 154 г ацетата аммония в воде, объем доводят до 1 л.
8. Ацетилацетоновый реактив: 1,5 мл ацетилацетона разводят раствором уксуснокислого аммония до суммарного объема 200 мл.

9. Калибровочный раствор треолеина, 2 ммоль/л. Содержит 170 мг треолеина в 100 мл изопропилового спирта.

Ход определения: К 0,5 мл сыворотки или плазмы добавляют 2 мл гептана, 3,5 мл изопропилового спирта и 1 мл 0,08Н серной кислоты, перемешивают и через 5 мин центрифугируют. Из верхнего (гептанового) слоя отбирают 0,4 мл, добавляют 2 мл изопропилового спирта и 1 каплю 6,25Н КОН. Перемешивают, нагревают на водяной бане 10 мин при 70°C. После охлаждения добавляют 0,2 мл перйодатного реактива и 1 мл ацетил ацетонового реактива, после перемешивания вновь нагревают 10 мин при 70°C. Развивается желто-зеленое окрашивание, интенсивность которого измеряют при длине волны 425 нм в кюветах с длиной оптического пути 0,5 см против холостой пробы, которую ставят так же, как и опытную, но вместо исследуемого материала берут 0,5 мл воды.

Калибровочную пробу ставят так же, как и опытную, но вместо сыворотки или плазмы берут 0,5 мл калибровочного раствора и 0,5 мл воды: развивающаяся окраска соответствует окраске опытной пробы, в которую взята плазма с содержанием триглицеридов 2 ммоль/л.

Нормальные величины триглицеридов в плазме крови считают 0,55-1,65 ммоль/л (50-150 мг в 100 мл).

5.4. Фракционирование липопропротеидов в полиакриламидном геле

Принцип метода: Предварительно окрашенные липопропротеиды сыворотки крови подвергают электрофорезу в направлении сверху вниз в колонке, заполненной слоями полиакриламидного геля (ПААГ). Нижний слой геля самый мелкопористый, верхний самый крупнопористый. Липопропротеиды в зависимости от размера их молекул задерживаются в разных участках геля.

Реактивы:

1. ТРИС (оксиметил) аминметан.
2. Акриламид.
3. Метиленбисакриламид.
4. ТЕМЕД.
5. Рибофлавин.
6. Сахароза.
7. Глицин.
8. Судан черный – насыщенный спиртовой раствор.
9. Аммония персульфат. 0,14 %-ный раствор.
10. Электродный трисглициновый буфер, рН 8,3: в 1 л воды растворяют 0,6 г ТРИС и 2,88 г глицина; с помощью HCl или едкого натра устанавливают рН.
11. Трис- буфер рН 8,9 – раствор А: к 36,6 г ТРИС добавляют около 40 мл воды, 48 мл 1Н HCl и 0,23 мл ТЕМЕД; после растворения объем доводят до 100 мл водой и устанавливают рН 8,9.

12. Трис – буфер рН 6,7, раствор В: к 5,98 г ТРИС добавляют около 40 мл воды, 48 мл 1Н НСІ и 0,46 мл ТЕМЕД, доводят объем до 100 мл и устанавливают рН 6,7.

13. 28%-ный раствор акриламида – реактив С: 28 г акриламида и 0,735 г метиленбисакриламида растворяют в воде и доводят объем до 100 мл.

14. 10%-ный раствор акриламида – реактив Д: 10 г акриламида и 2,5 г метиленбисакриламида растворяют в воде и объем доводят до 100 мл.

15. Раствор рибофлавина - реактив Е: 4 мг рибофлавина растворяют в 100 мл воды.

16. 40%-ный раствор сахарозы – реактив F: 40 г сахарозы растворяют в воде и доводят объем до 100 мл.

Ход определения: Определение проводят в аппарате для вертикального электрофореза. Формируют столбики четырехслойного геля:

- нижний 10%-ный гель: раствор А –1 мл, С- 2,8 мл, аммония персульфат – 4 мл, воды – 0,2 мл.
- второй снизу 5%-ный гель: раствор А - 1 мл, раствор С –1,36 мл, аммония персульфат – 4 мл, воды – 1,64 мл.
- третий снизу 3%-ный гель: раствор А - 1 мл, раствор Д – 2 мл, раствор Е – 1 мл, раствор F – 4 мл.
- верхний 3%-ный гель: раствор В –1 мл, раствор Д - 2 мл, раствор Е - 1 мл, раствор F – 4 мл.

После того как залит очередной раствор, который должен полимеризоваться в гель, на него сверху наносят несколько капель воды, под слоем которого гель полимеризуется.

К 0,3 мл исследуемой сыворотки добавляют 0,15 мл раствора судана черного, 0,15 мл раствора сахарозы и 0,05 мл трис-буфера (рН 6,7), после чего перемешивают и оставляют на 1 час. Затем 0,03-0,05 мл осторожно наносят на поверхность сформированного геля, дают впитаться в течение нескольких минут и проводят электрофорез в течение 1 ч. При силе тока 4-5 мА на трубку.

Оценка результатов. На самом верху трубки расположена полоса хиломикронов, затем пре В липопротеиды, В-липопротеиды и α- липопротеиды.

6. НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ АЗОТИСТЫЕ ВЕЩЕСТВА

Низкомолекулярные азотистые вещества или небелковые азотистые компоненты крови состоят из конечных продуктов обмена белков и нуклеиновых кислот. Эти вещества остаются в сыворотке крови после осаждения белка. В состав фракций небелкового азота крови или сыворотки крови входит азот мочевины (до 50%), аминокислот (до 25%), мочевой кислоты (до 4%), креатина и креатинина (до 7,5%), полипептидов, нуклеотидов и других азотистых соединений (до 5%).

6.1. Уреазный метод определения мочевины

Мочевина является основной фракцией остаточного азота, определение которой используется в диагностических целях. Синтез ее происходит в печени из аммиака, который образуется при дезаминировании аминокислот, распада пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов.

Отклонения от нормального содержания мочевины в сыворотке крови зависят от скорости процессов синтеза мочевины и ее выделения. Увеличение содержания мочевины в сыворотке крови является одним из главных признаков нарушения почек. Из фракций остаточного азота раньше всего повышается уровень мочевины. При почечной недостаточности азот мочевины может составлять до 90% фракций остаточного азота.

Повышение уровня мочевины сыворотки крови может носить и внепеченочный характер: при потере жидкости, при усиленном распаде белков (острая атрофия печени, тяжелые печени) из-за нарушения синтеза мочевины в печени.

Принцип метода: Мочевина под действием уреазы разлагается с образованием аммиака и углекислого газа. Для уреазы мочевина является единственным субстратом, поэтому уреазные методы высокоспецифичны. Выделившийся аммиак образует с гипохлоритом натрия и фенолом окрашенный продукт – индофенол (синего цвета). Интенсивность окраски пропорциональна содержанию мочевины.

Реактивы:

1. Уреазы.
2. Этилендиамин-N (N-тетрауксусной кислоты динатриевая соль).
- 3 ЭДТА – буфер рН 6,5: 0,6 г трилона В растворяют в 30-40 мл воды, доводят до рН 6,5 раствором едкого натра и доливают водой до 50 мл.
4. Основной раствор уреазы в буфере: 20 мг уреазы растворяют в 10 мл буфера.
5. Рабочий раствор уреазы - перед началом определения берут необходимое количество основного раствора и разводят бидистиллированной водой в отношении 1:4.
6. Фенол.
7. Натрия нитропруссид 2-водный.

8. Цветной реактив: фенол – 0,11 моль/л, нитропруссид натрия – 0,18 моль/л: 0,0263 г нитропруссид натрия помещают в мерную колбу на 500 мл, приливают примерно 300 мл воды, растворяют при перемешивании. Затем добавляют 5,18 г фенола и доливают водой до метки.

9. Натр едкий 1 моль/л; 0,26 моль/л.

10. Гипохлорид натрия: 10 г хлорной извести размешивают в течение 15 минут с 17 мл воды, затем добавляют раствор, состоящий из 17 мл воды и 7 г карбоната натрия. Масса сначала густеет, а затем разжижается. Надосадочную жидкость сливают и фильтруют через промытый водный фильтр. Как только раствор приобретает слабо желтую окраску, добавляют 10 капель 1%-ного раствора крахмала и титруют до обесцвечивания.

11. Основной раствор гипохлорита натрия разводят водой так, чтобы концентрация хлора составляла 0,78 г/л, смешивают с равным объемом 0,26 моль/л раствором едкого натрия (100мл+100мл).

12. Мочевина.

13. Бензойная кислота, 2 г/л (кислоту растворяют при нагревании).

14. Калибровочный раствор мочевины, 0,5 ммоль/л: 15 мг мочевины растворяют в мерной колбе на 500 мл в 2 г/л растворе бензойной кислоты.

Ход определения: Перед определением сыворотку разводят 0,154 моль/л раствором хлорида натрия в отношении 1:9.

Опытная проба: 100 мкл рабочего раствор уреазы вносят в пробирку, добавляют 20 мкл разведенной сыворотки. Закрывают пробкой, перемешивают и инкубируют в течение 15 минут при 37 °С. После инкубации добавляют 300 мкл цветного реактива и 300 мкл рабочего раствора гипохлорита натрия. Перемешивают и инкубируют в течение 20-30 минут при 37 °С. Измеряют экстинкцию в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 500-560 нм (зеленый светофильтр) против холостой пробы.

Холостую пробу обрабатывают так же, как опытную, но вместо сыворотки берут 0,154 моль/л раствор.

Калибровочную пробу обрабатывают так же, как опытную, но вместо сыворотки берут калибровочный раствор мочевины. Измеряют при тех же условиях против холостой пробы.

Расчет ведут по формуле:

$$\text{Количество мочевины, ммоль/л} = \frac{E_{\text{оо}}}{E_{\text{к}}} \times 0,5 \times 10$$

Где $E_{\text{оо}}$ - экстинкция опытной пробы, $E_{\text{к}}$ – экстинкция калибровочной пробы: 0,5 - концентрация мочевины в калибровочном растворе ммоль/л, 10 – коэффициент разведения.

Нормальные величины. Сыворотка крови – 2, 5-8,3 ммоль/л , или 20-50 мг/100мл.

6.2. Уреазный метод определения мочевины по салицилатно-гипохлоритной реакции

Принцип метода: Мочевина под действием уреазы разлагается с образованием аммиака и углекислого газа. Выделившийся аммиак образует с гипохлоритом натрия и салицилатом натрия окрашенный продукт. Интенсивность окраски пропорциональна содержанию мочевины.

Реактивы:

1. Этилендиаминтетрауксусная кислота, динатриевая соль ЭДТА.
2. Азид натрия.
3. Натр едкий, 5 моль/л.
4. Гипохлорит натрия.
5. Йодит калия, 50 г/л.
6. HCl, 6 моль/л.
7. Нитропруссид натрия, 2,69 ммоль/л.
8. Буферный раствор: ЭДТА – 26,9 ммоль/л; HCl – 20 ммоль/л; азид натрия – 15,4 ммоль /л, рН 6,5, 10 г ЭДТА, 1 г азидата натрия растворяют в 800 мл воды с 20 мл 1 моль/л раствора едкого натра. Доводят рН 6,5 и доливают водой до 1 л.
9. Салицилат натрия, 1060 ммоль/л: 170 г салицилата натрия растворяют в воде и доводят объем до 1 л.
10. Гипохлорит натрия, раствор: 70 ммоль/л гипохлорита натрия и 2500 ммоль/л натра едкого. Масса сначала густеет, а затем разжижается. Надсадочную жидкость сливают и фильтруют через промытый водный фильтр. Как только раствор приобретает слабо желтую окраску, добавляют 10 капель 1%-ного раствора крахмала и титруют до обесцвечивания.
11. Уреазный реактив: 200 мг препарата уреазы растворяют в 1 л буферного раствора, хорошо перемешивают, профильтровывают.
12. Салицилатный реактив – 1060 ммоль/л салицилата натрия и 2,69 ммоль/л нитропруссидата натрия: 800 мг нитропруссидата натрия растворяют в 1 л раствора салицилата натрия, фильтруют.

Ход определения: Реакцию проводят при 37 °С. Опытная проба: к 10 мкл сыворотки добавляют 0,1 мл воды или 154 ммоль/л раствора хлорида натрия, 0,5 мл уреазного реактива. Смесь инкубируют в течение 3 мин при температуре 37 °С, затем добавляют 2 мл салицилатного реактива, перемешивают. Добавляют 2 мл гипохлоритного реактива. Через 5-6 мин инкубации при 37 °С, измеряют оптическую плотность раствора на ФЭК в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 500-560 нм (зеленый светофильтр) против холостой пробы на реактивы. Холостую пробу на сыворотку ставят так же, как опытную, но уреазный реактив добавляют после салицилатного реактива перед гипохлоритом. Измеряют против холостой пробы на реактивы.

Калибровочную пробу обрабатывают так же, как опытную, но вместо сыворотки берут калибровочный раствор мочевины. Измеряют в тех же условиях, что и опытную, против холостой пробы на реактивы.

Расчет производят по следующей формуле:

$$\text{Концентрация мочевины, ммоль/л} = C_k \times (E_{\text{оп}} - E_{\text{хол.сыв.}}) / E_k$$

Где $E_{\text{оп}}$ – экстинкция опытной пробы, измеренная против холостой пробы на реактивы; $E_{\text{хол.сыв.}}$ - экстинкция холостой пробы на сыворотку, измеренная против холостой пробы на реактивы. C_k – концентрация мочеины в калибровочном растворе, ммоль/л.

Нормальные величины. Сыворотка крови – 2, 5-8,3 ммоль/л, или 20-50 мг/100мл.

6.3. Унифицированный метод определения креатина по цветной реакции Яффе

В синтезе эндогенного креатина принимают участие аминокислоты – аргинин, глицин, метионин. Креатин при фосфорилировании превращается в креатинфосфат, из которого образуется креатинин (ангидрид креатина). Этот процесс в живом организме необратимый.

Креатин и креатининфосфат являются важными азотистыми веществами мышц, участвующими в химических процессах, связанных с мышечными сокращениями. В сыворотке крови содержится в основном креатинин. Суточное выделение креатинина для каждого человека – величина постоянная, которая зависит от массы мышечной ткани и мало зависит в отличие от мочевины от питания. Содержание креатинина в сыворотке крови уменьшается с возрастом.

Принцип метода: Креатинин реагирует с пикриновой кислотой в щелочной среде с образованием окрашенных соединений.

Реактивы:

1. Пикриновая кислота, насыщенный раствор. В 100 мл воды растворяют 2 г пикриновой кислоты при нагревании в горячей бане. Затем профильтровать.

2. HCl

3. Основной калибровочный раствор креатинина, 10 ммоль/л: 113,1 мг креатинина доводят до 100 мл 0,1 моль/л раствором HCl. Для определения креатинина в сыворотке крови рабочий калибровочный раствор получают разведением основного раствора водой в 100 раз; 1 мл раствора содержит 0,1 ммоль креатинина.

4. Натр едкий, 2,5 моль/л.

Ход определения: 2 мл сыворотки крови смешивают с 6 мл насыщенного раствора пикриновой кислоты. Через 5 минут пробирку помещают на 15-20 сек в кипящую водяную баню, затем центрифугируют. К 4 мл центрифугата добавляют 0,2 мл 2,5 моль/л раствора едкого натра и тщательно смешивают. Иногда после подщелачивания раствор мутнеет вследствие выпадения фосфатов. В этом случае раствор еще раз центрифугируют. Затем раствор доводят до объема 10 мл водой. Через 10 мин измеряют в кювете с толщиной слоя 2 см при длине волны 500-560 нм (зеленый светофильтр) против холостой пробы.

Холостая проба: 3 мл насыщенного раствора пикриновой кислоты и 0,2 мл 2,5 моль/л раствора едкого натра доводят до объема 10 мл водой.

Расчет производят по калибровочному графику.

Построение калибровочного графика: В пять пробирок добавляют последовательно: 0,4 мл; 0,8 мл; 1,6 мл; 2,4 мл; 3,2 мл рабочего калибровочного раствора креатинина. В них добавляют по 3,0 мл пикриновой кислоты и по 0,2 мл 2,5 моль/л раствора едкого натра, доводят объем до 10 мл. Через 10 мин проводят измерения при тех же условиях, что и опытные пробы. Концентрация креатинина в пробах составляет с первой по пятую соответственно: 40 ммоль/л; 80 ммоль/л; 160 ммоль/л; 240 ммоль/л; 320 ммоль/л.

7. ПИГМЕНТЫ

Пигменты, или окрашенные соединения небелкового характера, могут находиться в организме человека в свободном и связанном состоянии.

Основными структурными компонентами пигментов являются пиррольные кольца, связанные между собой метиновыми группами (==CH--). С диагностической целью в биологических жидкостях определяют пигменты красного цвета – порфирины и желчные пигменты. Основное содержание порфиринов приходится на долю гемопротеинов. Гем представляет собой протопорфирин, связанный с двухвалентным железом. Желчными пигментами называют продукты распада гемоглобина, миоглобина и других хромпротеидов. К желчным пигментам относятся билирубины и уробилиноиды.

В организме человека в течение 1 часа разрушается примерно 100-200 млн эритроцитов. Основным источником билирубина в организме является непрерывно разрушающийся гемоглобин. Разрушение начинается в микросомальной фракции ретикулоэндотелиальной системы клеток печени (РЭС), селезенки и костного мозга. При распаде гемоглобина разрывается порфириновое кольцо гема, связь между ним, железом и белковой частью молекулы нарушается.

После отделения белковой части (глобина) красный гем расщепляется гемоксигеназой с помощью кислорода и НАДФН на ионы железа, оксид углерода и зеленый биливердин. Далее железо связывается белком плазмы трансферрином. Это железо поступает в тканевое депо, где используется для синтеза новых молекул гемоглобина. Затем биливердин восстанавливается биливердинредуктазой до оранжевого билирубина. Образовавшийся в клетках РЭС билирубин плохо растворим в воде, является токсическим веществом. При поступлении его с током крови в печень в гепатоцитах происходит его обезвреживание путем присоединения глюкуроновой кислоты. Билирубин в печени дважды конъюгируется с активированной глюкуроновой кислотой, при этом повышается его водорастворимость. Образование конъюгата катализируется УДФ-глюкуронозилтрансферазой – ферментом, находящимся в печени, а также в незначительных количествах в почках и слизистой кишечника.

В результате этого сложного энзиматического процесса билирубин становится растворимым в воде и выделяется в желчь. Прохождение билирубина через печеночную клетку - активный процесс, требующий затраты энергии в форме АТФ.

В печени пигмент 2 составляет 80% всех желчных пигментов. Остальная часть соответствует пигменту 1 (билирубин – моноглюкуронид). Синтез пигмента 2 может происходить только в здоровых печеночных клетках, поэтому билирубин – моноглюкуронид в значительном количестве обнаруживается при поражении паренхимы печени, сопровождающейся снижением активности ферментных систем.

Билирубин, попавший в желчь, поступает в кишечник, где под влиянием бактерий восстанавливается в мезобилирубиноген и уробилиноген. Большая

часть этих пигментов подвергается дальнейшему изменению, превращается в стеркобилиноген и выделяется с калом в виде стеркобилина. Небольшое его количество, всасываясь, попадает в большой круг кровообращения и выделяется с мочой. Некоторая часть уробилиногена всасывается и попадает в печень, где происходит ресинтез билирубина.

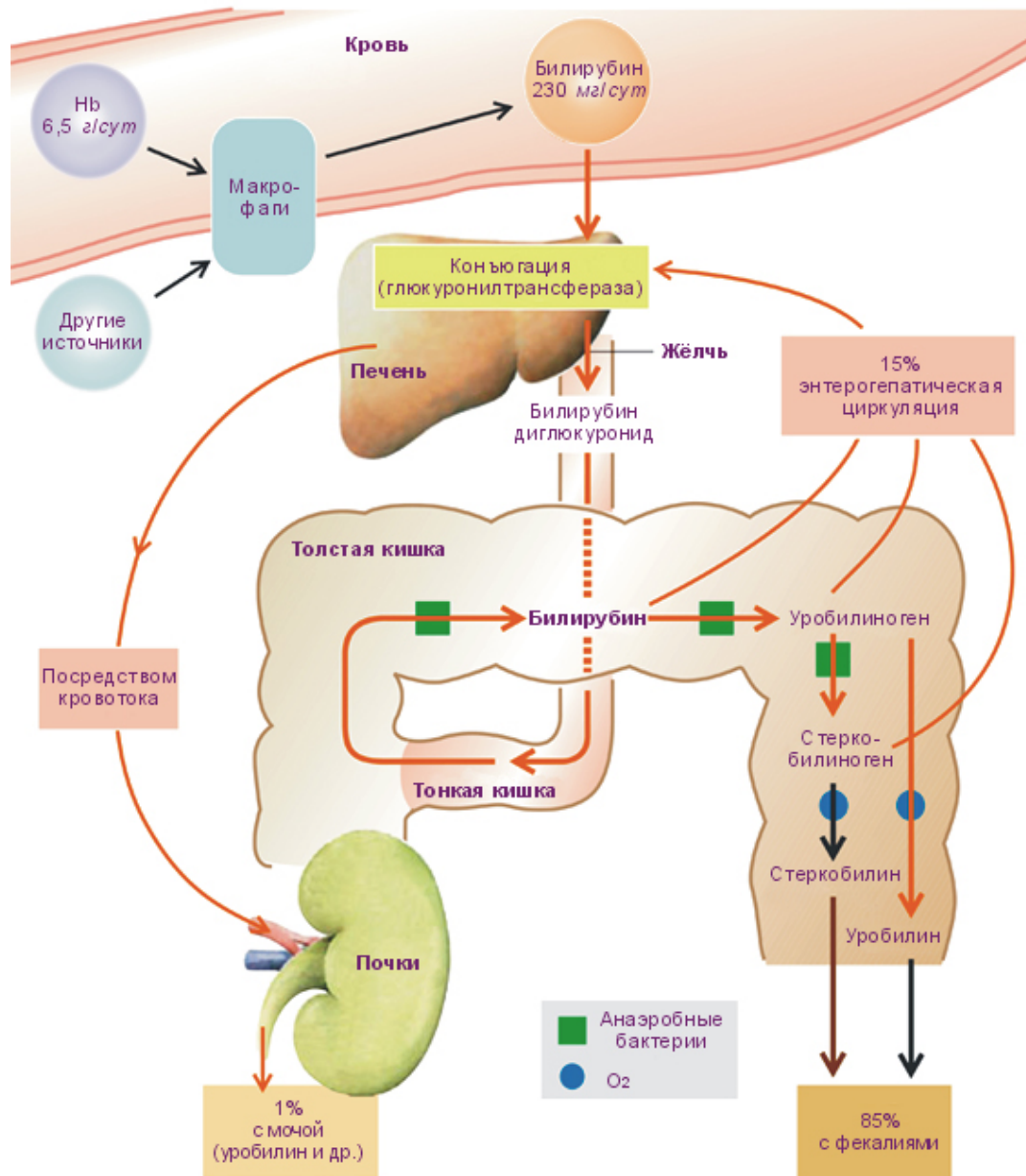


Рис. Схема метаболизма и выведения билирубина

В сыворотке крови содержится непрямой билирубин (свободный, неконъюгированный гемобилирубин), образованный при распаде эритроцитов и циркулирующий от места их распада до печени и прямой билирубин (холебилирубин, связанный, конъюгированный), образующийся в печени. Отличие между ними заключается в том, что непрямой билирубин связан только с белками (альбумином и в небольшой степени с глобулинами), а прямой - связан с глю-

куроновой кислотой в виде моно- и диглюкуронидов. Связывание пигмента с глюкуроновой кислотой это детоксикационный процесс. Комплексы связанного билирубина с фосфолипидами могут встречаться в сыворотке крови при длительной закупорке желчных путей. Их можно экстрагировать из сыворотки эфиром (эфирорастворимый билирубин). Свойства связанного билирубина обуславливают появление желтухи.

Наряду с гемоглобином, по аналогичному пути разрушаются группы гема и у других гемсодержащих белков (миоглобина, цитохрома, каталазы, пероксидазы). Однако их вклад в образование желчных пигментов составляет примерно 10-15%.

Повышенный уровень билирубина называется гипербилирубинемией. Билирубин диффундирует из крови в периферические ткани и окрашивает их в желтый цвет. Это особенно легко заметить на белой конъюнктиве глаза, в таком случае говорят о желтухе. Ее причиной могут быть:

- повышенное образование из эритроцитов билирубина (гемолитическая желтуха),
- нарушение выделения билирубина и продуктов его расщепления вследствие повреждений печени (гепатоцеллюлярная желтуха) из-за наследственного дефекта фермента или отравления организма;
- застой желчи (механическая) желтуха из-за желчных камней.
- неконъюгированный билирубин может проходить даже гематоэнцефалический барьер и приводить к поражению мозга (ядерная желтуха).

Для точного диагноза причин гипербилирубинемии важен анализ билирубина в плазме. Конъюгированный (прямой) билирубин от неконъюгированного (непрямого) можно отличить с помощью цветной реакции.

7.1. Унифицированный метод определения билирубина по диазореакции (метод Ендрассика-Грофа)

Принцип метода: Под воздействием HCl разрывается связь билирубина и образуется два дипиррола, которые диазотируются диазобензо сульфоновой кислотой с образованием розово-фиолетового азобилирубина. Связанный билирубин реагирует быстро, несвязанный билирубин реагирует после добавления кофеинового реактива.

Реактивы:

1. Кофеин.
2. Натрия бензоат.
3. Натрия ацетат 3-водный.
4. Кофеиновый реактив: 5 г кофеина, 7,5 г бензоата натрия, 125 г ацетата натрия растворяют в 90 мл воды, нагревают до 50-60 °С, хорошо перемешивают. После охлаждения доводят водой до 100 мл.
5. Натрия хлорид: 154 ммоль/л (изотонический раствор: 0,9 г хлорида натрия в 100 мл воды).

6. HCl концентрированная.

7. Сульфаниловая кислота.

8. Диазосмесь. Диазореактив 1: 5 г сульфаниловой кислоты растворяют при нагревании в 300-400 мл воды, прибавляют 15 мл концентрированной HCl, раствор доливают до 1 л. Диазореактив 2: натрия нитрит 5г/л: 0,5 г нитрита натрия в 100 мл воды. Перед работой смешивают 10 мл диазореактива 1 и 0,3 мл диазореактива 2.

9. Билирубин для построения калибровочного графика 800 мг/л.

10. Натрия карбонат, 0,1 моль/л: 10,6 г безводного Na_2CO_3 растворяют и доводят до 1 л водой.

11. Уксусная кислота, 4 моль/л; 25 мл ледяной уксусной кислоты доводят до 100 мл водой.

Ход определения: В три пробирки: две опытные и одну холостую вносят реактивы: по 0,5 мл сыворотки крови, кофеиновый реактив вносят в первую опытную пробирку для определения общего билирубина и в холостую пробу по 1,75 мл, во вторую опытную не вносят. Затем во вторую опытную (это определение связанного билирубина) прибавляют 1,75 мл и в холостую пробу 0,25 мл раствора хлорида натрия. Вносят диазосмесь в первую и во вторую опытные пробирки по 0,25 мл.

Для определения связанного билирубина измерение проводят спустя 5-10 минут после добавления диазосмеси, при длительном стоянии в реакцию вступает несвязанный билирубин. Для определения общего билирубина пробу для развития окраски оставляют на 20 минут, после чего измеряют на ФЭК при длине волны 500-560 нм (зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 0,5 см против воды. Из показателей, полученных при измерении общего и связанного билирубина, вычитают показатель холостой пробы.

Расчет производят по калибровочному графику.

Основной раствор билирубина: в колбе на 50 мл растворяют 40 мг билирубина в 30-35 мл 0,1 моль/л раствора карбоната натрия Na_2CO_3 и несколько раз перемешивают, доводят до 50 мл 0,1 моль/л раствором карбоната натрия.

Рабочий раствор билирубина: к 13,9 мл свежей негемолизированной сыворотки здорового человека добавляют 2 мл основного раствора билирубина и 0,1 мл 4 моль/л раствора уксусной кислоты. Хорошо перемешивают. Этот раствор содержит на 100 мг/л билирубина больше, чем сыворотка, взятая для приготовления раствора. Чтобы исключить при расчетах количество билирубина, содержащегося в этой сыворотке, при измерении из величин экстинкции калибровочных проб вычитают величины экстинкции соответствующих разведений компенсационной жидкости.

Для ее приготовления смешивают 13,9 мл той же сыворотки, 2мл 0,1 моль/л раствора карбоната натрия и 0,1 мл 4 моль/л раствора уксусной кислоты. Для построения калибровочного графика готовят ряд разведений с различным содержанием билирубина.

К полученным разведениям прибавляют по 1,75 мл кофеинового реактива и по 0,25 мл диазосмеси. При появлении помутнения можно добавить по 3 кап-

ли 30%-ного раствора едкого натра. Измерение проводят при тех же условиях, что и в опытных пробах, через 20 минут.

Из компенсационной жидкости готовят разведения, аналогичные калибровочным: в 5 пробирок прибавляют 0,05 мл; 0,1 мл; 0,15 мл; 0,2 мл; 0,25 мл рабочего раствора билирубина, добавляют с первой по пятую: 0,45 мл; 0,4 мл; 0,35 мл; 0,3 мл; 0,25 мл изотонического раствора хлорида натрия. В пробах количество билирубина соответствует с первой по пятую пробирки: 0,005; 0,01; 0,015; 0,02; 0,025 мг. Концентрация билирубина в сыворотке крови: 17,1 мкмоль/л; 34,2 мкмоль/л; 51,3 мкмоль/л; 68,4 мкмоль/л; 85,5 мкмоль/л.

Нормальные величины. В сыворотке крови содержится 8,5-20,5 мкмоль/л общего билирубина, из которого 75% приходится на долю свободного билирубина.

8. ГОРМОНЫ

Гормоны – это биологически активные вещества со строго специфическим и избирательным действием, способны повышать или понижать уровень жизнедеятельности организма, биологическое действие их сводится к обеспечению гомеостаза. Это вещества - регуляторы, выделяемые железами внутренней секреции в кровь и действующие гемокринно, т.е. дистантно, вдали от места синтеза на определенные клетки-мишени. На клеточном уровне действие гормонов выражается:

- в изменении активности специфичных для каждого гормона ферментов, переносчиков или их комплексов;
- в увеличении числа молекул определенных белков (ферментов, переносчиков различных веществ);
- в изменении проницаемости биологической мембраны по отношению к каким-либо веществам за счет активации канальных белков или встраивания в нее белков-переносчиков.

Клетки различных тканей организма выделяют также вещества-регуляторы, обладающие гормоноподобным эффектом, но действующие аутокринно – вблизи места их синтеза. Эти вещества называют тканевыми гормонами или парагормонами.

Эндокринная система тесно связана с нервной, они взаимосвязаны и подчинены друг другу. Это подчинение осуществляется как прямым иннервационным путем и через регуляцию гипоталамусом деятельности гипофиза, который воспринимает от гипоталамуса релизинг-факторы либерины и статины. С другой стороны гормоны также влияют на деятельность нервной системы. Так адреналин оказывает возбуждающее действие на нервные клетки, вызывая повышение содержания глюкозы в крови, способствуют обеспечению нейронов энергетическим материалом. Глюкокортикоиды способствуют действию норадреналина на мозг и сосуды.

В нормальном состоянии существует баланс между активностью эндокринных желез и состоянием нервной системы и ответом тканей-мишеней. Любое нарушение в каждом из этих звеньев приводят к отклонениям от нормы. Избыточная или недостаточная продукция гормонов является причиной различных заболеваний.

При переносе гормонов кровью многие гормоны соединяются с белками плазмы или форменными элементами, связывание носит обратимый характер, перенос в комплексной форме предохраняет их от преждевременной инактивации. Биологически активны только свободные формы гормонов. При повышении потребности в гормонах возможно их высвобождение из комплекса и переход в свободную форму. При нарушении выработки транспортных белков, при недостатке определенных форменных элементов возможно повышенное разрушение гормонов и чрезмерное их воздействие на ткани.

По химическому строению гормоны подразделяют на липофильные и гидрофильные, это имеет определенный биохимический смысл, так как отражает различные принципы действия этих биорегуляторов. Липофильные гормоны,

к которым относятся стероидные гормоны, йодтиронин, ретиноевая кислота это относительно низкомолекулярные вещества, плохо растворимые в воде. Они не накапливаются в железах, а секретируются в кровь сразу после завершения биосинтеза. При транспортировке в крови они связываются со специфическими плазматическими белками-переносчиками. Все липофильные гормоны действуют по общему механизму, то есть связываются с внутриклеточным рецептором и регулируют транскрипцию определенных генов.

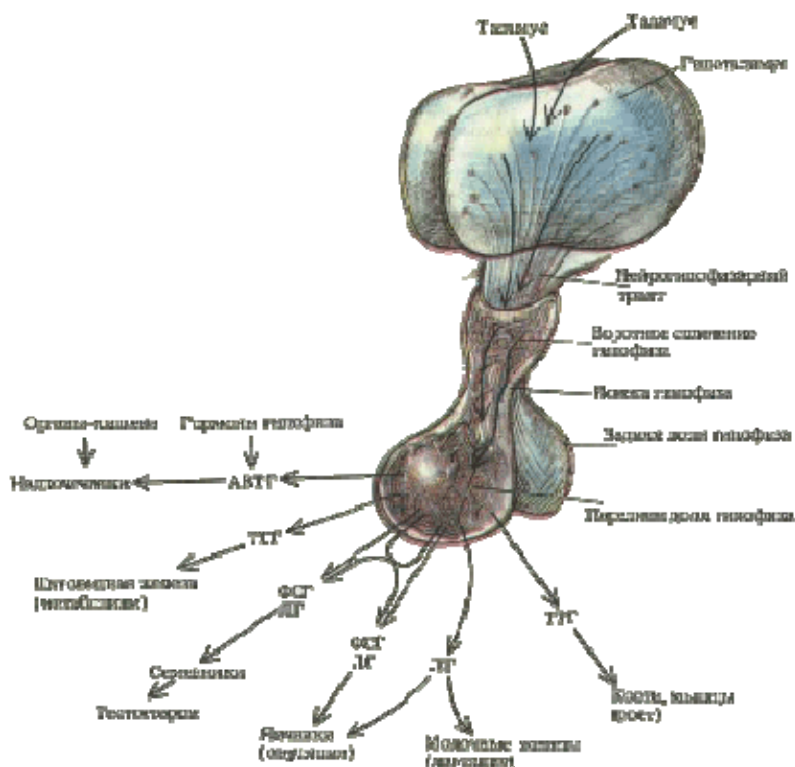


Рис. Пять важнейших клеточных систем, выделяющих гормоны нейроэндокринной системы

Наиболее важными **стероидными гормонами** позвоночных являются прогестерон, кортизол, альдостерон, тестостерон и эстрадиол, кальцитриол.

Прогестерон образуется в желтом теле, его концентрация в крови варьирует в соответствии с жизненным циклом, готовит слизистую матки к восприятию оплодотворенной яйцеклетки. После оплодотворения он начинает синтезироваться в плаценте, обеспечивая нормальное течение беременности.

Эстрадиол - синтезируется в яичниках, регулирует менструальный цикл. Он стимулирует пролиферацию клеток слизистой матки, отвечает за развитие вторичных женских половых признаков.

Тестостерон – синтезируется клетками Лейдига в семенниках и контролирует развитие и функцию половых желез, отвечает за развитие вторичных мужских половых признаков.

Кортизол – образуется в коре надпочечников, он участвует в регуляции белкового и углеводного обмена, стимулирует деградацию белков и конверсию аминокислот в глюкозу, способствуя повышению ее в крови.

Альдостерон – синтезируется в коре надпочечников, он влияет на функцию почек, где за счет активации натрий-калиевой АТФ-азы обеспечивает реасорбцию солей натрия и выведение из организма калия и таким образом повышает кровяное давление.

Кальцитриол – синтезируется в почках, производное витамина Д, его предшественник синтезируется в коже под действием УФ света. Стимулирует всасывание кальция в желудочно-кишечном тракте и включение кальция в костную ткань.

Йодтиронины – образуется в организме из аминокислоты тирозина, являясь производным аминокислоты, обладают липофильными свойствами. В положении ароматических колец имеют йод.

Тироксин – образуется в щитовидной железе, он повышает скорость метаболизма и стимулирует развитие эмбриона.

Гидрофильные гормоны и гормоноподобные вещества состоят из аминокислот, являются белками или пептидами. Они депонируются в больших количествах в клетках желез внутренней секреции и поступают в кровь по мере необходимости без участия переносчиков. Это самая большая группа сигнальных веществ, образуется в организме по обычному механизму белкового синтеза.

Адреналин - гормон коры надпочечников, где он образуется из тирозина, его выброс находится под влиянием центральной нервной системы. Он воздействует на кровеносные сосуды, сердце и основной обмен. Адреналин сужает сосуды и тем самым повышает кровяное давление, повышает сердечную функцию, ускоряет расщепление гликогена до глюкозы в печени и мышцах и расширяет бронхи.

Тиролиберин – нейrogормон гипоталамуса, стимулирует секрецию клетками гипофиза тиреотропного гормона.

Тиреотропин и родственные гормоны лютеинизирующий гормон, фолликулостимулирующий гормон являются представителями гормонов передней доли гипофиза. Тиреотропин стимулирует синтез и выделение тироксина клетками щитовидной железы.

Инсулин – образуется В- клетками поджелудочной железы и секретируется при повышении уровня глюкозы, влияет на углеводный обмен. Он индуцирует синтез *de novo* гликогенсинтетазы, а также некоторых ферментов гликолиза. Одновременно инсулин подавляет синтез ключевых ферментов глюконеогенеза.

Глюкагон – синтезируется А- клетками островков Лангерганса поджелудочной железы, секретируется в кровь при пониженном уровне глюкозы. Его основная функция состоит в повышении уровня глюкозы (гипергликемический эффект) за счет расщепления гликогена в печени. По своему действию он является антагонистом инсулина.

Биогенные амины – гистамин, серотонин, мелатонин образуются путем декарбок্সилирования аминокислот, содержатся в основном в тучных клетках

соединительной ткани и базофильных гранулоцитах крови, а серотонин в тромбоцитах, поэтому результаты их определения в цельной крови зависят от количества соответствующих клеток.

Гистамин освобождается при анафилактических и аллергических реакциях под действием либераторов, таких как тканевые гормоны, аллергены и лекарственные препараты. Через H1 рецептор гистамин стимулирует сокращение гладких мышц бронхов, расширяет капилляры и повышает их проницаемость. Через H2 рецептор гистамин замедляет сердечный ритм и стимулирует образование соляной кислоты в желудочно-кишечном тракте. В центральной нервной системе гистамин действует как нейромедиатор.

Серотонин образуется в клетках желудочно-кишечного тракта. Основным метаболитом серотонина – 5-оксииндолилуксусная кислота - выводится с мочой в виде парных соединений с серной и глюкуроновой кислотами. Информативно повышение содержания серотонина в плазме и оксииндолилуксусной кислоты в моче при карциноидах кишечника или легких.

Гистамин и серотонин обычно определяют после разрушения клеток, лучше всего путем замораживания и оттаивания. Оба вещества способны реагировать с о-фталальдегидом с образованием флюорофоров, но для серотонина эта реакция идет в кислой среде, а для гистамина – в щелочной.

8.1. Метод совместного определения гистамина и серотонина

Принцип метода: Гистамин содержится в лейкоцитах, серотонин – в тромбоцитах, поэтому оба вещества определяют в цельной крови после осаждения белков хлорной кислотой. Анализ завершается измерением флюоресценции продуктов конденсации гистамина с ортофталальдегидом, а серотонина с нингидридом.

Реактивы:

1. Калия оксалат, раствор 13,4 г/л.
2. Хлорная кислота (HClO₄), 1Н раствор.
3. Натр едкий, растворы 1Н и 5Н.
4. Натр едкий, 0,1Н раствор, насыщенный поваренной солью. К 0,1Н NaOH добавляют кристаллы поваренной соли в таком количестве, чтобы на дне все время был осадок.
5. Натрия хлорид.
6. HCl, 0,1 н раствор.
7. Фосфатный буфер рН 8,0, концентрации 1/15 моль/л.
8. Хлороформ.
9. Бутиловый спирт нормальный (п-бутанол).
10. Бутанол- хлороформенная смесь. Смешивают 150 мл п-бутанола и 100 мл хлороформа.
11. Кислота фосфорная, 1,5 моль/л: 17,3 мл доводят до 100 мл.
12. Ортофталальдегид, раствор 1 г/л в абсолютном метаноле.
13. Нингидрид, раствор 100 ммоль/л. Растворяют 180 мг нингидрина в 10 мл воды.

14. Калибровочные растворы гистамина и нингидрина, содержащие по 100 мг/л в 0,01Н HCl.

Ход определения: При взятии крови добавляют 1,34%-ный раствор оксалата натрия. К 1 мл крови приливают 1 мл воды и 1 мл 1Н хлорной кислоты, перемешивают и через 30 мин центрифугируют. К 2 мл надосадочной жидкости добавляют 0,2 мл 5Н NaOH, 1 г порошка хлорида натрия и 4 мл бутанол-хлороформенной смеси, встряхивают 3 мин, а затем центрифугируют для разделения слоев. Водную фазу удаляют, а к органической добавляют 2 мл 0,1Н NaOH, насыщенного хлоридом натрия, встряхивают и центрифугируют, 3,5 мл органической фазы переносят в другие пробирки, где экстрагируют 2,5 мл 0,1Н HCl. После разделения фаз из кислотной (верхней) фазы отбирают порции по 1 мл, которые используют для определения гистамина и серотонина.

Для определения гистамина к 1 мл кислотной фазы добавляют 0,2 мл 1Н NaOH и 0,1 мл раствора ортофталового альдегида в метаноле. Через 4 мин приливают 0,1 мл 1,5 М фосфорной кислоты, доводят объем до 5 мл и измеряют флюоресценцию при длине волны 470 нм.

Для определения серотонина к 1 мл кислотной фазы добавляют 1 мл фосфатного буфера рН 8,0 и 0,2 мл 0,1М раствора нингидрина. Смесь инкубируют 30 мин при 75 °С, затем еще 1 ч. Выдерживают при комнатной температуре, доводят объем до 5 мл и измеряют флюоресценцию в области 490 нм.

Для калибровки берут пробы, содержащие 0,05 и 0,1 мкг серотонина и гистамина соответственно, доводят водой до объема 1,5 мл и приливают 0,5 мл 1Н хлорной кислоты. В холостой опыт берут 1,5 мл воды и 0,5 мл 1Н хлорной кислоты. Калибровочную и холостую пробы экстрагируют бутанол-хлороформенной смесью после добавления 0,2 мл 5Н NaOH и обрабатывают так же, как и опытные пробы. Свечение холостой пробы вычитают из результатов, полученных для опытных и калибровочных проб.

Расчет проводят по калибровочному графику, по данным которого рассчитывают содержание гистамина или серотонина в пробе. Чтобы узнать содержание в 1 мл цельной крови, полученные результаты умножают на $\frac{3}{2}$, так как в опыт взято 2 мл хлорного экстракта крови из общего объема 3 мл.

9. ОЦЕНКА НАДЕЖНОСТИ ЛАБОРАТОРНЫХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Воспроизводимость результатов это соответствие результатов определений в одном и том же материале. Она определяется степенью разброса результатов. Воспроизводимость определяют на разных уровнях концентрации – нормальном и патологическом. Это позволяет более полно характеризовать воспроизводимость метода на всем диапазоне измеряемых концентраций. Чем меньше коэффициент вариации, тем выше воспроизводимость результатов, получаемых тем или иным методом.

Правильность результатов – это соответствие среднего значения результатов повторных определений одного и того же материала должной величины. Правильность метода определяется правильностью результатов, полученных этим методом, и зависит от наличия систематических погрешностей метода, которые могут быть обусловлены рядом причин: неспецифичностью метода или неправильным способом построения калибровочной кривой, использованием калибровочного материала недостаточной степени чистоты, неправильной постановкой холостой пробы и т.д.

Статистическим критерием правильности является средняя арифметическая и степень ее отклонения от должного значения. Правильность результатов зависит от способа добавки анализируемого вещества, от способа смешивания проб, от возможности сравнения данного метода с другими, что позволяет определить общую систематическую погрешность метода. Оптимальным для этих целей является применение референтного (эталонного) метода. Референтный метод служит для сравнения методов при оценке аналитической надежности унифицированных и других методов.

Правильность метода оценивается на всем диапазоне измеряемых концентраций, поэтому рекомендуется исследовать образцы с низкими, нормальными и повышенными концентрациями вещества. Сравнение методов можно проводить на контрольном материале и на биологическом, полученном от больных и здоровых людей.

Специфичность – это способность метода измерять лишь тот компонент или те компоненты, для определения которых он предназначен. Низкая специфичность приводит к получению неправильных результатов.

Чувствительность – определяется способностью выявлять наименьшие различия между двумя концентрациями исследуемого вещества. Нижний предел чувствительности метода – это концентрация исследуемого вещества, которая соответствует наименьшему результату определения, статистически достоверно отличающемуся от показателей холостой пробы. Нижний предел чувствительности метода может быть охарактеризован количественно.

Допустимые погрешности результатов лабораторных исследований – общая погрешность результатов анализа, получаемая количественными аналитическими методами, зависит от систематической погрешности, характеризующей неправильность, и случайной погрешности, характеризующей вари-

цию (разброс). Для выявления допустимой погрешности должна быть установлена вариация метода, что позволяет реально оценить разброс результатов, получаемых тем или иным методом.

ВОПРОСЫ ДЛЯ КОНТРОЛЯ

1. Причины и патология клеточных органелл (мембрана, митохондрии, рибосомы, ЭПР, аппарат Гольджи, пероксисомы).
2. Оценка надежности лабораторных методов исследования: воспроизводимость, правильность, специфичность, чувствительность, допустимые погрешности результатов.
3. Гомеостаз. Состав крови. Осмотическое, онкотическое давление. Электролитный состав. Роль белков плазмы крови.
4. Воспаление, причины, фазы воспаления (альтерация, экссудация, пролиферация). Регуляция воспаления.
5. Принципы колоночной хроматографии, возможности метода. Ультрацентрифугирование, спиртовое осаждение.
6. Основные свойства ферментов и их характеристика.
7. Ферменты абсолютной и относительной специфичности (примеры).
8. Одно- и двухкомпонентные ферменты, их особенности строения. Активные, субстратные, аллостерические центры.
9. Мультиэнзимные комплексы - метаболонны, локализация ферментов в клетке.
10. Множественные молекулярные формы. Причины их образования.
11. Функциональные и нефункциональные ферменты сыворотки крови. Энзимопатии. Причины их возникновения.
12. Свойства диагностически важных ферментов: алкогольдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа. Значение определения.
13. Методы определения ферментов.
14. Значение определения аланиновой и аспарагиновой трансфераз. Коэффициент Деритиса.
15. Креатинкиназа, общая и ее изоферменты. Значение определения.
16. Щелочная и кислая фосфатазы, амилаза. Значение определения.
17. Общие правила определения активности ферментов сыворотки крови. Единицы активности ферментов.
18. Липиды плазмы крови. Жирные кислоты, моно-, ди-, триглицериды, фосфолипиды.
19. Лецитины (холинсодержащие фосфолипиды). Кефалины (фосфатидилэтанолламины), фосфатидилсерин и их комплексы.
20. Гликолипиды: цереброзиды, ганглиозиды, сульфатиды. Строение, роль в организме.
21. Стероиды, холестерин, эфиры холестерина. Значение его в организме.
22. Плазменные липопротеиды. Строение, отличие от мембранных липопротеидов.
23. Процесс образования липопротеидов в кишечнике и в плазме крови.
24. Апопротеины, их классификация. Выполняемая функция.
25. Нарушения обмена липидов, липопротеидов. Первичные гиперлипидемии I типа, IIa и IIb типа. Особенности катаболизма.

26. Первичные нарушения липопротеинов. III тип гиперлипопротеидемии (семейная), IV тип, V тип. Синдром долголетия.
27. Гормоны центральных и периферических желез внутренней секреции. Липофильные гормоны, их рецепторы. Регуляторное действие.
28. Гидрофильные гормоны, классификация, их рецепторы. Биологический эффект гидрофильных гормонов.
29. Три типа рецепторов гидрофильных гормонов. Вторичные посредники. Биологический ответ клетки.
30. Гормональные исследования в практике. Диссекреторные и диссенситивные нарушения гормональных расстройств.
31. Глюкоза (гексоза) – главный субстрат тканевого дыхания. Алиментарная, экстраинсулярная и инсулярная гипергликемия.
32. Регуляция уровня глюкозы в крови (нервная, эндокринная). Глюконеогенез.
33. Инсулин, проинсулин. Физиологические эффекты, механизм действия.
34. Сахарный диабет: инсулинзависимый и инсулиннезависимый.
35. Современная диагностика сахарного диабета. Одновременное исследование глюкозы, определение С-пептида, гликозилированного гемоглобина, альбумина, кетоновых тел, триглицеридов.
36. Белки крови, их функция. Гипо- и гиперпротеинемии.
37. Электрофорез белков крови на бумажном носителе. Характеристика. Значение исследования. Констелляционные типы.
38. Белки крови при электрофорезе в полиакриламидном геле (ПААГ). Характеристика альбумина, белков системы GC, их роль в организме.
39. С-реактивный белок, его характеристика. Значение определения.
40. Интерферрон, лизоцим, гаптоглобин. Характеристика. Значение их определения.
41. Система комплементарных белков. Классический и альтернативный путь активации. Значение определения.
42. Церулоплазмин – реактант острой фазы, строение, функции, значение определения.
43. Железосодержащие белки: трансферрин, гемоглобин, миоглобин, ферритин. Значение их определения.
44. Криоглобулины, альфа -2-макроглобулин – ингибитор протеаз. Значение их определения.
45. Нейтральные гликопротеины (PAS- положительные) и кислые мукополисахариды. Значение исследования.
46. Классификация антигенов, связанных с опухолями.
47. Характеристика некоторых онкомаркеров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Азизова О.А., Пирязев А.П., Москвина С.Н. и др. Метод определения окисляемости белков сыворотки и плазмы крови // Биомедицинская химия. - 2007. - Т. 53, № 1. - С. 99-106.
2. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия: Учебник. – М., Медицина, 2004.
3. Биохимия: Учебник / Под ред. Е.С. Северина. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. - 784 с.
4. Биохимические основы жизнедеятельности человека: Учебное пособие для студентов / Под ред. Ю.Б. Филиппович и др. - М.: Гуманит, Изд. центр ВЛАДОС, 2005. - 407 с.
5. Геннис Р. Биомембраны: Молекулярная структура и функции. - М.: Мир, 2002. – 624 с.
6. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика: М.: Мир. 2000. – 543 с.
7. Клиническая биохимия: учебное пособие / под ред. В.А.Ткачука. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 264 с.
8. Климов А.Н., Никульчева Н.Г. Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения: Руководство для врачей. - Санкт-Петербург, 1999. - 501 с.
9. Кольман Я., Рем К.Г. Наглядная биохимия. - М.: Мир. - 2000 – 469 с.
10. Комаров Ф.И., Коровкин Б.Ф., Меньшиков В.В. Биохимические исследования в клинике. – Элиста: АПП Жжангар, 1998. - 250 с.
11. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека: в 2-х томах. - М.: Мир.
12. Молекулярная клиническая диагностика. Методы. - М.: Мир, 2003. – 558 с.
13. Покровский А.В., Зотиков А.Е., Калинин Н.Л. Загадки атеросклероза. - М.: Багира, 1997. - 123 с.
14. Рослый И.М., Абрамов С.В., Покровский В.И. Ферментемия – адаптивный механизм или маркер цитолиза // Вестник Российской Академии Медицинских наук. – 2002. - № 8. - С. 3-8.
15. Цыганенко А.Я., Жуков В.И., Мясоедов В.В., Завгородний И.В. Клиническая биохимия: Учебное пособие для студентов медицинских вузов. - М.: Триада Х, 2002. - 504 с.

БОЛЬШОЙ ПРАКТИКУМ «БИМЕДИЦИНСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ГОМЕОСТАЗА ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА»

Программа

1. Оценка аналитической надежности лабораторных методов исследования. Принципы унификации и стандартизации лабораторных методов исследования.

1. Основные правила проведения лабораторных исследований: принципы приготовления реактивов и проверка их чистоты. Взвешивание, центрифугирование.
2. Единицы измерения в лабораторной диагностике.
3. Оценка надежности лабораторных методов исследования: воспроизводимость, правильность, статистическая оценка правильности результатов, специфичность, чувствительность.
4. Принципы определения допустимых погрешностей результатов исследований.
5. Контроль качества лабораторных исследований: внутрिलाбораторный, межлабораторный контроль качества.

2. Белковый гомеостаз. Белки плазмы крови, диагностическое значение.

1. Методы определения общего белка крови, его значение.
2. Белковые фракции. Основные методы фракционирования белков сыворотки крови.
3. Метод электрофоретического разделения на пленках из ацетата целлюлозы.
4. Разделение белков сыворотки крови методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ).
5. Диагностическое значение определения некоторых индивидуальных белков сыворотки крови. Определение гаптоглобина.
6. Осадочные пробы: тимоловая проба, сулемовая проба, проба Вельтмана.

3. Активность ферментов и изоферментов. Диагностическое значение их определения.

1. Механизмы гиперферментемии при патологических состояниях, неспецифические принципы повышения активности ферментов.
2. Методы определения активности ферментов.
3. Метод определения аспарагиновой трансаминазы (АСТ) с динитрофенилгидразином.
4. Метод определения аланиновой трансаминазы (АЛТ) в сыворотке и плазме крови с динитрофенилгидразином.
5. Метод определения щелочной фосфатазы.
6. Определение активности амилазы.
7. Определение активности липазы.
8. Значение определения креатинкиназы (КК).

4. Диагностическое значение определения отдельных показателей углеводов и родственных соединений.

1. Определение содержания галактозы как тест на нарушение углеводного обмена при галактоземии.
2. Значение определения гликогена при острых и хронических гепатитах.
3. Определение концентрации глюкозы, значение показателя при сахарном диабете.
4. Углеводные компоненты гликопротеидов: нейраминовая и сиаловые кислоты, связанные с белком гексозы.
5. Определение содержания лактата (молочной кислоты), пирувата.
- 5. Диагностическое значение определения показателей липидного обмена.**
 1. Определение общих липидов в сыворотке крови по реакции сульфифосфованилиновым реактивом. Диагностическое значение.
 2. Определение в плазме крови триглицеридов по методу Карлсона. Диагностическое значение.
 3. Определение общих фосфолипидов в сыворотке крови.
 4. Определение общего, свободного и связанного холестерина. Диагностическое значение.
 5. Определение неэстерифицированных (свободных) жирных кислот в плазме крови.
 6. Значение фракционирования липопротеидов полиакриламидном геле: подготовка камеры к работе, полимеризация геля, нанесение липопротеидов на гель, проведение электрофореза, обработка геля, характеристика липидных фракций.
- 6. Диагностическое определение биогенных аминов: гистамина и серотонина.**
- 7. Определение низкомолекулярных азотистых веществ.**
 1. Мочевина.
 2. Креатин.
 3. Мочевая кислота.
- 8. Значение определения пигментов.**
 1. Определение билирубина.
- 9. Значение определения гормонов.**
- 10. Определение онкомаркеров.**