



**ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ПРОФЕССИОНАЛЬНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«СЕВЕРНО - ОСЕТИНСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ КОЛЛЕДЖ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РСО-АЛАНИЯ**

**Методическая разработка практических занятий
по ПМ 03 «Проведение лабораторных биохимических
исследований»**

**для студентов
специальности 31.02.03 «Лабораторная диагностика»**

Преподаватель -----Худиева Э.М.

Владикавказ 2023-2024 г.

Содержание

1-4зан.Организация работы биохимической лаборатории. Обмен веществ и энергии ,гормональная регуляция метаболизма в организме человека.

5-7зан.Исследование биохимических изменений при нарушении обмена углеводов.

8-10зан.Особенности проведения контроля качества лабораторных биохимических исследований.

11-14зан. Исследование показателей обмена белков.

15-17зан.Проведение лабораторных биохимических исследований по определению показателей липидного обмена

18-21зан. Проведение лабораторных биохимических исследований по определению показателей водно-минерального обмена, кислотно-основного состояния.

22-26зан.Проведение лабораторных биохимических исследований по определению активности ферментов, проведение коагулологических исследований.

Пояснительная записка

Цель и планируемые результаты освоения профессионального модуля

В результате изучения профессионального модуля студент должен освоить основной вид деятельности ВД 2 Выполнение клинических лабораторных исследований первой и второй категории сложности и соответствующие ему общие компетенции и профессиональные компетенции:

Перечень общих компетенций

Код	Наименование общих компетенций
ОК 1.	Выбирать способы решения задач профессиональной деятельности применительно к различным контекстам
ОК 2.	Использовать современные средства поиска, анализа и интерпретации информации, и информационные технологии для выполнения задач профессиональной деятельности
ОК 3.	Планировать и реализовывать собственное профессиональное и личностное развитие, предпринимательскую деятельность в профессиональной сфере, использовать знания по финансовой грамотности в различных жизненных ситуациях
ОК 4.	Эффективно взаимодействовать и работать в коллективе и команде
ОК 5.	Осуществлять устную и письменную коммуникацию на государственном языке Российской Федерации с учетом особенностей социального и культурного контекста
ОК 6.	Проявлять гражданско-патриотическую позицию, демонстрировать осознанное поведение на основе традиционных общечеловеческих ценностей, в том числе с учетом гармонизации межнациональных и межрелигиозных отношений, применять стандарты антикоррупционного поведения
ОК 7.	Содействовать сохранению окружающей среды, ресурсосбережению, применять знания об изменении климата, принципы бережливого производства, эффективно действовать в чрезвычайных ситуациях
ОК 8.	Использовать средства физической культуры для сохранения и укрепления здоровья в процессе профессиональной деятельности и поддержания необходимого уровня физической подготовленности
ОК 9.	Пользоваться профессиональной документацией на

	государственном и иностранном языках
--	--------------------------------------

Перечень профессиональных компетенций

Код	Наименование видов деятельности и профессиональных компетенций
ВД 2	Выполнение клинических лабораторных исследований первой и второй категории сложности
ПК 2.1.	Выполнять процедуры преаналитического (лабораторного) этапа клинических лабораторных исследований первой и второй категории сложности
ПК 2.2.	Выполнять процедуры аналитического этапа клинических лабораторных исследований первой и второй категории сложности
ПК 2.3.	Выполнять процедуры постаналитического этапа клинических лабораторных исследований первой и второй категории сложности

В результате освоения профессионального модуля студент должен

Владеть навыками	<ol style="list-style-type: none"> 1. приема биоматериала; 2. регистрации биоматериала в журнале и (или) в информационной системе; 3. маркировке, транспортировке и хранению биоматериала; 4. отбраковке биоматериала, не соответствующего установленным требованиям и оформление отбракованных проб; 5. подготовке биоматериала к исследованию (пробоподготовка); 6. использовании медицинских, лабораторных информационных систем; 7. выполнении санитарных норм и правил при работе с потенциально опасным биоматериалом; 8. выполнение правил санитарно-противоэпидемического и гигиенического режима в лаборатории; 9. определения показателей белкового, липидного, углеводного и минерального обменов, активности ферментов, белков острой фазы, показателей гемостаза, проведение внутрилабораторного контроля
------------------	---

	качества.
Уметь	<ol style="list-style-type: none"> 1.транспортировать биоматериал в соответствии с требованиями нормативных документов; 2.осуществлять подготовку биоматериала к исследованию; 3.регистрировать биоматериал в журнале и (или) в информационной системе; 4.отбраковывать биоматериал, не соответствующий утвержденным требованиям; 5.выполнять правила преаналитического этапа (взятие, хранение, подготовка, маркировка, транспортировка, регистрация биоматериала); 6.применять на практике санитарные нормы и правила; 7.дезинфицировать использованную лабораторную посуду, инструментарий, средства защиты; 8.стерилизовать использованную лабораторную посуду, инструментарий, средства защиты; 9.регистрировать неполадки в работе используемого оборудования в контрольно-технической документации; 10.готовить биологический материал, реактивы, лабораторную посуду, оборудование; 11.заполнять и вести медицинскую документацию, в том числе в форме электронного документа; 12. подготовить материал к биохимическим и коагулологическим исследованиям; 13.определять биохимические анализы крови, мочи, ликвора различными лабораторными методами исследования; 14.работать на биохимических анализаторах; 15.проводить коагуляционные тесты; 16.проводить контроль качества биохимических лабораторных исследований; 17.интерпретировать биохимические показатели крови в лабораторном бланке биохимического анализатора; 18.проводить количественную оценку результатов исследования путем сравнения полученного

	<p>результата с калибровочной кривой; 19.проводить предварительные исследования с применением иммунохроматографических экспресс-тестов.</p>
Знать	<ol style="list-style-type: none"> 1.правила и способы получения, консервирования, хранения, транспортировки и обработки биоматериала для лабораторных исследований; 2. критерии отбраковки биоматериала; 3. санитарные нормы и правила для медицинских организаций; 4.принципы стерилизации лабораторной посуды, инструментария, средств защиты; 5. методики обеззараживания отработанного биоматериала; задачи, структуру, оборудование, правила работы и технику безопасности ВКДЛ; 6. правила взятия образца биологического материала на лабораторные исследования; 7. правила работы в медицинских, лабораторных информационных системах; 8. особенности подготовки пациента к биохимическим лабораторным исследованиям; 9. основные методы и диагностическое значение биохимических исследований крови, мочи, ликвора; 10. основы гомеостаза, биохимические механизмы сохранения гомеостаза; 11. нормальную физиологию обмена белков, углеводов, липидов, ферментов, гормонов, водно-минерального, кислотно-основного состояния; 12. причины и виды патологии обменных процессов; 13. основные методы исследования обмена веществ, гормонального профиля, ферментов; 14. принципы контроля качества коагулологических исследований; 15. контрольные материалы для контроля коагулологических исследований; 16. принципы коагуляционных тестов; 17. правила оформления медицинской документации, в том

	числе в форме электронного документа; 18. принципы ведения документации, связанной с поступлением в лабораторию биоматериала.
--	--

Оценка за работу на практическом занятии складывается из оценки следующих видов работы:

- организация рабочего места
- наличие и правильность записей по самоподготовке в рабочей тетради
- выполнение вводного контроля
- ответы на занятии: степень подготовленности, активность при обсуждении и правильность ответов
- выполнение самостоятельной работы: соблюдение правил по ТБ и ТЛР, выполнение исследования в соответствии с рекомендованным алгоритмом, правильность выполнения анализа и выполнение отчета о проделанной работе.

Методические указания для преподавателей по этапам занятия.

№	Название этапа	Краткое описание деятельности		Цель	Время	Оснащение
		преподавателя	студентов			
1	Организация занятия	Отмечает отсутствующих. Уточняет готовность студентов к занятию	Готовят лекционные тетради	Мобилизовать студентов на работу	1 мин	Журнал успеваемости посещаемости и группы
2	Формирование темы и ее обоснование	Сообщает тему, акцентирует внимание на ее значимости	Записывают в тетрадь тему, слушают обоснование	Раскрыть теоретическую значимость темы	2 мин	Тетрадь для лекционных занятий
3	Определение цели занятия	Сообщает цели занятия	Записывают цели занятия	Показать студентам конечный результат	2 мин	Тетрадь для лекционных занятий
4	Сообщение плана занятия	Сообщает план занятия	Записывают план занятия	Конкретизировать	5 мин	Тетрадь для лекционных

				внимание студентов		занятий
5	Изложение нового учебного материала	Излагает новый материал учащимся в соответствии с планом	Записывают новый материал в соответствии с планом	Углубление и расширение знаний студентов по теме	60-70 мин	Тетрадь, таблицы, слайды, мультимедийная установка
6	Закрепление материала	Задаёт вопросы по разделам лекции	Слушают вопросы и отвечают на них	Контроль уровня усвоения нового материала	5 мин	Тетрадь, таблицы
7	Подведение итогов занятия	Подводит итоги занятия, отмечает достижение результатов	Слушают вопросы и отвечают на них	Контроль уровня усвоения нового материала	2 мин	Тетрадь, таблицы
8	Домашнее задание	Называет объем материала для подготовки домашнего задания	Записывают в тетрадь	Подготовка студентов к семинарскому занятию	3 мин	Тетрадь

Раздел 1. Организация работы биохимической лаборатории. Обмен веществ и энергии, гормональная регуляция метаболизма.

Практическая работа №1-2 Изучение организации биохимической лаборатории. Техника безопасности при работе в КДЛ.Метаболизм.

Формируемые профессиональные компетенции: ПК 2.1.

Учебные цели (знать, уметь, владеть навыками):

ЗНАТЬ	УМЕТЬ	ВЛАДЕТЬ НАВЫКАМИ
1-8,10	1-12	1-8

Воспитательная цель: привитие умений и навыков учебной работы и коллективного труда. Формирование целостного миропонимания и современного научного мировоззрения, основанного на признании приоритетов общечеловеческих ценностей: гуманности, милосердия, сострадания, уважения к жизни и здоровью человека .

Развивающая цель: формирование навыков самообразования, самореализации личности и развитие речи, мышления, памяти .

Межпредметные связи: ОПД 03 Химия, ОПД 16 Физико-химические методы исследований и техника лабораторных работ, ОПД 02 Анатомия.

Вопросы для подготовки к занятию

1. Значение биохимических методов исследования для диагностики и контроля за лечением больных
2. Принципы и основы тактики биохимических исследований
3. Основные правила проведения биохимического анализа
4. Биологические материалы из организма человека ,которые могут быть подвергнуты клинико-биохимическим исследованиям.
5. Взятие и хранение материала для биохимических исследований
6. Прием и регистрация биоматериала для биохимических исследований
7. Правила работы в биохимической лаборатории
8. Основные правила техники безопасности при работе в лаборатории
9. Перечислить признаки живой материи.
10. Материальные основы живой материи
11. Метаболизм, принципы метаболизма. Этапы метаболизма.
12. Анаболизм и катаболизм.

Список понятий для усвоения темы

Метаболизм,анаболизм,катаболизм,гомеостаз,унификация,конвергенция.

Техника безопасности при работе в биохимической лаборатории

Приступая к работе в биохимической лаборатории, каждый студент должен ознакомиться с правилами техники безопасности и информацией о технике лабораторных работ. Меры охраны труда являются обязательными и соблюдение их необходимо при всех видах работ в лаборатории.

При работе в лаборатории необходимо соблюдать правила обращения с:

1. Биологическим материалом

1.1. При работе с биологическим материалом (кровь, моча, слюна, желудочный сок, спинномозговая жидкость, гомогенаты тканей и другие) необходимо соблюдать максимальную аккуратность и осторожность. Работу следует выполнять в перчатках. Это необходимо для исключения передачи различных вирусных, инфекционных болезней (СПИД, сифилис, гепатит и другие).

После выполнения работы тщательно вымыть руки.

2. Реактивами

2.1. На всех склянках с реактивами должны быть этикетки с указанием названия реактива и его концентрации. Склянки плотно закупорены.

2.2. Следует соблюдать особую осторожность при обращении с ядовитыми, огнеопасными веществами, с концентрированными кислотами и щелочами. Работать с такими реагентами следует под включенной вытяжкой.

2.3. Реактивы необходимо предохранять от загрязнения.

2.4. Реактивы следует расходовать экономно.

2.5. Недопустимо набирать реагенты в мерные пипетки ртом.

3. Электрическими приборами

3.1. Измерительные приборы (фотоэлектроколориметры, спектрофотометры и другие) должны быть заземлены, технически исправны.

3.2. Водяные термостаты, сухожаровые шкафы, центрифуги должны быть в рабочем состоянии, заземлены. Крышки этих аппаратов во время работы прибора должны быть закрыты.

3.3. Необходимо следить за тем, чтобы в водяном термостате всегда была вода.

4. Центрифугами в лабораторном практикуме

4.1. В центрифугу помещают парное (четное) количество уравновешенных пробирок

4.2. Ось симметрии между двумя пробирками должна проходить через центр ротора

4.3. Проверяют, чтобы центрифужная камера была закрыта крышкой

4.4. Устанавливают необходимую скорость вращения ротора центрифуги

4.5. Включают центрифугу и наблюдают за ее работой в течение всего времени центрифугирования

4.6. Во время работы центрифуги запрещается открывать крышку камеры

4.7. После отключения центрифуги необходимо дать возможность ротору остановиться, запрещается тормозить ротор рукой

4.8. После остановки ротора центрифуги достаньте пробирки из ячеек ротора и продолжите работу на своем рабочем месте

5. Газовыми и другими нагревательными приборами

5.1. Нельзя нагревать посуду из простого химического стекла на открытом пламени

5.2. Посуда с нагреваемым содержимым должна быть закреплена специальным держателем над нагреваемой поверхностью

5.3. Огнеопасные вещества нельзя нагревать на открытом пламени, а только на водяной бане

5.4. При работе с водяной баней необходимо следить за тем, чтобы в ней всегда была вода.

6. Водопроводом

6.1. При использовании водопровода по окончании работы в лаборатории всегда необходимо проверять, выключены ли краны холодной и горячей воды

7. Химической посудой и вспомогательными приспособлениями для выполнения методик

7.1. Стеклоянная химическая посуда (пробирки, пипетки, колбочки, мерные цилиндры и др.) требуют осторожного обращения. В противном случае она может разбиться и травмировать осколками стекла работающего и окружающих

7.2. Автоматические пипетки должны находится в штативах-подставках. Пластик, из которого они сделаны, достаточно хрупкий, при неосторожном обращении, ударах эти точные измерительные приборы могут быть выведены из строя.

Взятие, хранение и доставка в лабораторию биологического материала

Наиболее распространенным материалом для клиничко-лабораторных исследований является кровь, моча и некоторые другие биологические жидкости.

Кровь рекомендуется брать утром (между 8 и 10 часами), до физической нагрузки и проведения диагностических процедур. За сутки до взятия крови прием пищи может быть обычным (следует исключить употребление алкоголя). Практически здоровым лицам и амбулаторным больным накануне утра (после 2ч ночи) запрещается курение, прием пищи и жидкости (разрешается выпивать стакан воды между 22 и 5 часами). Если для выполнения подавляющего большинства тестов взятие крови производят

после 8-12ч голодания, то для определения триацилглицеринов, холестерина требуется выдержать 12-14 часовой интервал после приема пищи. Непосредственно перед взятием крови пациенту необходимо предоставить отдых в положении сидя в течение не менее 15-30 минут (в процессе взятия крови рука пациента располагается под углом 45°). у больных, которым предписан строгий постельный режим, взятие крови осуществляется между 7 и 9 часами, при этом рука пациента, лежащего в постели, должна быть в горизонтальном положении.

Следует иметь в виду, что при пребывании человека в течение нескольких часов в горизонтальном положении объемы плазмы в русле крови оказывается на 10-15% больше, чем у пациента, сохраняющего обычный двигательный режим. Отсюда, концентрация веществ в крови человека, лежавшего более часа, всегда ниже, чем у него же после хотьбы.

Положение тела оказывает влияние на концентрацию общего белка, альбумина, креатина, холестерина, триацилглицеринов, активность щелочной фосфатазы, аспаратаминотрансферазы и других компонентов плазмы. Содержание этих веществ и активность ферментов значительно повышаются при переходе больного в вертикальное положение и, наоборот, уменьшается – в горизонтальном. Максимальное изменение характерно для уровня общего белка, активности ферментов (11%) и содержание кальция (3-4%).

При взятии крови путем венепункции время сдавления сосудов жгутом по возможности должно быть минимальным. Больному не следует сжимать и разжимать пальцы руки, поскольку это вызывает местный стаз и гипоксию, а также сдвиги в распределении некоторых веществ (холестерина, калия, натрия, кальция и др.) между форменными элементами крови и ее жидкой частью.

Во избежание гемолиза кровь следует брать сухим шприцем, сухой иглой (одноразового пользования), в сухую пробирку в стерильных условиях. Если набранная в шприц кровь переносится в пробирку, то эту процедуру осуществляют медленно (для предотвращения вспенивания крови). При исследовании системы гемостаза к процессу взятия крови предъявляют ряд дополнительных требований. Так, рекомендуется использовать иглу с широким просветом, лучше без шприца (его применяют для взятия крови у детей, у взрослых больных с явлениями гипотензии, а также находящихся в терминальном состоянии). Дезинфекцию кожи осуществляют обработкой соответствующего ее участка над местом прокола (обычно в локтевом сгибе) 70% этиловым спиртом. Поскольку при проколе кожи в просвет иглы перемещаются тканевая жидкость и фрагменты тканей, могущие в дальнейшем существенно повлиять на коагулологические тесты, первые (после наложения жгута и прокола вены иглой) 0,5-1 мл (особенно выступившие вначале 5-6 капель) вытекающей крови нельзя использовать для коагулограммы. Однако эту порцию крови можно применять для всех других

биохимических исследований. Чтобы исключить влияние на коагуляцию последствий венозного застоя крови, рекомендуют в процессе ее взятия на непродолжительное время (2-3 сек) расслабить жгут. Кровь должна стекать по стенке пробирки. Если требуется получить плазму, применяют вакутейнеры, обработанные антикоагулянтом (лимоннокислый натрий, щавелевокислый натрий или калий и др.). кровь осторожно перемешивают (без вспенивания), оставляют в штативе на 20-25 мин. Интенсивное встряхивание вызывает гемолиз эритроцитов, что искажает многие параметры коагулограммы. Поэтому плазма с признаками гемолиза не пригодна для данного исследования. При лизисе сосредоточенных в сгустке эритроцитов находящиеся в них ферменты переходят в сыворотку крови. Этим объясняется, в частности, более высокая активность энзимов (лактатдегидрогеназы, аланин – аспаратаминотрансферазы, фруктозофосфатаальдозазы, кислой фосфатазы, аргиназы, фосфогексоизомеразы и других ферментов, содержащихся в значительных количествах в тромбоцитах и эритроцитах и освобождающихся из них при свертывании крови) в сыворотке, чем в плазме крови. Поэтому для оценки активности перечисленных ферментов рекомендуется пользоваться плазмой.

Для получения сыворотки антикоагулянт не добавляют. Доставленные в лабораторию пробирки помещают на 10-15 минут в термостат для прогревания при температуре 37°C. Затем осторожно проводят проволокой или стеклянной палочкой по внутренней стенке пробирки, чтобы ускорить получение сыворотки, и центрифугируют. Пробирку с кровью допускается выдерживать при комнатной температуре (20-26°C) в течение 1-1,5 ч после взятия.

Если сыворотку требуется получить немедленно, то кровь центрифугируют 15 минут при 1500 оборотов/минуту сразу же после ее взятия. Считается, что объем выделяемой сыворотки, составляет примерно 1/3 взятого объема крови (при некоторых патологических состояниях сыворотки получается намного меньше). Сыворотку (дефибринированную плазму) желательно использовать для лабораторных исследований в день взятия крови. Если же исследование откладывают до следующего дня, пробирку с сывороткой закрывают пробкой и помещают в домашний рефрижиратор, в котором хранят при температуре 4°C.

Биохимические исследования выполняются как с плазмой, так и с сывороткой крови. Основным биологическим материалом для исследования активности ферментов и метаболитов является сыворотка крови. Необходимо отметить, что вследствие частичного разрушения эритроцитов, сопровождающего переход их содержимого в окружающую жидкость, а также выделения в процессе свертывания крови и ретракции сгустка находящихся в тромбоцитах биологически активных веществ, могущих влиять на ферменты

плазмы крови, в большинстве случаев активность энзимов сыворотки превышает таковую плазму крови.

Содержание электролитов правильнее определять в плазме крови (при соответствующем подборе антикоагулянта). Поскольку концентрация ионов калия в эритроцитах намного превышает уровень этого катиона в плазме крови, они способны выходить из эритроцитов даже через неповрежденную оболочку (чему способствует нарушения в ней метаболических процессов, в частности АТФ-азной активности, функциональной деятельности К-На-насоса). Исходя из этого определять, уровень калия в плазме следует не позднее чем через $\frac{3}{4}$ -1 ч после взятия крови.

Гемолизированные сыворотку и плазму не рекомендуется использовать для анализа, за исключением редких случаев.

Обычно сыворотку крови содержат в холодильнике при 0-4°C. Допускается ее хранение в течение месяца (и больше) при условии замораживания сразу после получения и однократном размораживании непосредственно перед определением. Вместе с тем известно, что активность щелочной фосфатазы более стабильна при комнатной температуре (не изменяется на протяжении нескольких суток). В случае хранения сыворотки при пониженной температуре (0-4°C) активность этого фермента постепенно повышается, достигая наибольшей выраженности спустя 12-24 ч. Если данные об устойчивости определяемых соединений, в частности об изменении фермента в сыворотке (плазме) крови при хранении, отсутствуют, рекомендуется проводить биохимический анализ тотчас после ее взятия.

Для определения содержания лабильных соединений, активности некоторых ферментов (кислой фосфатазы и др.) необходимо пользоваться свежей или лиофилизированной сывороткой. Сыворотку же, хранившуюся при 0-40 °С, применять с этой целью нельзя.

Исследуемый материал, как правило, сохраняют до окончания выполнения всех анализов, что позволяет в случае необходимости повторить определение.

При хранении мочи в ней, прежде всего, изменяется содержание тех соединений, на которые влияют присутствующие в жидкости бактерии. Поэтому необходимо производить консервацию мочи разработанными для этого способами, к которым относятся:

1. Быстрое замораживание мочи при температуре -20°C. После оттаивания такая моча пригодна для проведения большинства биохимических исследований.

2. Добавление к суточному объему мочи 5 мл раствора тимола в изопропане (100 г/л). Обработанная этим реактивом моча пригодна для выполнения большинства биохимических анализов, за исключением определения эрекции 17-кетостероидов и желчных кислот.

3. Добавление в качестве консерванта соляной кислоты – из расчета 50 мл 10 ммоль/л (380 г/л, 38%) раствора на суточное количество мочи. Приготовленную таким образом мочу обычно используют для определения содержания в ней стероидов и катехоламинов.

Для подкисления используют также борную кислоту из расчета 1,8 г на 100 мл мочи.

Допускается применять ряд других консервантов: жидкость Мюллера (10 г натрия сульфата, 25 г калия бихромата на 100 мл мочи), хлороформную воду (5-7,5 мл хлороформа на 1 л воды) из расчета 20-30 мл на 1 л мочи. При необходимости определения содержания в моче фотолabile веществ (желчные пигменты, порфирины, витамин В₂, некоторые метаболиты аминокислот) биологический материал следует направлять на лабораторный анализ как можно быстрее, притом в посуде, обернутой светонепроницаемой бумагой.

Чтобы предотвратить развитие в моче микрофлоры, в наибольшей мере сказывающейся на результатах бактериологического анализа, исследование целесообразно выполнять в сроки от 30 минут до 1,5 ч после ее выделения. Если это невозможно, мочу следует подкислить и хранить в холодильнике при 4°C (что позволяет отсрочить проведение исследования на 6 ч после ее сбора).

Выпотные жидкости собирают в чистую сухую колбу, содержащую в качестве антикоагулянта гепарин или лимоннокислый натрий (добавляют из расчета 1 г на 1 л жидкости), и после тщательного размешивания тотчас направляют на исследование.

Для постановки диагноза и дифференциальной диагностики заболеваний в ряде случаев прибегают к биохимическому анализу пунктатов тканей. С этой целью навеску ткани (например, печени) измельчают в соответствующем объеме жидкости, приготавливая из нее гомогенат или экстракт - вытяжку. Для получения гомогенатов используют растворы следующего состава: 0,25 моль/л сахарозы; 0,25 моль/л сахарозы, содержащей 1 ммоль/л ЭДТА; 0,44 моль/л сахарозы; 0,88 моль/л сахарозы; 9 г/л NaCl и др. экстракт готовят с применением раствора KCl в NaCl различной концентрации, буферных растворов, бидистиллированной воды. Обломки субклеточных структур определяют с помощью центрифугирования на сверхскоростных центрифугах при 18000 об/мин в течение 30 минут.

Результаты лабораторных анализов заносят в журнал, отмечая в нем те из них, которые вызывают сомнения.

Биологический материал, взятый у пациента с целью выполнения лабораторного анализа, именуется образцом. Им может быть цельная кровь, плазма, сыворотка, спинномозговая жидкость, моча и т.д. часть образца, используемая для аналитического определения содержащихся в нем компонентов, обозначается как проба.

Правильность получаемых в лаборатории результатов во многом зависит от требуемой подготовки материала к исследованию. При этом важно обращать внимание на стабильность анализируемых компонентов в сыворотке, плазме крови, моче и других биологических жидкостях.

Правила безопасности при работе в лаборатории

Прохождение инструктажа отмечается росписью в лабораторном журнале по технике безопасности.

Во время работы в лаборатории соблюдайте чистоту, порядок и правила техники безопасности, так как беспорядочность, поспешность или неряшливость в работе часто приводят к несчастным случаям с тяжелыми последствиями.

Запрещается в лаборатории пить воду, принимать пищу, курить.

Все химические реактивы следует хранить только в соответствующей посуде с этикетками.

Студентам запрещается приступать к работе, не согласовав плана работы с преподавателем.

По окончании пользования газом, водой и электроприборами немедленно закройте краны, которыми вы пользовались и отключите электроприборы. Уходя из лаборатории, проверьте окончание химических процессов, выключены ли газ, вода и электрический ток на столах, под тягами и затем в наружных шахтах.

Лица, нарушающие правила безопасности, привлекаются администрацией к ответственности.

Правила работы с кислотами и горючими веществами

Разбавление серной кислоты производить приливанием кислоты в воду, а не наоборот, и только в жаростойких и фарфоровых стаканах, так как при этом происходит значительное выделение тепла.

Переливать концентрированные азотную, серную и соляную кислоты можно только при включенной тяге в вытяжном шкафу. Дверцы шкафа должны быть, по возможности, прикрыты.

При работе с концентрированными кислотами необходимо одевать защитные очки, а при работе с дымящей азотной кислотой, кроме очков, надевать длинный резиновый фартук.

Запрещается при работе с этиловым эфиром, спиртом, бензолом, ацетоном, уксусноэтиловым эфиром и др. горючими и легковоспламеняющимися жидкостями (ЛВЖ) проводить нагревание на голом огне, на сетке, вблизи открытого пламени или в открытых сосудах. Следует иметь в виду, что легколетучие органические жидкости могут

воспламеняться при отсутствии открытого пламени, при падении на сильно нагретую поверхность.

Если кислота случайно пролита, то ее сначала засыпают песком, чтобы он впитал кислоту, затем песок убирают и место, где была пролита кислота, засыпают известью или содой, после этого замывают водой и вытирают досуха. Пролитые концентрированные растворы щелочей также засыпают песком или древесными опилками, после их удаления обрабатывают поверхность слабым раствором уксусной кислоты. Запрещается слив в канализацию кислот и щелочей без предварительной их нейтрализации.

При переноске кислот и щелочей необходимо соблюдать правила:

- переноска кислот одним человеком разрешается в соответствующей стеклянной посуде емкостью не более 5 л в специальных корзинах

- бутылки емкостью 5 л с кислотами и растворами щелочей должны помещаться в корзины, причем свободные промежутки должны быть заполнены соломой или стружками, корзины должны переноситься двумя работниками.

Запрещается ЛВЖ выливать в ведра, банки для мусора во избежание пожара от случайно брошенной спички.

Первая помощь в лаборатории при ожогах и отравлениях

При термических ожогах немедленно делайте неоднократные примочки в месте ожога спиртовым раствором таннина (можно также смачивать раствором KMnO_4 или $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ и покрывать мазью от ожогов – сульфидиновой эмульсией).

При ожогах кислотами сначала хорошо промойте обожженное место проточной водой, а затем раствором Na_2CO_3 .

При ожогах едкими щелочами хорошо промойте обожженное место водой, а затем разбавленной уксусной кислотой.

В случае вдыхания хлора или паров брома следует вдыхать пары спирта, а затем выйти на свежий воздух.

Особое внимание при работе в лаборатории должно уделяться защите глаз. В случае попадания в глаза различных химических реагентов нужно немедленно промыть глаза большим количеством воды в течение 3-5 минут, а затем промыть глаза в случае щелочных растворов раствором HBr , в случае кислых – раствором Na_2CO_3 . После этих мер первой помощи необходимо немедленно обратиться к врачу.

Тушение местного пожара и горячей одежды

При возникновении пожара немедленно выключите газ и электроприборы по всей лаборатории, уберите все горючие вещества подальше от огня, засыпьте песком или накройте войлочным, шерстяным одеялом или асбестом

очаг пожара. Большое пламя тушат при помощи огнетушителя (лучше применять углекислотные).

Если на ком-либо загорится одежда, тушите обливанием водой из душа или немедленно повалите на пол и накройте войлочным одеялом, которое не снимайте до тех пор, пока не погаснет пламя.

В лаборатории используют ртутные термометры. В случае их разбивания ртуть, проникая в щели пола, испаряется, и ее пары могут послужить источником тяжелых отравлений. Поэтому следует добавить следующее положение в инструкцию:

- пролитую ртуть собирают вакуум-пипеткой с ловушкой. Для собирания ртути можно также использовать склянки Тищенко, подключенные к вакуумному насосу, кисточки или пластины из меди. Необходимо обработать загрязненные ртутью поверхности 1%-ным раствором $KMnO_4$, подкисленный HCl .

Закончив работу, привести рабочее место в порядок.

Живая система от неживой отличается обменом веществ и энергии. Обмен веществ и энергии называют метаболизмом. Биохимия создает теоретическую базу для изучения медико-биологических и специальных дисциплин: биологии, гигиены, физиологии, генетики, гистологии, микробиологии, патологии внутренних органов и др.

Метаболизмом называют совокупность химических процессов, которым подвергаются различные соединения с момента их поступления в организм до момента их выделения из организма. В результате метаболизма организм получает пластические вещества для построения специфических биополимеров клеточных структур и, расщепляя биополимеры, выполнившие свою функцию в организме, получает энергию, необходимую как для биосинтеза, так и для выполнения различных видов работ в клетках (ионные насосы, мышечное сокращение и др.).

Таким образом, в метаболизме различают анаболизм и катаболизм, и по гребню этих процессов, связанных энергией, протекает процесс жизнедеятельности .

Катаболизм – процесс расщепления сложных органических макромолекул (белки, жиры, углеводы) до простых конечных продуктов (CO₂, H₂O и мочевины). Распад сопровождается выделением свободной энергии (т.е. экзергонические реакции).

Анаболизм – это биосинтез из малых молекул (аминокислот, моносахаридов, глицерина, азотистых оснований, жирных кислот) сложных макромолекул. Биосинтез связан с увеличением размеров молекул и усложнением их структуры, поэтому требует затрат энергии, которая освобождается при катаболизме (т.е. эндергонические реакции). Катаболизм и анаболизм протекают в клетке одновременно и тесно связаны между собой. Питание – это составная часть обмена веществ, поскольку основным источником энергии для живых организмов является энергия, запасенная в химических связях компонентов пищи. Проявления жизнедеятельности и синтез веществ, входящих в состав тела, обеспечиваются за счет химической энергии, освобождающейся при распаде (окислении) сложных органических веществ.

В метаболизме выделяют 4 стадии

1. **Переваривание** — происходит в желудочно-кишечном тракте, в ходе которого чужеродные биополимеры лишаются своей тканевой и видовой специфичности, распадаясь до мономеров.
2. **Всасывание** — прохождение мономеров через слизистую желудочно-кишечного тракта во внутреннюю среду организма.
3. **Промежуточный (межуточный) обмен** — ферментативно обусловленные и регулируемые гормонально и аллостерически внутриклеточные процессы синтеза и распада.

4. Выделение конечных продуктов обмена.

Принципы метаболизма: унификация и конвергенция.

Унификация — постоянное уменьшение числа участников обменных процессов в организме человека: так из многочисленных полимеров в результате 1-го этапа метаболизма — переваривания — образуется лишь 35 участников обмена (метаболитов).

Конвергенция — объединение различных метаболических процессов в клетке, характерных для отдельных видов веществ, в единый процесс — терминальное окисление, протекающее в митохондриях клетки, ведущее к образованию энергии для организма и конечных продуктов распада. В клетке одновременно протекает около 2000 химических реакций.

В результате метаболизма в биологические внутренние среды нашего организма поступает большое количество метаболитов, содержание которых у здорового человека варьирует незначительно и составляет **ГОМЕОСТАЗ (постоянство)** внутренних сред организма (кровь, сыворотка, спинномозговая жидкость, моча, пищеварительные соки и др).

Практически любое заболевание начинается с повреждения (нарушения) одной реакции в метаболизме клетки и затем оно распространяется на ткань, орган или целый организм.

Нарушение метаболизма ведет к нарушению гомеостаза в биологических жидкостях организма человека, что сопровождается изменением биохимических показателей.

Медицина — эта та область знаний, для которой трудно переоценить значение биохимии, значение клинико-биохимических методов исследования биологических жидкостей. Достаточно напомнить, что только в крови

человека можно определить современными методами биохимических исследований около 1000 показателей метаболизма.

Литература:

1. Практика лабораторных биохимических исследований: учебное пособие. Пустовалова Л.М. – Ростов н/Д.: Феникс, 2014
2. Теория лабораторных биохимических исследований (основы биохимии): учебное пособие. Пустовалова Л.М. – Ростов н/Д.: Феникс, 2014

Задания для самоконтроля

1. Проверочные тесты

1 вариант

1. При разбавлении концентрированной серной кислоты следует:
 - а) в воду вливать кислоту
 - б) в кислоту вливать воду
 - в) одновременно в сосуд вливать воду и кислоту
 - г) не имеет значения последовательность действий
2. На результаты анализа могут повлиять следующие факторы внелабораторного характера:
 - а) прием медикаментов
 - б) прием медикаментов и положение тела
 - в) прием медикаментов, положение тела, и используемые методы.
3. Если на руку попала кислота, то после смыва водой, пораженный участок следует промыть:
 - а) 3% раствором NaHCO_3
 - б) 1% раствором KMnO_4
 - в) 2% раствором уксусной кислоты
 - г) 2% раствором борной кислоты
4. На воспроизводимость результатов исследований влияет:
 - а) пипетирование
 - б) осаждение
 - в) изменение температуры
 - г) все перечисленное
5. Для дезинфекции резиновых перчаток используют:
 - а) 6% раствор хлорамина и 3% раствор перекиси водорода
 - б) 3% раствор хлорамина и 6% раствор перекиси водорода
 - в) 3% раствор хлорамина и 0,5% раствор моющего средства
 - г) 0,5% раствор моющего средства
6. Обеззараживание перчаток в 3% хлорамина проводят в течении:
 - а) 15 мин

б) 30 мин

в) 60 мин

г) 45 мин

7. Что происходит в процессе катаболизма:

а) распад сложных веществ с затратой энергии

б) распад сложных веществ с образованием энергии

в) синтез сложных органических веществ с затратой энергии

2 вариант

1. остатки крови на инструментах обнаруживают пробами:

а) амидопириновой и азопирамовой

б) фенолфталеиновой и бензидиновой

в) амидопириновой и нингидриновой

г) мурексидной и фенолфталеиновой

2. В нелабораторные факторы, влияющие на результаты исследования:

а) прием медикаментов

б) прием медикаментов и положение тела

в) прием медикаментов, положение тела и прием пищи

г) прием медикаментов, положение тела, прием пищи и используемые

методы

3. Для обработки кювет измерительной аппаратуры используют:

а) 0,5% раствор моющего средства

б) 3% раствор хлорамина

в) 6% раствор перекиси водорода

г) 6% раствор хлорамина

4. Для обеззараживания остатков крови используют:

а) 6% раствор хлорамина

б) 6% раствор перекиси водорода

в) 70% спирт

г) сухую хлорную известь

5. Если на руку попала кислота, то после смыва водой, пораженный участок следует промыть:

а) 3% раствором NaHCO_3

б) 1% раствором KMnO_4

в) 2% раствором уксусной кислоты

г) 2% раствором борной кислоты

6. При разбавлении концентрированной серной кислоты следует:

а) в воду вливать кислоту

б) в кислоту вливать воду

в) одновременно в сосуд вливать воду и кислоту

г) не имеет значения последовательность действий

7. Постоянство внутренней среды организма это:

а) катаболизм

б) метаболизм

в) гомеостаз

7. Совокупность реакций синтеза органических веществ, идущих с затратами энергии это:

а) анаболизм

б) катаболизм

в) метаболизм

Практическое занятие № 3-4: Гормоны, клиническое значение.

Методы определения. Витамины, классификация, роль в организме.

Формируемые профессиональные компетенции: ПК 2.1., 2.2, 2.3.

Учебные цели (знать, уметь, владеть навыками):

ЗНАТЬ

УМЕТЬ

ВЛАДЕТЬ НАВЫКАМИ

1-8,10-13,17,18

1-14,17,18

1-9

Воспитательная цель: привитие умений и навыков учебной работы и коллективного труда. Формирование целостного миропонимания и современного научного мировоззрения, основанного на признании приоритетов и общечеловеческих ценностей: гуманности, милосердия, сострадания, уважения к жизни и здоровью человека.

Развивающая цель: формирование навыков самообразования, самореализации личности и развитие речи, мышления, памяти.

Межпредметные связи: ОПД 03 Химия, ОПД 16 Физико-химические методы исследований и техника лабораторных работ, ОПД 02 Анатомия.

Вопросы для подготовки к занятию

1. Основные правила техники безопасности при работе в лаборатории
2. Гормоны: общая характеристика, классификация и свойства.
3. Назовите белковые и пептидные гормоны. Дайте им характеристику.
4. Биологическое действие гормонов передней, промежуточной и задней доли гипофиза.
5. Гормоны щитовидной железы и её гипо- и гиперфункция.
6. Гормоны поджелудочной железы и мозгового вещества надпочечников.
7. Стероидные гормоны (коркового вещества надпочечников и половые гормоны).
8. Методы определения гормонов.

Гормоны: общая характеристика классификация и свойства

Актуальность :Одной из особенностей живых организмов является их способность сохранять постоянство гомеостаза при помощи механизмов саморегуляции, в осуществлении которых одно из главных мест принадлежит гормонам.

Гормоны (от греч. возбуждать) – биологически активные вещества, образующиеся в результате деятельности желез внутренней секреции и принимающие участие в регуляции физиологических функций организма и обмена веществ. Они являются промежуточным звеном между нервной системой и ферментами. Синтезированные в железах гормоны переносятся с током крови к органам-мишеням и там либо повышают каталитическую активность соответствующих ферментов, либо ускоряют их биосинтез.

Вместе с тем существуют тканевые и нейрогормоны, которые, минуя кровяной поток, воздействуют на клетки-мишени расположенные в непосредственной близости от места их синтеза. Гормонпродуцирующие железы локализованы в различных участках организма в условиях жесткой иерархии, обуславливающей контроль одних гормонов за синтезом других.

Наука, изучающая действие гормонов на живые системы, называется **эндокринологией**.

Гормонам присущи общие биологические свойства:

- дистантность действия, т.е. регулируют обмен и функции эффекторных клеток на расстоянии;
- строгая специфичность биологического действия, т.е. один гормон нельзя целиком заменить другим;
- высокая биологическая активность – для проявления эффекта достаточно малого (десятка микрограмм) количества гормона.

Классификация:

1. Анатомическая - основана на месте природного синтеза гормонов.
2. По химической классификации все гормоны можно разделить на 3 группы:
 - Аминокислоты и продукты их превращений: тироксин и родственные гормоны щитовидной железы, катехоламиновые гормоны.
 - Пептиды и белковые гормоны - наиболее представительная группа гормонов.
 - Стероидные гормоны регулируют процессы обмена веществ, роста, размножения и старения, выделяются половыми железами и корковым веществом надпочечников. Поэтому в зависимости от биологического действия делятся на половые и кортикоидные гормоны (кортикостероиды).
3. По механизму передачи сигналов:

- Пептидные гормоны и адреналин. Они не проникают через мембрану, а связываются с рецепторами мембран. Рецепторы – химические белковые структуры клеток-мишеней, содержащие комплементарные участки связывания с гормоном;
- Стероидные гормоны, являясь гидрофобными соединениями, проникают через мембраны и в клетке связываются со своим рецептором.

4. Классификация гормонов по их биологическим функциям:

- Гормоны, регулирующие обмен углеводов, жиров, аминокислот
- Гормоны, регулирующие водно-солевой обмен;
- Гормоны, регулирующие обмен кальция и фосфатов;
- Гормоны, регулирующие репродуктивную функцию;
- Гормоны, регулирующие функции периферических эндокринных желез.

5. По растворимости гормоны делятся на:

- Гидрофильные: имеют пептидную природу или являются производными аминокислот; способны накапливаться в клетках желез; не проникают в клетку; связываются с рецептором, находящимся на мембране; транспортируются в потоке крови без переносчиков.
- Липофильные: секретируются в кровь сразу после синтеза; проникают через мембрану; связываются с внутриклеточными рецепторами; регулируют транскрипцию отдельных генов; транспортируются с белками переносчиками.

Гормоны центральных желез

Гормоны гипоталамуса: В нервных клетках гипоталамуса вырабатываются нейрогормоны (релизинг-факторы, от англ. release – освобождение), которые по системе капилляров достигают гипофиза, регулируя секрецию гипофизарных гормонов. По химическому строению гормоны гипоталамуса являются низкомолекулярными пептидами (олигопептиды).

Гормоны гипофиза: Синтезируются гормоны белковой и пептидной природы. В зависимости от места синтеза различают гормоны передней, задней и промежуточной долей гипофиза. В передней доле вырабатываются тропные гормоны, которые стимулируют действие других эндокринных желез.

По механизму их синтеза и биологическим функциям делят на 3 группы:

1. Гормон роста, пролактин.
2. Тиреотропин, лютеинизирующий и фолликулостимулирующий гормон.

3. Группа гормонов, образующихся из проопиомеланокортина (ПОМК) синтезируется в передней и промежуточной долях гипофиза и в некоторых других тканях (кишечнике, плаценте).. К гормонам задней доли гипофиза условно относят вазопрессин и окситоцин, синтезируются они в особых нейронах гипоталамуса, оттуда переносятся разными нейронами в заднюю долю и поступают непосредственно в кровь. Основная биологическая функция окситоцина связана со стимуляцией сокращения гладкой мускулатуры матки при родах и сокращения мышечных волокон, расположенных вокруг альвеол молочных желез, вызывающего секрецию молока. Вазопрессин стимулирует и регулирует минеральный обмен и баланс жидкости

Гормоны периферических эндокринных желез

Гормоны поджелудочной железы. Относится к железам со смешанной (внешней и внутренней) секрецией, выделяющая поджелудочный (панкреатический) сок и гормоны. В островках поджелудочной железы образуются: глюкагон (источники: α -клетки), инсулин (β -клетки) и соматостатин (δ -клетки), поступающие непосредственно в кровь и регулирующие углеводный и жировой обмен. Инсулин – ответственный за регуляцию метаболизма углеводов, жиров и белков. Стимулирует процессы клеточного дыхания и его сопряжение с фосфорилированием. Глюкагон - гормон вместе с инсулином образует единую систему регуляции глюкозы в организме. Соматостатин тормозит секрецию глюкагона, регулирует освобождение инсулина и гастрин.

Гормоны щитовидной железы. Вырабатываются два активных гормона, производные аминокислоты тирозина: тироксин (Т4) и трийодтиронин (Т3). Отмечают 3 основных эффекта гормонов: - регуляция деления и дифференцировки клеток; - регуляция энергетического обмена ; - индукция процессов транскрипции в биосинтезе многих белков.

Гормоны паращитовидных желез. Образуется два белковых гормона – кальцитонин (КТ) и паратгормон (ПТГ, паратиреоидный). Они регулируют в организме баланс ионов кальция и неорганического фосфата. ПТГ действует на клетки-мишени по мембраноопосредованному механизму, причем это действие реализуется в почках, костной ткани и кишечнике. Кальцитонин является антагонистом паратгормона и ингибирует резорбцию костной ткани; уменьшает концентрацию кальция в плазме крови; способствует транспорту фосфора из крови в костную ткань; оказывает выраженное действие на почки, подавляя канальцевую реабсорбцию Са и Р.

Гормоны надпочечников.

В надпочечниках различают мозговой и корковый слой. В мозговом слое образуются катехоламины: адреналин, норадреналин и их предшественники (дофамин). Они являются производными ароматической аминокислоты – тирозина: Адреналин участвует в регуляции сердечно-сосудистой системы,

обмена углеводов (гликогенолиза и глюконеогенеза в печени и мышцах). Норадреналин отличается от адреналина более сильным сосудосуживающим и прессорным действием, меньшим стимулирующим влиянием на сокращения сердца, слабым действием на гладкую мускулатуру бронхов и кишечника, слабым влиянием на обмен веществ.

В корковой части эндокринной железы из холестерина образуются **две группы стероидных гормонов:**

1. Кортикоиды – Делят на две группы:

а. Глюкокортикоиды (кортизол, кортикостерон) контролируют многие стороны обмена углеводов, липидов и нуклеиновых кислот. кортикостерон кортизол

б. Минералокортикоиды участвуют в регуляции водного и солевого обмена (альдостерон):

2. Половые гормоны – от них зависит развитие специфических мужских и женских половых признаков и нормальное функционирование органов размножения. Относят женские гормоны (гестагены и эстрогены) и мужские (андрогены).

Методы определения гормонов.

Практически все гормоны определяют с помощью сложных методов на основе иммуноферментных технологий с использованием автоматических и полуавтоматических анализаторов.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГОРМОНОВ

1. Колориметрические методы, основанные на способности гормонов образовывать окрашенные соединения и измерении интенсивности поглощения света на спектрофотометре.

2. Флуориметрический метод, основанный на превращении гормонов во флюоресцирующие продукты и измерении интенсивности флюоресценции.

3. Хроматографический метод (тонкослойная бумажная хроматография, хроматография на ионообменных смолах), основанный на распределении гормонов на различных носителях с последующей их идентификацией.

4. Электрофоретический метод, основанный на распределении гормонов под влиянием внешнего электрического поля и их проявлении.

5. Радиоиммунологический метод, разработанный лауреатом Нобелевской премии Розалиндой Ялоу. Отличается не только высокой специфичностью, но и высокой чувствительностью.

Указанные методы требуют специальной аппаратуры. На практических занятиях студенты знакомятся с качественными реакциями на гормоны.

Лабораторная работа 1

Качественные реакции определения инсулина.

Принцип :Инсулин является простым белком и дает характерные качественные реакции на белок: биуретовую, ксантопротеиновую, Фоля и др. Эти реакции не специфичны. Материал исследования: раствор инсулин

Реактивы 1) 10% и 30% растворы NaOH,

2) 1% раствор CuSO₄,

3) реактив Фоля, содержащий 5% раствор (CH₃COO)₂Pb и 30% раствор NaOH,

4) концентрированная HNO₃,

5) раствор натрия нитропруссид,

6) реактив Миллона – раствор нитратов ртути (I) и (II) в HNO₃ с примесью HNO₂

7) раствор нингидрина

Проведение анализа. В пробирки наливают по 5 капель раствора инсулина и проводят качественные реакции на белок.

БИУРЕТОВАЯ РЕАКЦИЯ. В пробирку с раствором инсулина вносят 3 капли 10% NaOH и 1 каплю CuSO₄.

НИНГИДРИНОВАЯ РЕАКЦИЯ Раствор инсулина смешивают с 5 каплями раствора нингидрина. Пробирки нагревают и кипятят 1 минуту. Отмечают появление сине-фиолетового окрашивания.

КСАНТОПРОТЕИНОВАЯ РЕАКЦИЯ К раствору инсулина добавляют 2 капли концентрированной азотной кислоты и осторожно нагревают. Наблюдают за появлением желтого окрашивания переходящего при добавлении 30% NaOH в оранжевое.

РЕАКЦИЯ НА СЕРОСОДЕРЖАЩИЕ АМИНОКИСЛОТЫ Раствор инсулина и 5 капель 30% раствора NaOH кипятят 1-2 минуты. Разделяют содержимое на 2 части для реакций «а» и «б».

РЕАКЦИЯ ФОЛЯ К 5 каплям гидролизата инсулина добавляют 1 каплю раствора уксуснокислого свинца и нагревают до кипения. Отмечают появление бурого или черного осадка.

РЕАКЦИЯ С НИТРОПРУССИДОМ К 5 каплям гидролизата инсулина добавляют 2-3 капли раствора натрия нитропруссид. Отмечают появление краснокоричневого окрашивания.

Лабораторная работа 2

Качественные реакции определения адреналина.

Реактивы :

1) 10% раствор NaOH,

2) 0,15М раствор FeCl₃.

КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ С $FeCl_3$ Принцип Раствор $FeCl_3$, реагируя с пирокатехиновым кольцом, входящим в молекулу адреналина, образует продукты зеленого цвета.

Материал исследования: раствор адреналина .

Проведение анализа: В пробирку наливают по 10 капель раствора адреналина и добавляют 1 каплю раствора $FeCl_3$. Наблюдают зеленое окрашивание. После добавления 1 капли 10% раствора $NaOH$ окраска переходит в вишнево-красную.

Лабораторная работа 3

Качественная реакция определения тироксина

Реактивы :

- 1) 10% раствор $NaOH$,
- 2) 10% раствор H_2SO_4 ,
- 3) 2% раствор KJ ,
- 4) 10% раствор $NaHCO_3$,
- 5) 1% раствор крахмала,
- 6) лакмусовая бумага,
- 7) 0,5% спиртовый раствор фенолфталеина

Материал исследования :Гидролизат тиреоидина, приготовленный на основе таблеток тиреоидина (в ступку помещают 10 таблеток и тщательно растирают, затем к растертой массе в колбу добавляют 20 мл раствора натрия бикарбоната, колбу с обратным холодильником помещают на асбестовую сетку и содержимое колбы кипятят точно 15 мин (с момента закипания) при умеренном нагревании).

Проведение анализа: Для обнаружения йода в гидролизате тиреоидина в пробирку наливают 24 капли гидролизата тиреоидина, прибавляют 3 капли раствора крахмала, 1 каплю фенолфталеина, 4 капли KJ и 10-15 капель раствора серной кислоты до прекращения выделения пузырьков углекислого газа и появления синего окрашивания.

Оформление работы: Записывают принципы методов.

Результаты оформляют в виде таблицы:

Гормон Химическая природа Качественная реакция Результаты

Лабораторная работа 4

Качественные реакции определения фолликулина .

Реактивы:

- 1) 30% раствор $NaOH$,
- 2) 2% раствор м-динитробензола в абсолютном этиловом спирте.

КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА 17-КЕТОГРУППУ

Принцип: 17-кетостероиды, взаимодействуя в щелочной среде с п-динитробензолом, образуют окрашенные продукты конденсации вишнево-красного цвета.

Материал исследования: Спиртовый или масляный раствор фолликулина

Проведение анализа: В пробирку вносят 5 капель раствора фолликулина и добавляют по 5 капель раствора NaOH и п-динитробензола. Перемешивают. Развивается вишнево-красное окрашивание.

Оформление работы: Записывают принцип методов.

Результаты оформляют в виде таблицы:

Гормон Химическая природа Качественная реакция Результаты

ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ГОРМОНОВ

Широкий диапазон влияния, способность регулировать основные, определяющие процессы в жизнедеятельности организма, обусловили широкое использование гормонов и гормоноидов в практической медицине не только при заболеваниях, вызванных гормональной недостаточностью (заместительная терапия), но и при заболеваниях, связанных с различными нарушениями обмена веществ различной этиологии. Для лечения этих заболеваний выпускается масса гормональных препаратов и их синтетических аналогов.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Практика лабораторных биохимических исследований: учебное пособие. Пустовалова Л.М. – Ростов н/Д.: Феникс, 2014
2. Теория лабораторных биохимических исследований (основы биохимии): учебное пособие. Пустовалова Л.М. – Ростов н/Д.: Феникс, 2014
3. Теория и практика лабораторных биохимических исследований учебник/Н.В.Любимова, И.В.Бабкина, Ю.С.Тимофеев-М.: ГЭОТАР-Медиа, 2020. 416 с.: ил.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ПО РАЗДЕЛУ «ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ»

1. СТЕРОИДАМИ ПО ХИМИЧЕСКОЙ ПРИРОДЕ ЯВЛЯЮТСЯ ГОРМОНЫ:
 - 1) норадреналин
 - 2) вазопрессин
 - 3) гастрин
 - 4) эстрон

5) тестостерон
2. ПРОИЗВОДНЫМИ АМИНОКИСЛОТЫ ТИРОЗИНА ПО ХИМИЧЕСКОЙ ПРИРОДЕ ЯВЛЯЮТСЯ:

- 1) адреналин
- 2) норадреналин
- 3) кортикостерон
- 4) трийодтиронин
- 5) серотонин

3. ОСТРОВКОВАЯ ТКАНЬ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРОДУЦИРУЕТ ГОРМОН:

- 1) вазопрессин
- 2) глюкагон
- 3) инсулин
- 4) окситоцин

4. В РЕГУЛЯЦИИ ОБМЕНА ЭЛЕКТРОЛИТОВ ПРИНИМАЕТ УЧАСТИЕ ГОРМОН:

- 1) тироксин
- 2) инсулин
- 3) альдостерон
- 4) кортикостерон
- 5) глюкагон

5. В РЕГУЛЯЦИИ ФОСФОРНО-КАЛЬЦИЕВОГО ОБМЕНА УЧАСТВУЮТ ГОРМОНЫ:

- 1) паратгормон
- 2) кальцитонин
- 3) адренокортикотропин
- 4) тестостерон
- 5) прогестерон

6. В РЕГУЛЯЦИИ ВОДНОГО БАЛАНСА И ОСМОТИЧЕСКОГО ДАВЛЕНИЯ ПЛАЗМЫ КРОВИ, А ТАКЖЕ СТИМУЛЯЦИИ СОКРАЩЕНИЯ ГЛАДКИХ МЫШЦ УЧАСТВУЕТ ГОРМОН:

- 1) пролактин
- 2) соматостатин
- 3) кортиколиберин
- 4) вазопрессин

7. ПЕПТИДНЫЕ ГОРМОНЫ СИНТЕЗИРУЮТСЯ:

- 1) в паращитовидной железе
- 2) в поджелудочной железе
- 3) в щитовидной железе
- 4) яичниках

5) в коре надпочечников

8. ГОРМОНЫ СТЕРОИДНОЙ ПРИРОДЫ СИНТЕЗИРУЮТСЯ:

- 1) в щитовидной железе
- 2) в поджелудочной железе
- 3) в семенниках
- 4) в мозговом веществе надпочечников
- 5) в коре надпочечников

9. ФУНКЦИЮ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ РЕГУЛИРУЕТ ГОРМОН:

- 1) тиреолиберин
- 2) кальцитонин
- 3) тиреотропин
- 4) тироксин

10. РАСПАД ГЛИКОГЕНА В ПЕЧЕНИ СТИМУЛИРУЕТ ГОРМОН:

- 1) норадреналин
- 2) глюкагон
- 3) инсулин
- 4) адреналин
- 5) эстрадиол

11. БИОСИНТЕЗ ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ В КОРЕ НАДПОЧЕЧНИКОВ СТИМУЛИРУЕТ ГОРМОН:

- 1) аденокортикотропин
- 2) тиреотропин
- 3) кортиколиберин
- 4) кортикостерон

12. ЛИПОЛИЗ В ЖИРОВОЙ ТКАНИ СТИМУЛИРУЕТ ГОРМОН:

- 1) адреналин
- 2) инсулин
- 3) альдостерон
- 4) вазопрессин

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ ПО РАЗДЕЛУ «ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ»

1. Больной жалуется на неутолимую жажду, употребление большого объема жидкости, значительное количество мочи (6-8 л в сутки). При обследовании найдено глюкозы в крови 5,2 ммоль/л, кетоновых тел нет. Моча бесцветная, плотность 1,002, сахара нет. Назовите возможные причины полиурии.

2. Врач обнаружил у больного резкое снижение веса тела, повышенную раздражительность, небольшое повышение температуры по вечерам,

пучеглазие (экзофтальм), повышение общего обмена, увеличение поглощения кислорода, гипергликемию, гиперазотемию. О заболевании какой эндокринной железы можно думать?

4. Может ли переедание и ожирение способствовать развитию сахарного диабета?

5. Человек на улице потерял сознание. В приемном покое больницы отметили слабые судороги, запаха ацетона нет, сахар крови 1,66 ммоль/л, кетоновых тел и сахара в моче нет. Какая может быть причина потери сознания? Какую первую помощь

ВИТАМИНЫ

Характеристика и классификация витаминов. Понятие а-, гипо- и гипервитаминозов

Витамины (от лат. «vita» - жизнь) - низкомолекулярные органические и биокоординационные вещества, присутствие которых необходимо в небольшом количестве в пище человека и животных для их нормальной жизнедеятельности. Витамины являются регуляторами обмена веществ, многие из них - составные части ферментов. В отличие от других пищевых веществ: витамины не включаются в структуру тканей и не используются организмом в качестве источника энергии. Каждый витамин имеет три названия: по наименованию того заболевания, которое развивается при отсутствии данного витамина в пище с приставкой анти-; обозначают буквой латинского алфавита; химическое название. Заболевания, развивающиеся при полном отсутствии витаминов в пище, называется авитаминоз, при недостаточном поступлении - гиповитаминоз, при избыточном - гипервитаминоз.

Причины а- и гиповитаминозов бывают экзогенные и эндогенные .

Классификация: в зависимости от растворимости различают:

1. жирорастворимые
2. водорастворимые витамины.

Помимо главных групп витаминов различают группу витаминоподобных веществ - это разнообразные химические вещества, обладающие

витамиными свойствами. К ним относят: холин, липоевая кислота, витамин В15, инозит, убихинон, парааминобензойная кислота, карнитин, ряд факторов роста и т.д.

Жирорастворимые витамины: строение, биологическая роль и источники .

Витамин А (ретинол, антиксерофтальмический) Биологическая роль заключается в его влиянии на барьерную функцию кожи, слизистых оболочек, проницаемость клеточных мембран, биосинтез их компонентов. При недостатке витамина сухость кожи, себоррейный дерматит, повышенная чувствительность зубной эмали (гиперестезия), нарушение структуры покровных тканей и ороговение эпителия. Одним из основных симптомов является ксерофтальмия. К наиболее ранним симптомам относится куриная слепота (гемералопия). Гипервитаминоз - воспаления глаз, мелкие трещины на губах и в уголках рта, сухость и пигментация кожи, выпадение волос, суставные боли, диффузное утолщение костей, общее истощение организма и т.д. Источники: печень к.р.с. и свиней, яичный желток, молоко, сливки, рыбий жир. В растениях витамин содержится в виде своего предшественника - провитамина каротина.

Витамин D (кальциферол, антирахитический). Существует в виде нескольких соединений, основе структуры которых лежит конденсированная кольцевая система циклопентанпергидрофенантрена. Витамин участвует в регуляции процессов всасывания Са и Р в кишечнике. Усиливает ДНКзависимый синтез рибонуклеиновой кислоты, реакции 24 окислительного фосфорилирования. Способствует реабсорбции фосфатов, аминокислот, ионов Са из первичной мочи в кровь. При недостатке у детей развивается рахит, у взрослых - остеопороз, Гипервитаминоз приводит к развитию гиперкальциемии, возникают боли в суставах и мышцах, нарушается пищеварение, сердечная деятельность, заболевания почек. Источники: рыбий жир, печень, желток яиц, растительные масла, дрожжи. С профилактической и лечебной целью используется препарат витамина D в сочетании с ультрафиолетовым облучением.

Витамин Е (токоферол, антистерильный): С витамином Е связана активность ферментов содержащих серу, клеточное дыхание, необходим для образования креатинина, фосфатидов. В качестве антиоксиданта витамин защищает клетки от повреждения, замедляя окисление жиров и формирование свободных радикалов. Он защищает другие жирорастворимые от разрушения кислородом, способствует усвоению витамина А. Источники: растительные масла, семена злаков (особенно проросшие), мясо, сливочное масло, яичный желток.

Витамин К (производные нафтохинона, антигеморрагический). Витамин способствует синтезу протромбина. Дефицит в организме приводит к развитию геморрагического синдрома. Проявляется различными

кровотечениями. Витамин частично синтезируется микрофлорой кишечника. Причинами также являются прием антикоагулянтов, "кроверазжижающих", противосудорожных препаратов, антибиотикотерапия, желудочно-кишечные расстройства и заболевания, сопровождающиеся нарушением всасывания жиров кишечной стенкой. Источники: зеленые части растений: листья крапивы, шпината, капуста, плоды шиповника. В животных продуктах: печень свиньи.

Витамин F – это комплекс ненасыщенных жирных кислот. Витамин необходим для синтеза липидов, простогландинов в организме, обладает липотропным действием, способствует выделению холестерина из организма. Гиповитаминоз возникает при недостатке жирных кислот (линолевой, линоленовой, арахидоновой) . При этом развивается сухость и шелушение кожи. Источники витамина: растительные масла, животные жиры и жиры бобовых культур.

Водорастворимые витамины: строение, биологическая роль и источники

Витамин B1 (тиамин, антиневритный). участвует в углеводном обмене и связанных с ним энергетическом, жировом, белковом, водно-солевом обмене, оказывает регулирующее воздействие на трофику и деятельность нервной системы. При недостатке развивается заболевание «бери-бери». В организме нарушается углеводный обмен, накапливается молочная и ПВК. В зависимости от формы заболевания поражаются периферическая нервная система, сердечно-сосудистая система, атония кишечника.

Источники: дрожжи, хлеб из муки грубого помола, необработанный рис, бобовые (соя, фасоль, горох). Из продуктов животного происхождения – мясо, печень, почки, мозг.

Витамин B2 (рибофлавин, витамин роста). необходим для дыхания клеток, роста, для образования красных кровяных телец и антител. Недостаток рибофлавина проявляется в остановке роста, воспалении слизистой оболочки языка, губ в уголках рта. Наиболее характерны изменения со стороны глаз - светобоязнь, кератиты, катаракта, развивается общая сердечная и мышечная слабость.

Источники: Витамин распространен в природе, в организм поступает с мясными и молочными продуктами, содержат яйца, дрожжи, хлеб из муки грубого помола, семена злаков, свежие овощи.

Витамин B3 (пантотеновая кислота, антидерматитный). Название получил от греч. "пантотен", что означает "всюду", из-за широкого распространения в природе. При недостатке развиваются дерматиты, дистрофические изменения желез внутренней секреции (надпочечники) и нервной системы (параличи). Источники: печень, яичный желток, икра рыб, дрожжи, зеленые части растений, пшеничные отруби.

Витамин В5 (РР) (никотиновая кислота, никотинамид, антипеллагрический). Входит в состав коферментов НАД и НАДФ, которые являются переносчиками водорода к флавопротеиновым ферментам, тем самым, регулируя окислительно-восстановительные процессы в организме. При недостатке развивается пеллагра (от итал. шершавая кожа), дерматит, чаще всего поражаются участки кожи, подверженные влиянию прямых солнечных лучей. Специфическим являются стоматиты, гингивиты, поражения языка с вздутиями и трещинами, нарушения желудочно-кишечного тракта и нервной деятельности.

Источники: мясо, печень, рыба, яйцо, молоко, хлеб, картофель, морковь, пивные дрожжи, пшеничные отруби, ячмень, рис.

Витамин В6 (антидерматитный). Объединяет три соединения - пиридоксин, пиридоксаль и пиридоксамин. Витамин необходим для нормального функционирования центральной и периферической нервной системы, участвует в синтезе нейромедиаторов. Недостаточность витамина проявляется в виде дерматитов, поражений нервной системы, эпилептических судорог, угнетается деятельность красного костного мозга. Источники: мясо, рыба, печень трески, почки, сердце, яичный желток, молоко, неочищенные зерна злаковых (гречневая и пшеничная крупы), дрожжи, бобовые, кукуруза, картофель, соя.

Витамин В12 (кобаламин, антианемический). Имеет сложное химическое строение. Входит в состав коферментов изомераз и трансфераз. Недостаток приводит к развитию гиперхромной, мегалобластической анемии, пернициозной анемии, а также нарушениям катаболизма высших жирных кислот с нечётным содержанием атомов углерода и разветвленных аминокислот, что приводит к их накоплению в мозге и сопровождается нарушением психики.

Источники: печень, почки, говядина, домашняя птица, рыба, яйцо, молоко, морская капуста, соя и соевые продукты, дрожжи, синтезируется микроорганизмами.

Витамин С (аскорбиновая кислота, антискорбутный). Обладает сильными окислительно-восстановительными свойствами: Аскорбиновая кислота - необходимый пищевой фактор для человека, обезьян и морских свинок. Все другие животные способны синтезировать витамин С из глюкозы. При недостатке витамина развивается цинга (скорбут). Повышается проницаемость кровеносных сосудов (петехии), кровоточивость десен, расшатывание и выпадение зубов. Общая слабость, одышка, сердцебиение. Источники: цитрусовые фрукты, ягоды (шиповник, смородина, облепиха), овощи (капуста: кочанная, цветная), молоко.

Витамин Р (рутин, капилляроукрепляющий). Под термином "витамин Р" объединяют группу веществ со сходной биологической активностью, их общее название - биофлавоноиды. Так же как и витамин С является

антиоксидантом, участвует во многих окислительно-восстановительных реакциях, поэтому существует биохимическая связь между аскорбиновой кислотой и рутином. При отсутствии или недостатке повышается проницаемость сосудов, появляются кровоизлияния.

Источники: распространен в растительном мире, высоким содержанием рутина отличаются листья гречихи.

Витамин Н (биотин, антисеборейный). Биотин выполняет коферментную функцию в составе карбоксилаз: он участвует в образовании активной формы CO_2 . При недостатке развивается себорея. Бактерии кишечника способны синтезировать биотин в достаточном количестве. К снижению синтеза биотина может привести прием сульфаниламидных препаратов и антибиотиков, подавляющих рост микроорганизмов в кишечнике. Источники: богаты пивные дрожжи, печень, почки, молоко, желток, картофель. Много в зерне ячменя, овса, кукурузы.

Витамин В9 (В9, фолиевая кислота, антианемический). При восстановлении она превращается в активную форму — тетрагидрофолиевую кислоту, которая является коферментом многих ферментов, катализирующих реакции переноса одноуглеродных остатков. Недостаток вызывает нарушения синтеза аминокислот серина, метионина, белков и нуклеиновых кислот, что приводит к нарушениям роста, развитию анемии, лейкопении. Источники: зеленые части растений, листовые овощи, дрожжи, печень, почки, мясо, картофель.

Лабораторная работа 1 Качественные реакции на жирорастворимые витамины .

КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА РЕТИНОЛ

Принцип Метод основан на способности концентрированной серной кислоты отнимать воду от ретинола с образованием окрашенных продуктов. Реактивы :

- 1) Серная кислота (конц.),
- 2) хлороформ.

Материал исследования Витамин А (0,05% масляной раствор).

Проведение анализа: В пробирку вносят 2 капли раствора витамина А, 5 капель хлороформа и 1-2 капли концентрированной серной кислоты. Появляется синее окрашивание, переходящее в фиолетовое, затем в красно-бурое.

КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА КАЛЬЦИФЕРОЛ

Принцип метода: Витамины группы D и их провитамины в присутствии серной кислоты и уксусного ангидрида теряют молекулу воды, превращаются в продукт холестерилена сине-фиолетового и зеленого цвета. Реактивы :

- 1) Серная кислота (конц.),
- 2) хлороформ.
- 3) уксусный ангидрид.

Материал исследования Витамин D (масляный раствор).

Проведение анализа: В пробирку вносят 3 капли раствора витамина D, 5 капель хлороформа, добавляют 3 капли уксусного ангидрида и 3 капли концентрированной серной кислоты. Развивается красное окрашивание, быстро переходящее в фиолетовое, синее и далее в зеленое. Если объекты имеют примеси холестерина, то зеленая окраска переходит в красную.

ОБНАРУЖЕНИЕ ТОКОФЕРОЛА (ВИТАМИН E)

Принцип метода: При взаимодействии токоферола с концентрированной азотной кислотой образуется соединение хиноидной структуры красного или желтовато-красного цвета.

Реактивы :

- 1) Азотная кислота (конц)

Материал исследования :Витамин E (0,1% спиртовой раствор).

Проведение анализа: В сухую пробирку вносят 2 капли раствора витамина E и добавляют 10 капель концентрированной азотной кислоты. Пробирку встряхивают и наблюдают появление красного окрашивания. Для ускорения реакции пробирку можно поместить на 3 мин в кипящую водяную баню

РЕАКЦИЯ НА ВИКАСОЛ (СИНТЕТИЧЕСКИЙ АНАЛОГ ВИТАМИНА K1)

Принцип метода: Викасол в присутствии цистеина в щелочной среде окрашивается в лимонно-желтый цвет.

Реактивы :

- 1) 0,025% раствор цистеина.
- 2) 10% раствор натрия гидроксида.

Материал исследования :Викасол (0,05% раствор).

Проведение анализа: К 5 каплям викасола добавляют 5 капель раствора цистеина и 1 каплю NaOH. Развивается лимонно-желтое окрашивание.

Практическое значение : Качественные реакции на витамины позволяют установить подлинность (достоверность) витаминных лекарственных препаратов, а также использовать их для обнаружения и количественного определения витаминов в пищевых объектах и лекарственных растениях.

Оформление работы: Отмечают принцип методов, регистрируют результаты анализа в таблице и делают вывод о наличии витаминов с исследуемым материалом.

Название витамина	Реакция обнаружения	Наблюдаемое окрашивание
-------------------	---------------------	-------------------------

Лабораторная работа 2

Качественные реакции на водорастворимые витамины

. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА НИКОТИНОВУЮ КИСЛОТУ

Принцип: При нагревании витамина РР с раствором уксуснокислой меди образуется плохо растворимый синий осадок медной соли никотиновой кислоты.

Материал исследования: порошок никотинамида.

Проведение анализа: 5-10 мг (щепотка) никотиновой кислоты помещают в пробирку с 10 каплями раствора уксусной кислоты и растворяют при нагревании. К нагретому до кипения раствору добавляют равный объем раствора уксуснокислой меди. Жидкость становится мутной. При стоянии и постепенном охлаждении раствора выпадает синий осадок медной соли никотиновой кислоты.

КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ПИРИДОКСИН

Принцип :Витамин В6 с $FeCl_3$ образует комплексную соль красного цвета типа фенолята железа.

Материал исследования :1% раствор витамина В6.

Проведение анализа: К 5 каплям раствора витамина В6 прибавляют равное количество раствора $FeCl_3$. Развивается красное окрашивание.

Оформление работы: Отмечают принцип методов, регистрируют результаты анализа в таблице и делают вывод о наличии витаминов с исследуемым материалом.

Название витамина	Реакция обнаружения	Наблюдаемое окрашивание
-------------------	---------------------	-------------------------

Вопросы для самоконтроля

1. Какие вещества называют витаминами?
2. Установите связь ферментов и витаминов
3. Общая характеристика и классификация витаминов. Понятие а-, гипо-, гипервитаминозов.
4. Жирорастворимые витамины (А, Д, Е, К, F). Биологическое значение.
5. Водорастворимые витамины (В1, В2, В3, В5, В6, В12, Вс, С, Н, Р). Биологическое значение. Коферментная функция витаминов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ Основная 1. Березов, Т.Т. Биологическая химия / Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин. – М: Медицина. – 2002. – 704 с.

2. Практика лабораторных биохимических исследований: учебное пособие. Пустовалова Л.М. – Ростов н/Д.: Феникс, 2014

3. Теория лабораторных биохимических исследований (основы биохимии): учебное пособие. Пустовалова Л.М. – Ростов н/Д.: Феникс, 2014

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ПО РАЗДЕЛУ ВИТАМИНЫ

1.Какие витамины относятся к жирорастворимым?

- а) В6; б) А; в) Е; г) С;
д) В12; е) К; ж) Н; з) D.

2.Какой витамин является одним из сильных природных антиоксидантов?

- а) А; б) В3; в) D; г) Е; д) К.

3.Какой витамин синтезируется в организме под влиянием ультрафиолетовых лучей?

- а) А;б) Н; в) В12; г) D; д) С.

4.Какие витамины относятся к водорастворимым?

- а) В6;б) А; в) Е; г) С;
д) В12;е) К; ж) Н; з) D.

5.Какой витамин регулирует в организме процесс свертывания крови?

- а) А; б) В3; в) D; г) Е; д) К.

СИТУАЦИОННЫЕ ЗАДАЧИ ПО РАЗДЕЛУ «СТРОЕНИЕ, КЛАССИФИКАЦИЯ И РОЛЬ ВИТАМИНОВ»

1. Недостаточность какого витамина, проявляется развитием ксерофтальмии. Объясните причину?

2. Варфарин – препарат, применяемый для борьбы с грызунами, при его приеме у них возникают сильные кровотечения. Предположите механизм действия варфарина.

3. У больного нарушено переваривание липидов. Недостаточность каких витаминов следует ожидать? Почему?

4. У новорожденного обильные подкожные кровоизлияния, кровь в кале, носовые кровотечения. Недостаточность какого витамина наблюдается?

5. Больной плохо видит в сумерках, слабо ориентируется при переходе от света к темноте. Недостаток какого витамина наблюдается?
- 6.Какая связь существует между анемией и пониженной секрецией желудочного сока?

РАЗДЕЛ 2. Исследование биохимических изменений при нарушении обмена углеводов.

Практическое занятие №5:Общая характеристика углеводов,классификация,свойства. Выполнение качественных реакций на углеводы. Исследование углеводного состава биологических жидкостей.

Формируемые профессиональные компетенции: 2.1, 2.2, 2.3.

Учебные цели (знать, уметь, иметь практический опыт):

Знать	Уметь	Владеть навыками
1-12,17,18	1-14,17,18	1-9

Воспитательная цель Привитие умений и навыков учебной работы и коллективного труда. Формирование целостного миропонимания и современного научного мировоззрения, основанного на признании приоритетов общечеловеческих ценностей: гуманности, милосердия, сострадания, уважения к жизни и здоровью человека.

Развивающая цель Формирование навыков самообразования, самореализации личности и развитие речи, мышления, памяти

Межпредметные связи ОПД. 03 Химия, ОПД. 16 Физико-химические методы исследования и техника лабораторных работ, ОПД . 02 Анатомия.

Вопросы для подготовки к занятию

1. Основные правила техники безопасности при работе в лаборатории.
2. Строение и классификация углеводов.
3. Свойства и функции углеводов.
4. Суточная потребность в углеводах.

Список понятий для усвоения темы

Углеводы, моносахариды, олигосахариды, полисахариды, гомополисахариды, гетерополисахариды, альдозы, глюкоза, гликоген, крахмал, гексозы, альдозы, кетозы.

1. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Углеводами называют полиоксиальдегиды и полиоксикетоны, а также полимеры этих соединений. В биосфере углеводов больше, чем всех других органических соединений, вместе взятых. В расчёте на сухое вещество растения содержат 80-90%, животные организмы – 2% углеводов от массы тела. Углеводы являются конечными продуктами реакции фотосинтеза у растений. Животные, не обладая способностью к подобной аккумуляции солнечной энергии, используют вещества, накапливающиеся в растениях.

Классификация углеводов

I Моносахариды (не способны гидролизаться без потери углеводных свойств)

II Олигосахариды гидролизуются с образованием небольшого числа моносахаридов (от 2 до 10)

III Полисахариды при гидролизе образуют большое число моносахаридов (десятки и сотни)

Моносахариды. По содержанию альдегидной или кетонной группы моносахариды делят на альдозы и кетозы. По числу углеродных атомов различают триозы (три атома углерода), тетразы (четыре атома углерода), пентозы, гексозы, гептозы и т.д. Всем моносахаридам присуща стереоизомерия. В живых организмах преобладают D- формы углеводов. Исключения: L- арабиноза, L- моносахариды у бактерий. Триозы в свободном виде в организме практически не встречаются. Фосфорные эфиры триоз (3- фосфоглицериновый альдегид и диоксиацетонфосфат) являются промежуточными веществами в обмене углеводов. Пентозы: β - D- рибоза входит в состав нуклеотидов. Нуклеотиды – компоненты РНК, АТФ и некоторых ферментов. 2- дезокси –D- рибоза – составная часть ДНК. D- ксилоза входит в состав полисахаридов клеточных стенок растений.

Гексозы. Альдогексозы: α – D- глюкопираноза (α -глюкоза) входит в состав крахмала, сахарозы. В свободном виде присутствует во фруктовых соках (виноградный сахар), в плазме крови человека и животных. (β - глюкоза) входит в состав целлюлозы. β – D- галактопираноза составная часть молочного сахара (лактозы).

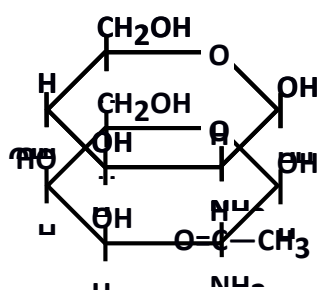
Кетогексоза β – D- фруктофураноза в свободной форме содержится о фруктовых соках и мёде, в связанной форме в сахарозе и полисахаридах (например, в инулине).

Производные моносахаридов

1) фосфорные эфиры являются промежуточными веществами в обмене углеводов.

2) уроновые кислоты. Глюкуроновая кислота входит в состав полисахаридов, участвует в обезвреживании токсичных продуктов обмена белков в печени. Галактуроновая кислота служит структурным блоком некоторых полисахаридов.

3) аминсахара входят в состав полисахаридов и гликопротеинов.



—
|
|

Дисахариды. При образовании гликозидной связи между полуацетальным гидроксильным группой одного моносахарида и ОН- группой другого моносахарида получается дисахарид. Если у второго моносахарида в образовании связи участвует спиртовой гидроксил, а полуацетальный гидроксил остаётся свободным, дисахарид будет восстанавливающим (есть возможность для раскрытия цикла и образования альдегидной группы, обладающей восстанавливающими свойствами; такой дисахарид будет восстанавливать реактив Фелинга, серебро из оксида и т.п.)

Мальтоза, α - D- глюкопиранозил-(1→4) – D- глюкопираноза. Образуется при гидролизе крахмала под действием амилаз солода. Восстанавливающий дисахарид.

Целлобиоза, β - D- глюкопиранозил — (1→4) — D- глюкопираноза. Промежуточный продукт при гидролизе клетчатки в рубце жвачных под действием ферментов микрофлоры рубца. Восстанавливающий дисахарид.

Лактоза, β - D- галактопиранозил — (1→4) — D- глюкопираноза – углеводный компонент молока млекопитающих. В коровьем молоке содержится до 4,5% лактозы, в женском молоке – до 7,5%. Это восстанавливающий дисахарид.

Сахароза, α - D- глюкопиранозил — (1→2) — β - D- фруктофуранозид, относится к невосстанавливающим дисахаридам. Служит растворимым резервным сахаридом и транспортной формой, которая легко переносится по растению. Высоко содержание сахарозы в сахарной свекле и сахарном тростнике. Мёд образуется при ферментативном гидролизе цветочного нектара в пищеварительном тракте пчелы и содержит инвертный сахар — равные количества глюкозы и фруктозы.

Полисахариды. Гомополисахариды (гомогликаны) – полисахариды, построенные из моносахаридных звеньев одного типа.

Крахмал — резервный полисахарид растений. Для человека и животных является важным углеводным компонентом пищевого рациона. Крахмал

состоит из двух фракций: амилозы (рис. 1) и амилопектина. В зависимости от вида растения на амилозу приходится 10-30 %, на амилопектин 70-90%.

Гликоген — резервный полисахарид животных. По строению аналогичен амилопектину крахмала, но если у амилопектина точки ветвления располагаются через 20-25 остатков глюкозы, то у гликогена — через 8-10.

Клетчатка (целлюлоза) у жвачных животных расщепляется в рубце под действием ферментов микрофлоры до глюкозы и далее — ЛЖК (летучих жирных кислот). У моногастричных животных не расщепляется, но улучшает перистальтику кишечника. Состоит из остатков β - глюкозы.

Хитин — полисахарид, формирующий наружный скелет насекомых и панцирей ракообразных; состоит главным образом из N-ацетилглюкозамина (рис.1).

Гетерополисахариды (гетерогликаны) при гидролизе образуют смесь различных производных моносахаридов — уроновые кислоты и аminosахара). Большинство полисахаридов этой группы в различной степени эстерифицировано остатками серной кислоты, которые усиливают их кислотные свойства. Присутствуют в организме как в свободном виде, так и в составе протеогликанов и гликопротеинов. Основные представители гетерополисахаридов — гиалуроновая кислота, гепарин, хондроитинсульфаты, кератансульфаты.

Гиалуроновая кислота является высокомолекулярным веществом. Входит в состав основного вещества соединительной ткани. Обнаруживается в стекловидном теле глаза, пупочном канатике, синовиальной жидкости суставов. Гиалуроновая кислота построена из дисахаридных звеньев, состоящих из N-ацетилглюкозамина и глюкуроновой кислоты, соединенных в положении β (1—3) связью (рис.1). Повторяющиеся звенья связаны в положении β (1—4). За счет гидратации карбоксильных и спиртовых групп гиалуроновая кислота при образовании гелей связывает 10 000 кратный объем воды.

2. ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ ЗАНЯТИЯ

Работа 1. Обнаружение лактозы и мальтозы.

Лактоза и мальтоза с аммиаком в щелочной среде образуют при нагревании окрашенные соединения.

Реактивы:

Аммиак водный, концентрированный, 20% гидроксид калия, лактоза, мальтоза.

Оборудование:

Пробирки, водяная баня, пипетки.

Ход работы:

В 3 пробирки с 5 мл мочи, раствора лактозы и раствора мальтозы последовательно прибавляют 2,5 мл раствора аммиака, 0,2 мл КОН и нагревают на водяной бане 30 мин при 60°C. При наличии лактозы через несколько минут появляется коричневая окраска, при наличии мальтозы – красное окрашивание.

В моче здорового человека мальтоза и лактоза не обнаруживаются.

Результаты опыта оформляют в тетради.

Работа 2. Обнаружение крахмала.

Крахмал с раствором йода образует окрашенное соединение синего цвета.

Реактивы:

1% раствор крахмала, йод, 1% раствор с 2% раствором иодида калия.

Оборудование:

Пробирки, водяная баня, пипетки.

Ход работы:

К 10 каплям крахмала добавляют 1-2 капли йода. Наблюдается ярко-синее окрашивание.

Реакцией пользуются для выявления активности ферментов, гидролизующих крахмал.

Работа 3. Обнаружение лактозы в молоке.

В молоке дисахарид лактозу обнаруживают реактивом Фелинга, содержащего комплексно связанные с виннокислой кислотой ионы Cu^{2+} . В результате реакции образуется оксид меди (I), выделяющийся в виде красного осадка Cu_2O .

Реактивы:

молоко, йод, ТХУ, гидроксид натрия, реактив Фелинга.

Оборудование:

Пробирки, водяная баня, пипетки, фильтр.

Ход работы:

Предварительно осаждают белки молока добавлением трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и фильтруют. К 10 каплям фильтрата добавляют 10 капель дистиллированной воды 10 капель NaOH и 6 капель реактива Фелинга. Смесь нагревают. Отмечают характер появляющегося окрашивания.

Работа 4. Обнаружение крахмала в продуктах питания.

Крахмал с раствором йода образует окрашенное соединение синего цвета.

Реактивы:

хлеб, раствор йода в иодистом калии, картофель, мука, яблоко, растительное масло, отварной рис, дистиллированная вода.

Оборудование:

Пробирки, пипетки, ступка с пестиком, стеклянные палочки.

Ход работы:

Исследуемые продукты (картофель, хлеб, мука, яблоко, растительное масло, отварной рис) по отдельности растирают до кашецеобразного состояния в ступе. В 6 пронумерованных пробирок помещают по 0,5-1 г продуктов. Во все пробирки добавляют по 2-3 мл дистиллированной воды, тщательно перемешивают. Добавляют в пробирки по 1-2 капли раствора йода. Отмечают пробирки, в которых наблюдается синее окрашивание.

Работа 5. Открытие фруктозы (реакция Селиванова)

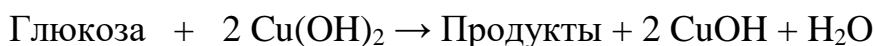
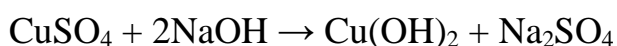
Реактивы: раствор фруктозы, раствор глюкозы, реактив Селиванова.

Оборудование: пробирки, пипетки, спиртовка.

Ход работы. В первую пробирку вносят 0,5 мл раствора фруктозы, во вторую – 0,5 мл раствора глюкозы. В обе пробирки добавляют по 0,5 мл реактива Селиванова. Пробирки осторожно нагревают на спиртовке. В пробирке с фруктозой постепенно наблюдается красное окрашивание. На первой стадии образуется оксиметилфурфурол, который во второй стадии, конденсируясь с резорцином, дает красное окрашивание.

Работа 6. Реакция Троммера

В основе реакции Троммера лежит окислительно-восстановительный процесс: в щелочной среде при нагревании альдегидная группа сахара окисляется, а гидрат окиси меди (осадок голубого или синего цвета) восстанавливается в гидрат закиси меди (кирпично-красный осадок). Углевод при этом дает различные продукты окисления, так как при окислении в щелочной среде моносахариды претерпевают глубокие изменения с расщеплением углеродной цепи. Среди продуктов окисления не удается выделить кислоту с тем же числом атомов углерода, как у исходного сахара (в отличие от окисления обычных альдегидов). Сахара, не имеющие свободной альдегидной группы, пробу Троммера не дают. Окислительно-восстановительную реакцию можно представить в виде следующей схемы:



Гидрат окиси окисления Гидрат закиси
меди (голубой осадок) глюкозы меди (желтый осадок)



Гидрат окиси окисления Закись меди
меди (голубой осадок) глюкозы (кирпично-красный осадок)

Реактивы: 0,5-процентные растворы глюкозы, фруктозы, сахарозы, мальтозы и крахмала, 2 н раствор NaOH, 0,2 н раствор CuSO₄.

Оборудование: пробирки, пипетки, спиртовка.

Ход работы. В пробирку наливают раствор глюкозы и 6–8 капель 2н NaOH. Затем по каплям добавляют 0,2 н раствор CuSO₄ до образования нерастворимого голубого осадка. Осторожно нагревают пробирку на спиртовке. Голубой, нерастворимый в воде осадок гидрата окиси меди (II) постепенно переходит в желтый, а затем – в красный осадок закиси меди (I). Это указывает на положительную реакцию Троммера. Аналогичный опыт проводят с сахарозой, мальтозой, фруктозой и крахмалом. Делают заключение о восстанавливающих свойствах этих углеводов. Избыток медной соли маскирует реакцию, так как гидроксид меди (II)

при нагревании теряет воду и дает черный оксид меди (II).

Результаты опытов оформляют в тетради в виде таблицы:

№ пробирки	Исследуемый продукт	Наблюдаемая окраска	Содержание крахмала

Выполнить задания в тетрадях для самостоятельной работы

Литература:

1. Практика лабораторных биохимических исследований: учебное пособие. Пустовалова Л.М. – Ростов н/Д.: Феникс, 2014
2. Теория лабораторных биохимических исследований (основы биохимии): учебное пособие. Пустовалова Л.М. – Ростов н/Д.: Феникс, 2014

Практическое занятие №6-7: Переваривание и всасывание углеводов. Промежуточный обмен углеводов, регуляция углеводного обмена. Нарушения углеводного обмена.

Формируемые профессиональные компетенции: 2.1, 2.2, 2.3.

Учебные цели (знать, уметь, иметь практический опыт):

Знать	Уметь	Владеть навыками
1-8,11,13	1-14	1-9

Воспитательная цель Привитие умений и навыков учебной работы и коллективного труда. Формирование целостного миропонимания и современного научного мировоззрения, основанного на признании приоритетов общечеловеческих ценностей: гуманности, милосердия, сострадания, уважения к жизни и здоровью человека.

Развивающая цель Формирование навыков самообразования, самореализации личности и развитие речи, мышления, памяти

Межпредметные связи ОПД. 03 Химия, ОПД. 16 Физико-химические методы исследования и техника лабораторных работ, ОПД . 02 Анатомия.

Вопросы для подготовки к занятию.

1. Основные правила техники безопасности при работе в лаборатории.

2. Как происходит переваривание и всасывание углеводов ?
3. Главные пути метаболизма глюкозы.
4. В чем заключается биологическое значение цикла Кребса?
5. Что происходит в дыхательной цепи?
6. Что такое субстратное фосфорилирование?
7. Что такое окислительное фосфорилирование?
8. Клинико-диагностическое значение определения глюкозы.
9. Методы определения глюкозы.

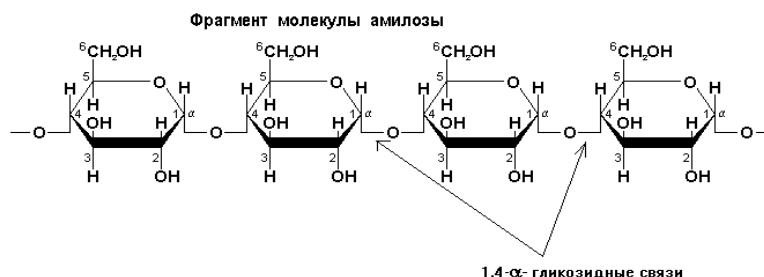
Список понятий для усвоения темы

Гликолиз, пентозофосфатный цикл, глюконеогенез, цикл Кребса, дыхательная цепь.

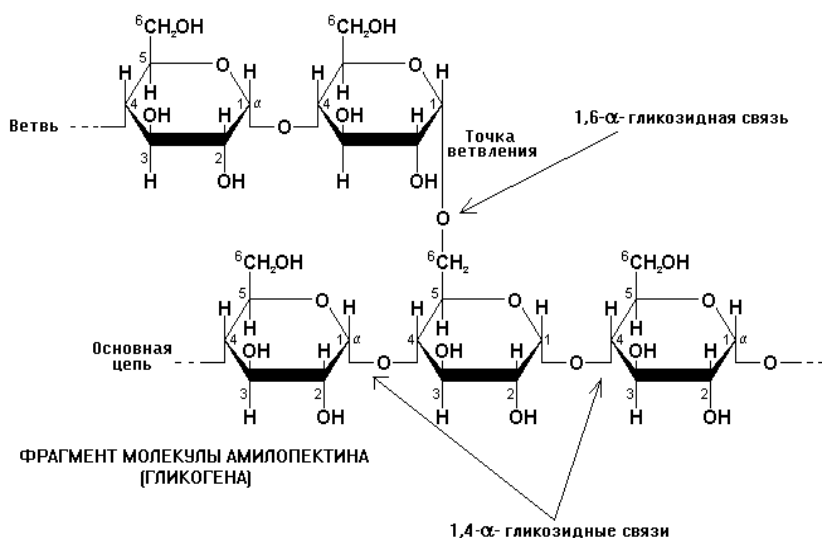
ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ.

Обмен углеводов. Переваривание и всасывание углеводов

В сутки взрослый человек при сбалансированном питании получает около 500 граммов углеводов в основном в виде полисахаридов, переваривание которых начинается уже в ротовой полости под действием фермента - α -амилазы слюны, который расщепляет α -1,4-гликозидные связи в молекулах крахмала и гликогена:



В отличие от линейной структуры одной из фракций крахмала, **амилозы**, в составе которой только α -1,4-гликозидные связи, молекулы другой фракции, **амилопектина**, а также молекулы гликогена разветвлены. Связи в точках ветвления - α -1,6-гликозидные.



Потенциально α -амилаза слюны в ротовой полости способна расщепить пищевой крахмал или гликоген до дисахаридов мальтозы и изомальтозы. Это можно подтвердить, подержав длительное время во рту кусочек несладкого хлеба или булки. Через некоторое время можно почувствовать сладкий вкус, придаваемый образовавшейся мальтозой. Но в реальных условиях пища находится в ротовой полости не слишком длительное время и мальтоза не образуется. В этом случае α -амилаза слюны успевает расщепить только некоторые 1,4- α -гликозидные связи, и образуются промежуточные продукты расщепления - декстрины, представляющие из себя полисахаридные фрагменты различной протяженности.

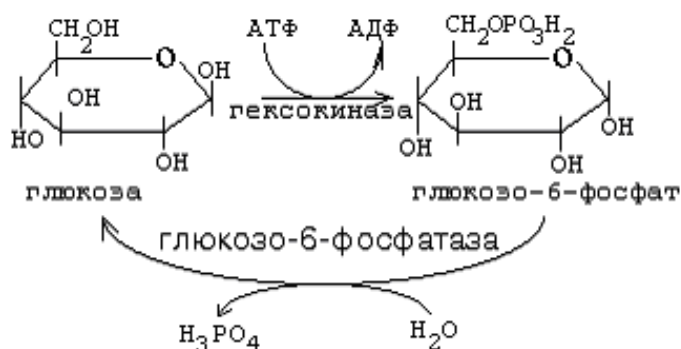
В желудке углеводы не перевариваются, т.к. в кислой среде полости желудка амилаза теряет свою активность. Переваривание углеводов возобновляется в тонком кишечнике, где имеется слабощелочная среда, оптимальная для панкреатической α -амилазы (она образуется в поджелудочной железе), которая завершает расщепление полисахаридов и олигосахаридов до дисахарида мальтозы.

Дисахарид мальтоза и остальные дисахариды, поступившие с пищей, расщепляются ферментами пристеночного переваривания углеводов до моносахаридов. Эти ферменты выделяются слизистой оболочкой кишечника в составе кишечного сока.

После всасывания глюкоза по системе воротной вены поступает в печень. В печени основное количество глюкозы идет на синтез гликогена, а оставшаяся глюкоза идёт в общий кровоток для питания других клеток. Так происходит после принятия пищи, в состоянии "натошак" (вне приёма пищи) гликоген в

печени постепенно распадается до глюкозы, и глюкоза из печени уходит в общий кровоток к другим тканям. Эти механизмы поддерживают концентрацию глюкозы в крови на постоянном уровне: 3.9 - 6.1 ммоль/л.

Под действием инсулина (пептидного гормона, который образуется в поджелудочной железе) глюкоза проникает в клетки тканей, где фосфорилируется за счёт АТФ под действием фермента *гексокиназы*. Тем самым глюкоза активируется к дальнейшим превращениям, а также не выходит обратно из клетки.



После образования глюкозо-6-фосфата начинается разветвление дальнейших *путей метаболизма глюкозы*. Главные пути дальнейших превращений глюкозы таковы:

1. Синтез гликогена.
2. Дихотомический путь (непрямое окисление глюкозы).
3. Апотомический (прямое окисление глюкозы или пентозофосфатный цикл).
4. Различные виды брожения (характерно для микроорганизмов)

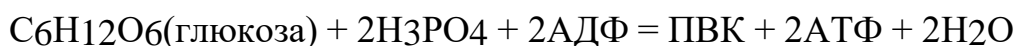
Синтез и распад гликогена. Синтез гликогена протекает не во всех тканях, а только в печени, мышцах и в лейкоцитах. Молекула гликогена синтезируется не с "нуля", а происходит постепенное удлинение уже имеющегося кусочка цепи: "затравки". И при распаде гликогена никогда не происходит полного разрушения его молекул.

Для включения одного остатка глюкозы в молекулу гликогена клетка расходует 2 молекулы АТФ. Гликоген, как резерв глюкозы, накапливается в клетках во время пищеварения. Расщепление гликогена в печени или его мобилизация осуществляется при участии фермента гликогенфосфорилазы часто называемой просто фосфорилазой. Заметим, что расщепление гликогена до глюкозы не нуждается в дополнительном притоке энергии.

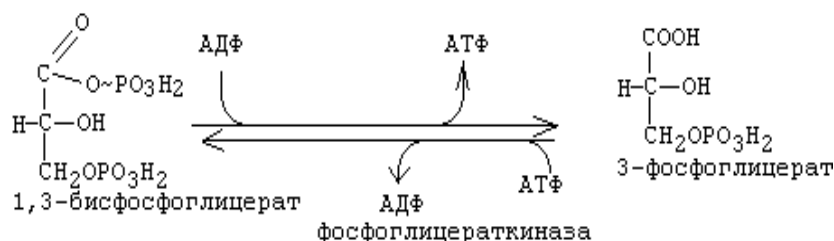
Дихотомический путь распада глюкозы

Это главный путь распада углеводов до конечных продуктов. Так распадается 70-75% глюкозы, которая поступает в клетку. Это самый длинный путь распада углеводов, который начинается с гликолиза.

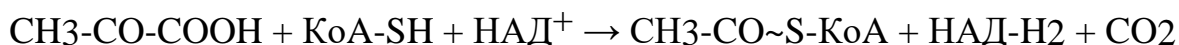
Гликолиз (греч. glykys сладкий + lysis расщепление)- анаэробное окисление глюкозы до молочной кислоты (неполное окисление глюкозы) - протекает в цитоплазме. Рассмотрим его основные этапы. Бескислородный гликолиз представляет собой сложный многоступенчатый процесс из десяти последовательных реакций. Каждая реакция катализируется специальным ферментом. В итоге, как правило, глюкоза окисляется не до молочной кислоты, а только до пировиноградной кислоты (ПВК):



Энергетический выход при гликолизе составляет две молекулы АТФ (четыре молекулы АТФ образуется путем **субстратного фосфорилирования**, две молекулы АТФ расходуются на активирование). Суть субстратного фосфорилирования заключается в том, что АТФ образуется путем фосфорилирования АДФ (присоединения к АДФ остатка фосфорной кислоты) за счет фосфорильной группы субстрата, содержащего макроэргическую связь, например, 1,3-дифосфоглицериновой кислоты :



Основной выход энергии и молекул АТФ происходит на, кислородном этапе гликолиза, называемом еще **аэробным дыханием**, который протекает в митохондриях. Начинается он с **окислительного декарбоксилирования пирувата** (ПВК), ускоряемого комплексом ферментов - пируватдегидрогеназным комплексом, при этом образуется ацетил-коэнзим А (АцКоА) - Ко-энзим А производное уксусной кислоты.



Ацетил-КоА вступает в **цикл Кребса** (цикл лимонной кислоты, цикл трикарбоновых кислот (ЦТК)).

Цикл Кребса (цтк)

Исходным субстратом ЦТК служит ацетил-КоА, который в реакциях этого цикла полностью окисляется до углекислого газа и воды. Реакции ЦТК представлены на рисунке 22.

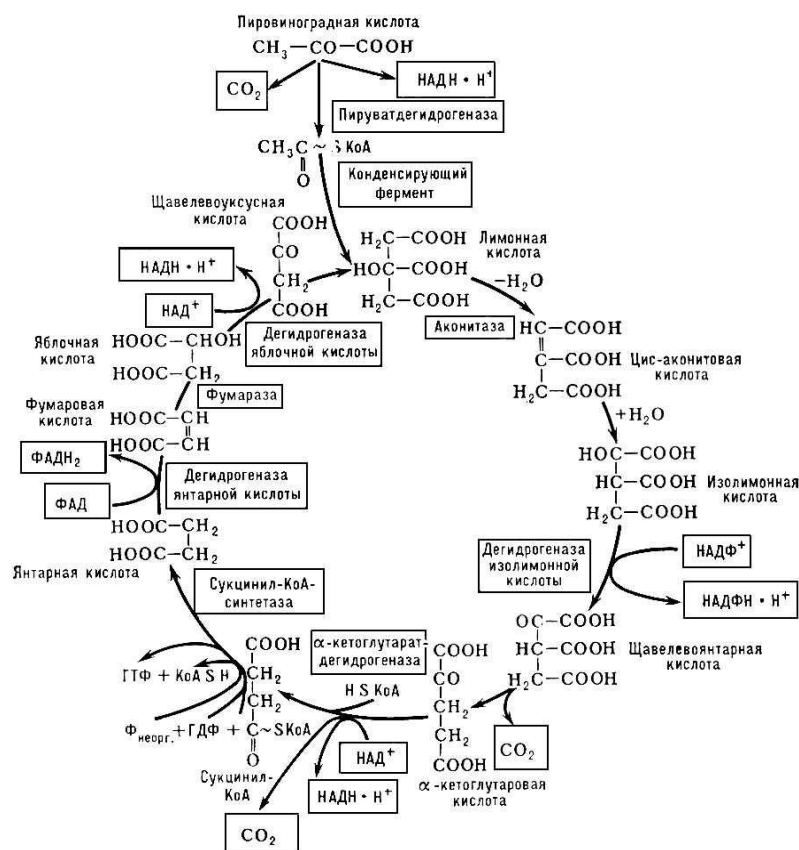


Рис. 22. Реакции цикла Кребса

Этот цикл замыкается на щавелевоуксусной кислоте (ЩУК), таким образом эта кислота выполняет функцию катализатора. В результате одного оборота цикла происходят два декарбоксилирования, четыре дегидрирования и одно фосфорилирование. Итогом 2 декарбоксилирований является выведение из цикла 2 атомов углерода (2 молекулы CO_2), т. е. ровно столько, сколько его поступило в виде ацетильной группы. В результате реакций дегидрирования образуются восстановленные формы кофакторов - 3 молекулы НАД-Н_2 и 1 молекула ФАД-Н_2 , т.е. водород в цикле Кребса не выделяется в свободном состоянии, его акцептируют кофакторы дегидрогеназ, выступая в качестве промежуточных акцепторов.

Если конечным акцептором в цепи переноса водорода выступает не кислород, а другие вещества (например пировиноградная кислота в случае спиртового

брожения), то такой тип окисления называют *анаэробным окислением*. Таким образом, биологическое окисление - это дегидрирование субстрата с помощью промежуточных переносчиков водорода и его конечного акцептора.

Восстановленные формы кофакторов окисляются в дыхательной цепи, при этом, в конечном итоге, восстанавливается молекулярный кислород, который является, таким образом, конечным акцептором электронов и катионов водорода для аэробных организмов, именно в этом смысле цикл Кребса является аэробным процессом. Важно, что АцКоА, вступающий в ЦТК, образуется не только из углеводов, но и из жиров и аминокислот. Следовательно, ЦТК - это конечный "котёл" для сжигания ацетильных остатков, образующихся из углеводов, жиров и белков. ЦТК объединяет все метаболиты, образующиеся при распаде углеводов, жиров и белков, снабжает клетки рядом предшественников для биосинтетических процессов. Работа цикла Кребса сопряжена с функционированием дыхательной цепи. При этом образуется 12 АТФ в расчете на молекулу АцКоА, вступившую в цикл. Если рассчитать на 1 молекулу глюкозы, то образуется 24 АТФ.

Дыхательная цепь (электронтранспортная цепь)

Дыхательная цепь - совокупность последовательных окислительно-восстановительных реакций, в ходе которых происходит многоступенчатый перенос электронов от восстановленных форм кофакторов (систем НАД, ФАД) через цепь промежуточных переносчиков в конечном итоге на молекулярный кислород (Рис.23)

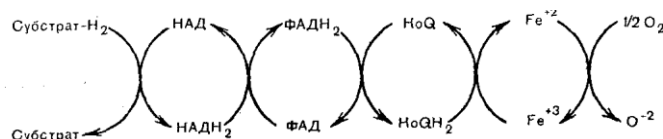


Рис.23. Схема дыхательной цепи.

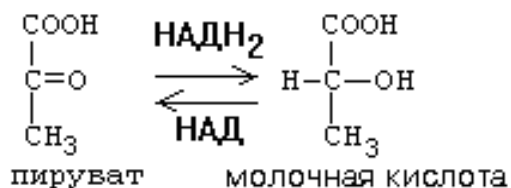
В клетках у эукариот дыхательная цепь расположена во внутренней мембране митохондрий, у дышащих бактерий – в цитоплазматической мембране специализированных структурах – мезосомах, или тилакоидах.

Процесс потребления клетками тканей организма кислорода, который участвует в биологическом окислении, называется тканевое дыхание, аэробное окисление. Каждый промежуточный переносчик (коэнзим Q (КоQ), цитохромы) вначале выступает в роли акцептора электронов и протонов и из

окисленного состояния переходит в восстановленную форму. Затем он передает электрон следующему переносчику и снова возвращается в окисленное состояние. На последней стадии переносчик передает электроны кислороду, который затем восстанавливается до воды.

Значение цепи биологического окисления заключается в том, что электроны, переходя от одного переносчика на другой, постепенно опускаются с более высокого на более низкий энергетический уровень, постепенно теряя при этом всю заключенную в них энергию, которая составляет в среднем 2377,2 кДж/моль (56,6 ккал/моль). Освободившаяся энергия частично рассеивается в виде тепла, а большая часть идет на образование АТФ. Если первичным акцептором водорода является НАД, то образуется три молекулы АТФ, если же ФАД,— то две молекулы АТФ. Такой путь синтеза АТФ носит название *окислительного фосфорилирования*, т. е. АТФ образуется путем присоединения к АДФ ортофосфорной кислоты с использованием энергии, освобожденной при окислении различных веществ. Из каждой молекулы глюкозы образуется 38 молекул АТФ.

При интенсивной физической работе бывают ситуации, когда в клетку не успевает поступать кислород. При этом распад углеводов временно протекает в анаэробных условиях и гликолиз идет до конца, до молочной кислоты — токсичного для нервных и мышечных клеток соединения. Последнюю реакцию гликолиза ускоряет фермент лактатдегидрогеназа, содержащий в качестве небелковой части систему НАД (См. Рис.11). Уравнение протекающей реакции:



При сохранении кровообращения этот наработанный в клетках лактат выносится кровью и основная его часть метаболизируется в печени или в сердечной мышце. В миокарде лактат окисляется до углекислого газа и воды; в печени же лишь примерно 1/5 поступающего лактата подвергается окислению до конечных продуктов, а 4/5 - ресинтезируются в глюкозу в ходе интенсивно идущего в печени процесса *глюконеогенеза*.

глюконеогенез представляет собой обращение процесса гликолиза, за исключением трех необратимых реакций. За сутки в организме человека за

счет глюконеогенеза может быть синтезировано до 100-120 г глюкозы, которая в условиях дефицита углеводов в пище в первую очередь идет на обеспечение энергетике клеток головного мозга. Кроме того, глюкоза служит единственным видом энергетического топлива в мышцах в условиях гипоксии, её окисление является также единственным источником энергии для эритроцитов.

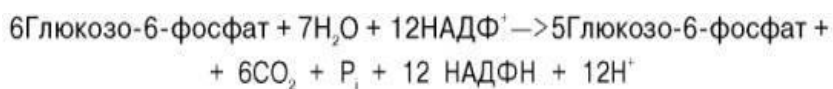
Прямой путь окисления глюкозы (пентозофосфатный цикл).

Прямой путь окисления глюкозы осуществляется в цитозоле клеток животных, растений (особенно в темноте) и микроорганизмов. Пентозофосфатный цикл преобладает в клетках тех органов и тканей, где интенсивно синтезируются жиры - в эритроцитах, половых железах, коре надпочечников, печени. Особенность этого процесса - образование пентоз, накопление восстановленной формы фосфорилированной системы НАД – НАДФ·Н₂ - кофермента дегидрогеназ, участвующих в синтезе нуклеиновых кислот, холестерина, жирных кислот, активировании фолиевой кислоты и образовании АТФ.

Пентозофосфатный цикл включает две стадии – окислительную и неокислительную. Первая, окислительная стадия, начинается с окисления глюкозо-6-фосфата и последующего окислительного декарбоксилирования продукта (в результате от гексозофосфата отщепляется первый атом углерода).

Вторая стадия включает неокислительные превращения пентозофосфатов с образованием исходного глюкозо-6-фосфата

Валовое уравнение окислительной и неокислительной стадий пентозофосфатного цикла можно представить в следующем виде:



У молочнокислых бактерий и грибов, применяемых для приготовления кислого молока, простокваши, кефира, а также при силосовании кормов в животноводстве, две молекулы ПВК, приобретая атомы водорода, восстанавливаются в молочную кислоту С₃Н₆О₃. Процесс превращения ПВК в клетках микроорганизмов и растений в устойчивые конечные продукты называют **брожением**. Так, дрожжевые грибки расщепляют ПВК на этиловый спирт и углекислый газ. Этот процесс, называемый **спиртовым брожением**,

используют для приготовления кваса, пива и вина. Брожение других микроорганизмов завершается образованием ацетона, уксусной кислоты и т.д.

Регуляция углеводного обмена.

Регуляция углеводного обмена осуществляется на всех его этапах нервной системой и гормонами.

Постоянство уровня глюкозы в крови – важнейшее условие поддержания нормальной жизнедеятельности организма. Нормогликемия является результатом слаженной работы нервной системы, гормонов и печени.

Печень – единственный орган, депонирующий глюкозу (в виде гликогена) для нужд всего организма. Благодаря активной фосфатазе глюкозо-6-фосфата гепатоциты способны образовывать *свободную* глюкозу, которая, в отличие от её *фосфорилированных* форм, может проникать через мембрану клеток в общий круг кровообращения.

Из гормонов выдающуюся роль играет **инсулин**. Инсулин оказывает свое действие только на инсулинзависимые ткани, прежде всего, на мышечную и жировую. Мозг, лимфатическая ткань, эритроциты относятся к инсулиннезависимым. В отличие от других органов, действие инсулина не связано с рецепторными механизмами его влияния на метаболизм гепатоцитов. Хотя глюкоза свободно проникает в печёночные клетки, но это возможно только при условии повышенной её концентрации в крови. При гипогликемии, напротив, печень отдаёт глюкозу в кровь (даже несмотря на высокий уровень инсулина в сыворотке).

Наиболее существенным действием инсулина на организм является снижение нормального или повышенного уровня глюкозы в крови – вплоть до развития гипогликемического шока при введении высоких доз инсулина. Уровень глюкозы в крови снижается в результате: 1. *Ускорения поступления глюкозы в клетки.* 2. *Повышения использования глюкозы клетками.*

1. Инсулин ускоряет поступление моносахаридов в инсулинзависимые ткани, особенно глюкозы (а также сахаров схожей конфигурации в положении С1-С3), но не фруктозы. Связывание инсулина со своим рецептором на плазматической мембране приводит к перемещению

запасных белков-переносчиков глюкозы (*глут 4*) из внутриклеточных депо и включению их в мембрану.

2. Инсулин активирует использование клетками глюкозы путём:

- активирования и индукции синтеза ключевых ферментов гликолиза (глюкокиназы, фосфофруктокиназы, пируваткиназы).
- Увеличения включения глюкозы в пентозофосфатный путь (активирование дегидрогеназ глюкозо-6-фосфата и 6-фосфоглюконата).
- Повышения синтеза гликогена за счёт стимуляции образования глюкозо-6-фосфата и активирования гликогенсинтазы (одновременно инсулин ингибирует гликогенфосфорилазу).
- Торможения активности ключевых ферментов глюконеогенеза (пируваткарбоксилазы, фосфоенол-ПВК-карбоксикиназы, бифосфатазы, глюкозо-6-фосфатазы) и репрессии их синтеза (установлен факт репрессии гена фосфоенолПВКкарбоксикиназы).

Другие гормоны, как правило, способствуют увеличению содержания глюкозы в крови.

Глюкагон и **адреналин** приводят к росту гликемии путём активации гликогенолиза в печени (активирование гликогенфосфорилазы), однако в отличие от адреналина глюкагон не влияет на гликогенфосфорилазу *мышц*. Кроме того, глюкагон активирует глюконеогенез в печени, следствием чего также является увеличение концентрации глюкозы в крови.

Глюкокортикоиды способствуют повышению уровня глюкозы в крови за счёт стимуляции глюконеогенеза (ускоряя катаболизм белков в мышечной и лимфоидной тканях, эти гормоны увеличивают содержание в крови аминокислот, которые, поступая в печень, становятся субстратами глюконеогенеза). Кроме того, глюкокортикоиды препятствуют утилизации глюкозы клетками организма.

Гормон роста вызывает увеличение гликемии опосредованно: стимулируя распад липидов, он приводит к увеличению уровня жирных кислот в крови и клетках, снижая тем самым потребность последних в глюкозе (*жирные кислоты – ингибиторы использования глюкозы клетками*).

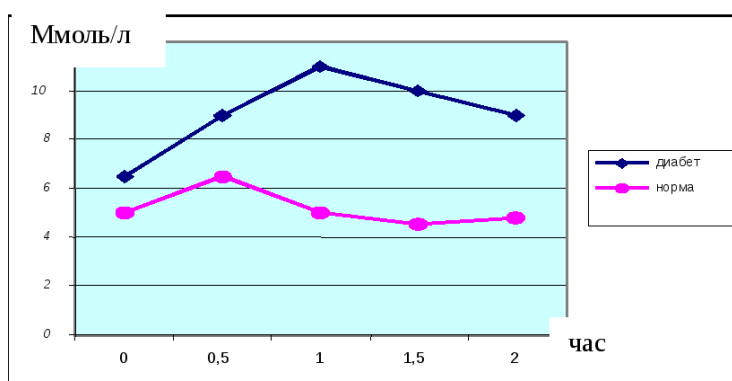
Тироксин, особенно вырабатываемый в избыточных количествах при гиперфункции щитовидной железы, также способствует повышению уровня глюкозы в крови (за счёт увеличения гликогенолиза).

При нормальном уровне глюкозы в крови почки полностью её реабсорбируют и сахар в моче не определяется. Однако если гликемия превышает 9-10 ммоль/л (**почечный порог**), то появляется **глюкозурия**. При некоторых поражениях почек глюкоза может обнаруживаться в моче и при нормогликемии.

В норме содержание глюкозы в крови натощак обычно ниже 6 ммоль/л, уровень в пределах 6-8 ммоль/л должен рассматриваться как пограничное состояние, а равный или превышающий 8 ммоль/л может служить диагнозом сахарного диабета.

Проверка способности организма регулировать содержание глюкозы в крови (**толерантность к глюкозе**) используется для диагностики сахарного диабета при постановке перорального **глюкозо-толерантного теста**:

Первая проба крови берётся натощак после ночного голодания. Затем больному в течение 5 мин. дают выпить раствор глюкозы (75г глюкозы, растворённой в 300 мл воды). После этого каждые 30 или 60 мин. на протяжении 2-х часов определяют содержание глюкозы в крови



Сахарный диабет тип I.

По распространенности занимает 3- место среди других заболеваний, после ССЗ и рака.

В мире насчитывается 100 млн чел больных СД, и каждые 10-15 лет число больных СД удваивается. Наиболее подвержены риску к заболеванию СД малообеспеченные лица, проживающие в индустриально развитых странах.

Диабет 1 типа развивается в юношеском возрасте, иногда в детстве, и очень редко у взрослых. Протекает тяжелее, чем СД 2- типа. При отсутствии врачебного контроля- возможны острые осложнения. Встречается в 10 раз меньше, чем СД 2 типа.

Регуляция углеводного обмена осуществляется гормонами Инсулином и Глюкагоном. Эти же гормоны влияют на механизм депонирования и мобилизации гликогена, а также на метаболизм жиров.

Инсулин и Глюкагон это главные регуляторы изменений метаболизма при смене состояний пищеварения и голодания (абсорбтивное и постабсорбтивное состояния). Пищеварение длится 10-15 час в сутки, а расход энергии все 24 час.(снижен ночью). Поэтому часть энергии депонируется, для того, чтобы использоваться в постабсорбтивный период.

Инсулинзависимый сахарный диабет- аутоиммунное заболевание

При этом типе Д происходит разрушение бета- клеток в рез-те аутоиммунных реакций.

Нарушение синтеза гликогена и жиров при дефиците Инсулина.

Для всех форм СД характерна сниженная толерантность к Глюкозе, т.е. гиперглюкоземия после приема пищи или даже натощак.

Другими характерным признаком СД является повышенная концентрация в крови ЛПОНП, СЖК и главные кетоновых тел. Повышенное содержание ЖК в крови ведет к поглощению их печенью, где из них синтезируются ТГ (в адипоцитах), который далее в составе ЛПОНП секретируются в кровь. Другая часть ЖК вступает на путь бета- окисления в митохондриях печени, образуется СНЗ-СО-SКоА, из которого далее синтезируются кетоновые тела.

Коматозные состояния (острые осложнения) при СД как результат нарушения обмена глюкозы и жиров

При СД возможна **гипергликемическая кома** (глюкоза в крови 20-30 ммоль/л, иногда и более) . При инсулинотерапии может быть **гипогликемическая кома**, связанная с передозировкой ИНС.

Ацидоз при диабетической коме- это накопление органических кислот: кетоновых тел, лактата, пирувата, конц-я кетоновых тел- 2ммоль/л, что в 200 раз превышает норму. Она повышается как следствие повышенного синтеза кетоновых.тел в печени, но и является результатом олигурии и анурии, которые часто бывают при коме. рН крови снижается до 7.0 и ниже (при норме 7.4)

Первое проявление болезни в 15-30% случаев сопровождается кетоацидозом и комой. Смертность от диб. комы остается высокой 1-30% Основной причиной смерти больных СД в настоящее время являются поздние осложнения.

Поздние осложнения СД подразделяют на две группы:

- микрососудистые поражения ,приводящие к возникновению нефропатии,невропатии,ретинопатии;
- микрососудистые осложнения,связанные с развитием атеросклероза.

Диагностика сахарного диабета.

Концентрация Глюкозы больше 7. 2 ммоль/л указывает на СД.

И нет необходимости проводить тест толерантности к глюкозе.

Наличие гликозилированного Нв. Обычно уровень НвА1с, -5% от всего содержания Нв. При СД его концентрация увеличивается в 2-3 раза.

Инс и С-пептид секретируются бета- клетками в эквимольных количествах. В печени задерживается около 60% ИНс, поступающего с кровью воротной вены из поджелуд. железы. Поэтому отношение С-петид/ Инс в воротной вене и периф. кровообращении при н.ус. равно примерно—3/1. С-пептид удаляется обычно через почки его суточная секреция-45 мкг и пропорц. суточной секреции ИНС.

Альбуминурия.- ранний признак СД. В норме с мочой-выводится в среднем 8мг А. При выделении 30-300мг, микроальбуминурия. Причем через 10 лет после постановки диагноза увеличивается на 15-40% в год.

Гликогеновые болезни.

Гликогеновые болезни относятся к наследственным нарушениям обмена. Они делятся на две основных группы: 1. *Гликогенозы* – развиваются в результате недостаточной активности или *отсутствия ферментов*, ответственных за *распад* гликогена. 2. *Агликогенозы* – результат *недостаточности ферментов синтеза* гликогена.

Характерным для всех гликогенозов является гепатомегалия, мышечная слабость, гипогликемия натощак. Введение адреналина таким больным вызывает не гипергликемию, а гиперлактатацидемию. Жизнь таких больных укорачивается.

При **агликогенозах** в результате нарушения синтеза гликогена страдают энергетические ресурсы клетки.

Мукополисахаридозы.

Это врожденные заболевания человека, характеризующиеся избыточным накоплением и выделением олигосахаридных фрагментов протеогликанов, Встречается при недостатке одного или нескольких лизосомальных ферментов. Эти заболевания связаны с нарушением деградации дерматансульфата, либо гепарансульфата (или обоих), последние накапливаются внутри лизосом. Иногда фрагменты этих веществ после частичного расщепления гиалуронидазой находят в моче. Мукополисахаридозы могут быть диагностированы в период беременности при определении активности соответствующих ферментов в клетках амниотической жидкости.

2. ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ ЗАНЯТИЯ

1. Определение глюкозы в моче индикаторными тест-полосками.

Полоски индикаторные предназначены для визуального качественного или полуколичественного определения глюкозы в моче человека (уровня сахара в моче).

Они могут быть использованы для экспресс-анализа уровня глюкозурии и косвенно степени гипергликемии в медицинских учреждениях и в домашних условиях.

Полуколичественное определение глюкозы в моче дает возможность контролировать уровень глюкозурии, выбрать соответствующую диету, а также корректировать ход лечения.

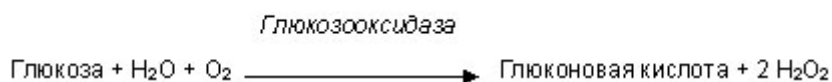
Перед проведением анализа наберите мочу в чистую емкость (не более чем за 2 часа до проведения анализа).

1. Возьмите одну тест-полоску и погрузите ее в воду на 2-3 секунды — так, чтобы индикаторный элемент оказался в моче;
2. Извлеките тест-полоску и стряхните излишек жидкости с сенсорного элемента или ребром промокните о чистую впитывающую бумагу;
3. Через 1 минуту сравните окраску индикатора с цветовыми полями шкалы на упаковке либо используя анализатор мочи.

2.Определение глюкозы в крови глюкозооксидазным методом.

Глюкозооксидазный метод

Сегодня наибольшее распространение получили методы, основанные на использовании фермента – глюкозооксидазы. В основе метода лежит следующая реакция:



Глюкозооксидаза катализирует перенос двух водородных атомов с первого углеродного атома глюкозы на кислород, растворенный в жидком реагенте. При этом в ходе реакции образуется в эквимольных количествах перекись водорода. Т.е. концентрация образовавшейся перекиси водорода точно равна определяемой концентрации глюкозы. Следовательно, использование глюкозооксидазной реакции, трансформировало задачу определения концентрации глюкозы в задачу определения концентрации перекиси водорода, которая, как будет показано ниже, значительно проще первой. И здесь есть несколько способов, широко используемых сегодня в лабораторной практике (см. схему).



Среди вышеперечисленных способов регистрации наибольшее распространение получил фотометрический биохимический метод, в котором молекулы перекиси водорода под действием фермента пероксидазы расщепляются с образованием активной формы кислорода – супероксид анион-радикала – O_2^- , который в свою очередь окисляет хромоген, что приводит к значительному изменению спектра поглощения хромогена.

Большая популярность данного метода определения глюкозы объясняется его высокой специфичностью и простотой выполнения. Метод можно реализовать как с применением обычного фотометра

(лучше специализированного биохимического фотометра типа Микролаб 540), так и с помощью автоматических биохимических автоанализаторов.

Глюкозооксидазный метод признан сегодня одним из самых точных количественных методов определения глюкозы. В качестве биологического материала используется как сыворотка крови, так и цельная кровь. При работе с последней следует учитывать тот факт, что при взятии капиллярной крови доля сыворотки (плазмы) зависит от величины гематокрита, что может негативно отразиться на точности результата. Поэтому при определении глюкозы вышеописанным методом предпочтительно использовать сыворотку крови пациента.

Определение глюкозы набором ГЛЮКОЗА АГАТ

Набор предназначен для количественного и качественного колориметрического определения концентрации глюкозы в сыворотке и плазме крови, цельной крови и моче человека глюкозооксидазным методом в клинико-диагностических и биохимических лабораториях и в научно-

исследовательской практике. Набор рассчитан на проведение 400 определений при расходе 1,0 мл рабочего раствора на один анализ.

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Глюкозооксидаза окисляет D-глюкозу до глюкуроновой кислоты с образованием перекиси водорода; последняя под действием пероксидазы реагирует с 4-аминоантипирином и фенолом с образованием соединения красного цвета, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации глюкозы в анализируемом образце и измеряется фотометрически при длине волны 510 (470–540) нм.

СОСТАВ НАБОРА

- 1. Концентрат буфера с фенолом** (фенол — 20,7 г/л, калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный — 137 г/л, калий фосфорнокислый однозамещенный — 55 г/л), 10 мл — 2 флакона.
- 2. Субстратно-ферментная смесь сухая** (4-аминоантипирин — 0,032 г, глюкозооксидаза — 3000 МЕ, пероксидаза — 300 МЕ) — 2 флакона.
- 3. Антикоагулянт сухой** (натрий хлористый — 4,2 г, натрий фтористый — 0,11 г, этилендиамин-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты динатриевая соль 2-водная — 0,2 г) — 1 упаковка.
- 4. Калибровочный раствор глюкозы** (глюкоза — 10 ммоль/л, бензойная кислота — 1,8 г/л), 2,0 мл — 1 флакон.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Линейная область определения концентрации глюкозы — в диапазоне от 2 до 20 ммоль/л, отклонение от линейности — не более 5%.

Чувствительность определения — не более 1 ммоль/л.

Воспроизводимость: коэффициент вариации не более 5%.

Нормальные величины концентрации глюкозы составляют:

- для сыворотки крови и плазмы крови 3,9–6,1 ммоль/л;
- для цельной крови 3,3–5,5 ммоль/л;
- для мочи не более 0,5 ммоль/л.

Качество набора можно оценивать по контрольным сывороткам отечественного или зарубежного производства, аттестованными данным методом. Рекомендуется в каждой лаборатории уточнить диапазон нормальных величин у обследуемого контингента.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

При работе с набором необходимо соблюдать правила техники безопасности, рекомендуемые при работе с кровью в соответствии с «Инструкцией по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клиничко-диагностических лабораториях лечебных и профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР от 17.01.91 г. и «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (М., 1981 г.). При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять или передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАГЕНТЫ

- Спектрофотометр, длина волны 510 нм, или фотоэлектроколориметр, длина волны 470–540 нм (зеленый светофильтр), кювета с толщиной поглощающего свет слоя 10 или 5 мм;
- пипетки, позволяющие отбирать объем жидкости 0,01 и 1,0 мл;
- колбы мерные вместимостью 200 и 500 мл;
- пробирки центрифужные вместимостью 5–10 мл;
- термостат, обеспечивающий температуру +37° С;
- центрифуга лабораторная на 3000 об/мин;
- секундомер; — вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Негемолизированная сыворотка или плазма крови, цельная кровь, моча.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

Рабочий раствор. В мерной колбе вместимостью 200 мл последовательно растворить в дистиллированной воде содержимое одного флакона концентрата буфера с фенолом и одного флакона сухой субстратно-ферментной смеси, затем довести объем дистиллированной водой до метки.

Рабочий раствор можно хранить в темном месте в плотно укупоренной посуде при температуре +2–8° С не более 1 месяца.

Антикоагуляционный раствор (для определения глюкозы в цельной крови). Содержимое упаковки с сухим антикоагулянтом количественно перенести в мерную колбу вместимостью 500 мл, растворить в дистиллированной воде и довести объем дистиллированной водой до метки. Антикоагуляционный раствор можно хранить в плотно укупоренной посуде при температуре +2–8° С не более 3 месяцев.

Калибровочный раствор глюкозы готов к применению.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1. Определение глюкозы в сыворотке (плазме) крови и моче.

Компоненты реакционной смеси внести в пробирки в количествах, указанных в таблице 1.

Таблица 1

Отмерить, мл	Опытная проба	Калибровочная проба	Контрольная (холостая) проба
Сыворотка (плазма) крови	0,01	-	-
Калибровочный раствор глюкозы	-	0,01	-
Вода дистиллированная	-	-	0,01
Рабочий раствор	1,00	1,00	1,00

Содержимое пробирок тщательно перемешать и инкубировать в течение 15 минут при температуре +37° С или в течение 30 минут при комнатной температуре (+18–25° С). Через 5–10 минут после начала инкубации пробирки интенсивно встряхнуть. После окончания инкубации измерить величину оптической плотности калибровочной и опытных проб против контрольной (холостой) пробы при длине волны 510 (470–540) нм в кювете с толщиной поглощающего свет слоя 10 или 5 мм. Окраска устойчива в течение 1 часа после окончания инкубации.

Концентрацию глюкозы рассчитать по формуле:

$$C = \frac{E_o}{E_k} \times 10,0$$

где: С — концентрация глюкозы в опытной пробе, ммоль/л;

Е_о — оптическая плотность опытной пробы, ед.опт.плотн.;

Е — оптическая плотность калибровочной пробы, ед.опт.плотн.;

10 — концентрация глюкозы в калибровочном растворе, ммоль/л.

Примечание: при использовании кювет другого объема расход реагентов может быть пропорционально изменен с сохранением соотношения объема анализируемого образца к объему рабочего раствора 1:100.

2. Определение глюкозы в цельной крови.

Компоненты реакционной смеси внести в пробирки в количествах, указанных в таблице 2.

Таблица 2

Отмерить, мл	Опытная проба	Калибровочная проба	Контрольная (холостая) проба
Цельная кровь	0,1	-	-
Калибровочный раствор глюкозы	-	0,1	-
Антикоагуляционный раствор	0,9	0,9	0,1
Центрифугировать опытные пробы в течение 10 минут при 3000 об/мин			
Надосадочная жидкость	0,1	0,1	-
Рабочий раствор	1,00	1,00	1,00

Дальше определение, измерение оптической плотности и расчеты проводить так, как это указано для сыворотки (плазмы) крови.

3. Качественное определение глюкозы в моче.

В центрифужной пробирке смешать 0,2 мл рабочего раствора, 0,02 мл мочи и инкубировать в течение 15–20 минут при комнатной температуре (+18–25° С). Пробы мочи, вызывающие покраснение реакционной смеси, считать положительными.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Набор должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2–8° С в течение всего срока годности. Допускается хранение наборов при температуре +25° С не более 5 суток. Срок годности набора — 2 года. Рабочий раствор может храниться в темном месте в плотно закупоренной посуде при температуре +2–8° С не более 1 месяца. Антикоагуляционный раствор может храниться в плотно закупоренной посуде при температуре +2–8° С не 3 трех месяцев. Калибровочный раствор глюкозы после вскрытия флакона может храниться в закупоренном виде при температуре +2–8° С не 3 трех месяцев. При получении значений концентрации глюкозы выше 20 ммоль/л анализируемый образец необходимо развести дистиллированной водой в соотношении 1:1, повторить анализ и полученный результат умножить на 2.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Практика лабораторных биохимических исследований: учебное пособие. Пустовалова Л.М. – Ростов н/Д.: Феникс, 2014
2. Теория лабораторных биохимических исследований (основы биохимии): учебное пособие. Пустовалова Л.М. – Ростов н/Д.: Феникс, 2014
3. Теория и практика лабораторных биохимических исследований учебник/Н.В.Любимова, И.В.Бабкина, Ю.С.Тимофеев-М.: ГЭОТАР-Медиа, 2020. 416с.: ил.

1.ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ПО РАЗДЕЛУ ОБМЕН УГЛЕВОДОВ

Выберите правильный ответ

1. При гидролизе лактозы образуются:

- а) галактоза
- б) фруктоза
- в) манноза
- г) сахароза
- д) глюкоза

2. Сахароза в организме может расщепляться только в:

- а) мозге
- б) печени
- в) мышцах

- г) кишечнике
- д) селезенке

3. Наибольшее содержание гликогена в организме человека (по массе) в:

- а) печени
- б) в мышцах
- в) мозге
- г) почках
- д) жировой ткани

4. При гидролизе сахарозы образуются:

- а) галактоза
- б) манноза
- в) фруктоза
- г) глюкоза
- д) сорбоза

5. Глюкоза может образоваться в организме из:

- а) ацетил-КоА
- б) пирувата
- в) лактата
- г) глицерина
- д) лейцина

6. Дисахариды:

- а) лактоза
- б) мальтоза
- в) фруктоза
- г) крахмал
- д) сахароза

7. Глюкоза образуется при переваривании:

- А. Сахарозы
- Б. Крахмала
- В. Мальтозы
- Г. Лактозы
- Д. Изомальтозы

8. Выберите правильные ответы.

Инсулинзависимые переносчики глюкозы имеют клетки:

- А. Кишечника

- Б. Мозга
- В. Жировой ткани
- Г. Скелетных мышц
- Д. Поджелудочной железы

9. Выберите правильные ответы.

Пути использования глюкозы в клетке:

- А. Превращается в другие углеводы
- Б. Депонируется в виде гликогена
- В. Используется как основной источник энергии
- Г. Превращается в жиры при избыточном поступлении
- Д. Используется для синтеза нуклеотидов

10. Выберите правильные ответы.

Транспорт глюкозы в клетки слизистой оболочки кишечника происходит:

- А. С участием белков-переносчиков
- Б. Путем активного транспорта, когда ее концентрация в просвете кишечника меньше, чем в клетках
- В. Путем простой диффузии, если ее концентрация в клетках низкая
- Г. Независимо от инсулина

2. Задания и упражнения

1. Назовите классификацию углеводов.
2. Назовите примеры моно-, олиго-, полисахаридов.
3. Перечислите основных представителей гетерополисахаридов.

3. Продолжите фразу:

1. Переваривание углеводов начинается...
2. В кислой среде желудка амилаза...
3. В тонком кишечнике оптимальная среда для...
4. Дисахариды в тонком кишечнике расщепляются под действием...
5. Глюкоза проникает в клетки тканей под действием...
6. Основные пути превращения глюкозы это...
7. Дитохимический путь распада глюкозы (гликолиз) - это...
8. Исходным субстратом для цикла Кребса служит...
9. Окислительное фосфорилирование это такой путь образования АТФ, когда...
- ...

10. Глюконеогенез это...
11. Инсулин это единственный гормон. который...
12. Нормальный уровень глюкозы в крови...
13. Инсулинзависимый сахарный диабет это...
14. Гликогеновые болезни это...
15. Если концентрация глюкозы в крови больше 7,2 ммоль/л, можно думать что у пациента...
16. Наибольшее распространение получил... метод определения глюкозы

РАЗДЕЛ 3. Особенности проведения контроля качества лабораторных биохимических исследований.

Практическое занятие №8-10: Контроль качества, как система мер по управлению качеством клинических лабораторных исследований. Организация и проведение внутрилабораторного контроля.

Формируемые профессиональные компетенции: 2.1, 2.2, 2.3.

Учебные цели (знать, уметь, иметь практический опыт):

Знать	Уметь	Владеть навыками
1-8,14,15	1-12,16	1-9

Воспитательная цель Привитие умений и навыков учебной работы и коллективного труда. Формирование целостного миропонимания и современного научного мировоззрения, основанного на признании приоритетов общечеловеческих ценностей: гуманности, милосердия, сострадания, уважения к жизни и здоровью человека.

Развивающая цель Формирование навыков самообразования, самореализации личности и развитие речи, мышления, памяти

Межпредметные связи ОПД. 03 Химия, ОПД. 16 Физико-химические методы исследования и техника лабораторных работ, ОПД . 02 Анатомия.

Вопросы для подготовки к занятию

1. Основные правила техники безопасности при работе в лаборатории.
2. Цель, задачи контроля качества.
3. Нормативные документы по вопросам контроля качества.
4. Требования к организации контроля качества.
5. Преаналитический и аналитический этапы лабораторных исследований.
6. Ошибки лабораторных исследований.
7. Критерии контроля качества.
8. Погрешности лабораторных исследований.
9. Виды контрольного материала.
10. Последовательность проведения внутрилабораторного контроля качества методом контрольных карт.
11. Правила Westgard.
12. Методы контроля качества ,не требующие контрольного материала.

Список понятий для усвоения темы

Надежность, точность, правильность, сходимост, воспроизводимост, Хсред нее, среднеквадратичное отклонение, Коэффициент вариации.

1. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Контроль качества лабораторных исследований – это система мер по оценке и контролю качества выполнения лабораторного анализа на всех этапах его осуществления – от периода подготовки пациента к процедуре взятия биологического материала до использования полученных результатов врачами.

Задачами контроля качества клинических лабораторных исследований являются:

- обеспечение качества лабораторных исследований;
- обеспечение преемственности результата;
- оценка надежности используемых лабораторных методов;
- оценка надежности результатов исследования;
- управления качеством анализов.

В 1945 г. Белк и Сандермен осуществили первый межлабораторный контроль качества лабораторных исследований в США. Опыт проведения такого контроля постоянно расширялся, и в 1949 г. в нем были задействованы 515 лабораторий, которые участвовали в контроле по 10 компонентам сыворотки крови.

В этот же период Леви-Дженнингс ввел в практику контроля качества контрольные карты, разработанные Шухартом, а Копеленд разработал методику получения слитой сыворотки и расчет среднеквадратичного отклонения. Тем самым были заложены научные основы предмета.

К 1967 г. межлабораторный контроль качества стал повсеместным в США, во многих странах Европы

. В нашей стране контроль качества результатов лабораторных исследований был введен приказом МЗ СССР «380 от 23.04.75 г. «О состоянии и перспективах развития клинико-диагностической службы в стране», регламентирующим обязательность его регулярного проведения во всех клиникодиагностических лабораториях учреждений здравоохранения страны. Документом, знаменующим начало нового этапа контроля качества лабораторных исследований в России, стал приказ МЗ

РФ №45 от 07.02.2000 г. «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации». Этот приказ систематизирует комплекс мер по управлению качеством клинических лабораторных исследований, охватывающий всю вертикаль системы здравоохранения—от федерального уровня до отдельной клинико-диагностической лаборатории.

Приказом МЗ РФ №45 от 07.02.2000 г. также введено «Положение об организации управления качеством клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации», четко конкретизирующее управление качеством и контроль качества исследований на данном этапе развития клинической и лабораторной медицины в РФ.

В настоящее время осуществлена разработка и внедрение отраслевого стандарта ОСТ 91500.13.0001–2003 «Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов», утвержденного в 2003 г., целью которого является введение единых правил проведения внутрилабораторного контроля качества во всех КДЛ ЛПУ страны.

Главное условие улучшение качества – коллективное участие в этой работе всех специалистов технологического процесса производства анализов. Поэтому в современной лабораторной диагностике все большая роль отводится улучшению взаимодействующих связей: врачебный участок– лаборатория–пациент, именно эти точки соприкосновения являются наиболее обещающими предпосылками для улучшения качества.

Основным методом, применяемым в контроле качества исследований, является статистический метод.

Контроль качества лабораторных исследований в настоящее время стал одной из неотъемлемых составляющих работы КДЛ. Он осуществляется наиболее квалифицированными специалистами лаборатории

Контроль качества лабораторного исследования осуществляется ежедневно в соответствии с анализом и включает следующие этапы:

1. Преаналитический (контроль подготовки пациента, взятия биологического материала, его предварительной обработки, транспортировки и хранения).
2. Аналитический (контроль процедуры дозирования, проведения реакции, т.е. перемешивания, термостатирования, соблюдения времени реакции, процедуры измерения и др. и расчет результатов).
3. Постаналитический (контроль правильности оформления бланка с результатами, их лабораторно-клинической интерпретации, доведения информации до сведения врача).

На каждом из этих этапов могут возникнуть ситуации, приводящие в последующем к ошибкам определения показателей лабораторных тестов, а, следовательно, и ошибкам в диагностике и лечения заболеваний. По данным многих исследователей от 70% до 85% ошибок в лабораторной медицине связаны с внелабораторным этапом лабораторнодиагностического процесса, не проведением или неправильным проведением преаналитического контроля качества. 15-30% ошибок лабораторных исследований связаны с аналитическим этапом лабораторно-диагностического процесса, контроль качества работы лабораторий на данном этапе является одним из важнейших мероприятий по достижению достоверности лабораторных исследований, которая является обязательной для всех специалистов лабораторной службы, в том числе с специалистов со средним медицинским образованием. Большое значение в обеспечении качества лабораторных исследований имеет унификация клинических лабораторных методов

Классификация ошибок, встречающихся в КДЛ

Выполняя лабораторное исследование, сотрудник клинической лаборатории стремится к наиболее точному воспроизведению аналитических процедур для получения достоверного результата анализа. Но даже те лаборатории, которые всю свою аналитическую работу выполняют в соответствии с существующими требованиями, не застрахованы от ошибок. На результаты анализа могут влиять как внелабораторные, так и внутрिलाбораторные ошибки исследования. Ошибки, встречающиеся в лаборатории, делятся на три основные группы:

- канцелярские ошибки;
- ошибки сбора проб;
- аналитические ошибки (систематические и случайные).

Наиболее часто встречаются аналитические ошибки, связанные с неправильной работой аппаратуры, неправильной калибровкой, неправильным приготовлением проб и реактивов для исследования, нарушением техники исследований

Классификация и характеристика аналитических ошибок

В соответствии с общепринятыми правилами различают аналитические ошибки:

- грубые;
- случайные;
- систематические.

Грубая ошибка – это одиночное значение исследуемого компонента, выходящее за пределы установленной для данного компонента области (за допустимые пределы погрешности). Причиной грубых ошибок является недостаточная тщательности в работе, как, например, неправильная дозировка, ошибки, в подсчете, небрежность в проведении методики исследования.

Случайная ошибка – одиночное значение, не выходящее за пределы установленной для данного исследуемого компонента области, но стремящееся к выходу за эти пределы, в появлении каждой из таких ошибок не наблюдается какой-либо закономерности. Случайные ошибки происходят при всяком измерении, и в том числе при любом аналитическом определении, как бы тщательно оно не проводилось

Различные между собой результаты обусловлены:

- свойствами самой пробы (неоднородностью, неравномерностью перемешивания);
- некачественным инструментарием (неточностью пипеток, мерных колб
- объемная ошибка, термоизмерительной аппаратуры
- температурная ошибка, нестабильностью фотометрических приборов);
- неточностью работы персонала лаборатории (неточное пипетирование
- ошибка пипетирования, неправильное считывание результатов исследования
- ошибка утомления, использование слишком коротких шкал
- ошибка считывания, при оказании предпочтения каким-либо числам
- психологическая ошибка.

Систематическими ошибками называют погрешности, одинаковые по знаку, происходящие от определенных причин, влияющих на результаты либо в сторону увеличения, либо в сторону уменьшения его. Систематические ошибки обычно можно предусмотреть и устранить или же ввести соответствующие поправки.

КРИТЕРИИ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Точность измерений - качество измерений, отражающее близость их результатов к истинному значению измеряемой величины, при котором малы все виды погрешностей систематические и случайные (правильность и воспроизводимость близки к идеальным). Если все стрелы легли рядом, но достаточно далеко от центра мишени. В этом случае имеет место плохая правильность стрельбы при хорошей воспроизводимости.

Правильность - качество измерений, отражающее близость к нулю систематических погрешностей в их результатах, то есть соответствие среднего значения результатов измерений с истинной величиной измеряемого параметра. Причиной отклонения от правильного результата был один и тот же фактор, который называют систематической ошибкой;

Если стрелы летели в целом в правильном направлении, но при этом попадали в самые разные части мишени. Такая ситуация характеризуется плохой сходимостью/воспроизводимостью при достаточной правильности.

Сходимость - качество измерений, отражающее близость друг к другу результатов измерений, выполненных в одинаковых условиях (стрельба по одной мишени в одно время из одного лука) .

Воспроизводимость - качество измерений, отражающее близость друг к другу результатов измерений, выполненных в разных условиях (стрельба по разным мишеням в разное время) . Различают воспроизводимость в серии (сходимость), во времени (день ото дня) и межлабораторную воспроизводимость. Причин плохой воспроизводимости больше, чем плохой сходимости, но в том и другом случае их может быть несколько, а все вместе их определяют термином случайная ошибка.

Стрелы вообще не попали в мишень . Такие, так называемые грубые ошибки, в целом свойственны человеческой натуре и их никак нельзя полностью исключить, но, используя соответствующие организационные меры, можно попытаться свести их к минимуму.

Главными аналитическими характеристиками являются воспроизводимость и правильность. По рекомендации Международной федерации клинической химии (IFCC) воспроизводимость выражается в виде стандартного отклонения или коэффициента вариации результатов повторных измерений одной и той же пробы, а правильность - в виде разности между средним значением серии повторных измерений и истинным значением.

Принципы статистического анализа

Имеется определенная степень ненадежности в каждом лабораторном исследовании. Повторное исследование образца в идентичных условиях (тот же лаборант, использующий то же оборудование и реактивы) дает неидентичные результаты вследствие влияния случайной погрешности, которая присуща всем измерительным процессам.

Результаты лабораторных исследований образуют, вариационный ряд с характерным для него расположением большинства величин вблизи его центральной части и рассеиванием к краям ряда, создавая определенное распределение. Подобные распределения, отражающие самые разнообразные явления случайного характера, протекающие в природе, называют нормальными распределениями, а закон их распределения – нормальным законом распределения случайных величин Гаусса.

Случайные погрешности количественного химического анализа и сами результаты анализа, как правило, распределены по нормальному закону. Кривая нормального распределения имеет колоколообразную форму и характеризуется двумя параметрами: – средней арифметической величиной (\bar{X}_{sp}); – средним квадратическим отклонением (S). **Средняя арифметическая величина** рассчитывается делением суммы всех результатов на число результатов по формуле.

Среднеквадратическое отклонение разброс результатов около средней величины при распределении Гаусса, рассчитывается по формуле.

Среднеквадратическое отклонение иногда выражают в виде процента относительно средней или **коэффициента вариации (V)**.

Контрольные материалы и их использование

Контрольным материалом является натуральный или искусственный однородный материал, содержащий те же компоненты, что и исследуемые пробы пациентов. Результат измерения контрольного материала

используется для оценки погрешности измерения лабораторного показателя в пробах пациентов. Контрольный материал нельзя использовать одновременно в качестве калибровочного материала.

При внутрилабораторном контроле могут использоваться контрольные материалы с аттестованными и неаттестованными значениями контролируемых показателей.

Аттестованным значением является значение измеряемой характеристики контрольного материала (концентрации вещества, ферментативной активности и т.п.), установленное при его аттестации и приводимое в паспорте на контрольный материал.

Контрольные материалы с аттестованными значениями показателей используются для контроля правильности и воспроизводимости результатов лабораторного анализа, а с **неаттестованными значениями** – только для контроля воспроизводимости.

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

Из требований предъявляемых к контрольным материалам и работе с ними, необходимо выделить следующие:

– уровни исследуемых компонентов в контрольном материале должны соответствовать значениям показателей в нормальном и патологическом диапазоне; За нормальный принимается диапазон значений лабораторного показателя, соответствующий состоянию здоровья обследуемого. За патологический

– диапазон, соответствующий состоянию болезни пациента. Методы определения показателей в контрольном материале должны соответствовать методам, применяемым в конкретной лаборатории.

Перечень компонентов в паспорте закупаемого контрольного материала должен соответствовать исследуемым в лаборатории показателям.

Количество закупаемого контрольного материала одной партии должно быть достаточным для проведения оперативного контроля качества в течение длительного времени (от 3 месяцев до 3 лет, в зависимости от стабильности контрольного материала).

Расчет количества необходимого контрольного материала проводится исходя из количества, подлежащих контролю в данной лаборатории.

Подготовка контрольного материала к исследованию проводится в соответствии с инструкцией производителя

. Контрольные материалы должны исследоваться так же, как пробы пациентов, т.е. в тех же аналитических сериях и условиях.

При реконструкции лиофилизированных форм для уменьшения величины погрешности дозирования необходимо использовать один и тот же поверенный дозатор.

Допускается однократное замораживание и оттаивание реконструированного контрольного материала. Однократное оттаивание замороженного контрольного материала следует проводить при комнатной температуре в водной среде при 20-25оС.

Методика замораживания и оттаивания должны быть стандартной для всех исследуемых показателей в соответствии с инструкцией производителя.

Для экономного использования реконструированного контрольного материала допускается разлить содержимое флакона на аликвоты. Объем аликвот должен помещаться в пробирки или флаконы соответствующего объема с герметичными крышками, которые хранятся при возможно более низких температурах (-20оС и ниже) для дальнейшего использования.

Материал, из которого изготовлены пробирки, не должен адсорбировать компоненты контрольного материала (кальций, альбумин и др.). При использовании реактивов и калибраторов одного производителя рекомендуется применять аттестованные контрольные материалы другого производителя.

Межлабораторный контроль качества.

Межлабораторные эксперименты по контролю качества. Лаборатории,

систематически участвующие в межлабораторных экспериментах по контролю качества исследований, могут использовать результаты контроля для оценки качества своей работы. Особенно ценными являются долгосрочные контрольные опыты.

Цель межлабораторного контроля качества: выявление систематических и случайных ошибок при контрольных определениях; достижение сравнимых результатов, получаемых участвующими лабораториями.

Анализ контрольных проб должен включаться в обычный ход работы лабораторий, производиться тем же персоналом, который выполняет повседневные исследования, и принципиально теми же методами, которые лаборатория использует в повседневной практике.

Статистическая обработка результатов исследования участвующих лабораторий. Основная цель статистической обработки — определение пределов выполнения контрольных исследований и выявление систематических и случайных ошибок. Статистическая обработка результатов проводится для выявления погрешностей, допущенных в работе лабораторий, и для оценки сравнимости участвующих лабораторий. Для этого производят следующее.

1. Результаты группируют по методам, используемым для определения того или иного компонента, и по типу системы (ручной или автоматической). Цель — снизить до минимума влияние различия самих методов и иметь возможность сравнения этих методов.
2. В каждой группе рассчитывают: \bar{X} — среднюю арифметическую величину; S — среднее квадратическое отклонение. Рассчитывают пределы $\bar{X} \pm 2S$.
3. Применяют метод исключения: все результаты, попавшие за пределы $\bar{X} \pm 2S$, исключают из дальнейших расчетов, а остальные служат для повторного вычисления новой средней арифметической и среднее квадратическое отклонение (\bar{X}_i и S_i).
4. Если после повторного пересчета найдутся результаты вне пределов $\bar{X}_i \pm 2S_i$, то их также исключают, как и в первый раз. Исключение и пересчет \bar{X} и S повторяют до тех пор, пока во всем массиве не будет ни одного результата, выходящего за допустимые пределы $\bar{X}_n \pm 2S_n$. Вычисленные после окончательного исключения средняя арифметическая и среднее квадратическое отклонение множества результатов служат для оценки сравнимости всех лабораторий в целом, а также для отдельных лабораторий (в случае, когда используется материал с неисследованным содержанием компонентов).

Оценка отдельных лабораторий. Результаты, полученные из каждой лаборатории, оценивают по отдельным параметрам путем сравнения их значений с допускаемыми пределами $\bar{X} \pm 2S$, рассчитанными для всего множества результатов после окончательного исключения. Критерием оценки могут служить также паспортные данные контрольного материала и результаты референтной лаборатории. По результатам контроля можно

определить частоту использования разных методов исследования и сравнить их воспроизводимость.

В настоящее время разработана количественная оценка качества результатов отдельных лабораторий.

Чем ближе величина к нулю, тем лучше сравнимость лаборатории с другими участниками, тем лучше качество результатов.

Указывая результаты для отдельных лабораторий и компонентов, можно классифицировать все участвующие лаборатории по качеству выполнения контрольных исследований.

Метод Юдена. Кроме статистической обработки, возможно графическое изображение результатов межлабораторного исследования, которое позволяет лаборатории сравнить свои данные с результатами референтных лабораторий, а также дает некоторое представление о том, что ошибочно в методике, если результаты непригодны. Для понимания графика не требуется особых статистических расчетов, но для практического его использования каждой лаборатории необходимо определить компонент в двух контрольных образцах (например, А и В). Методика построения графика Юдена представлена на рис. I. Строят систему координат, на оси абсцисс откладывают действительное значение компонента и интервалы среднеквадратического отклонения ($\pm 2S$) для пробы А, на оси ординат — те же показатели для пробы В. Действительные значения компонентов и сигмы берут из паспорта к контрольному материалу. Если используется контрольный материал с неисследованным содержанием компонентов, в качестве действительных величин используют X и S множества после исключений. Из двух точек X и $У$, представляющих действительные значения компонента для пробы А и В соответственно, проводят две взаимно перпендикулярные прямые. Из точки пересечения прямых проводят окружность с радиусом, равным $2S$. Прямую линию W проводят под углом 45° через пересечение средних прямых, деля нижний левый и верхний правый квадраты. Две дополнительные линии (S' и t) проводят вдоль периферии круга параллельно прямой W .

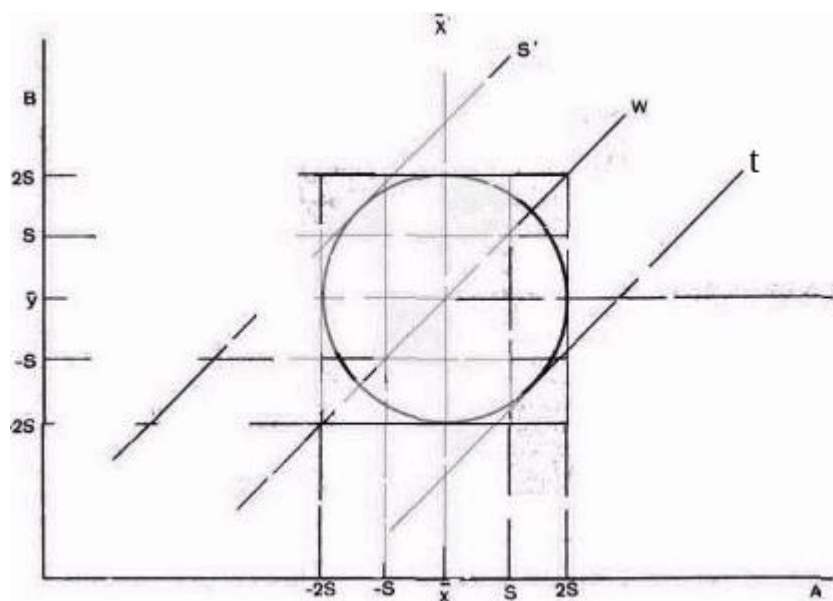


Рис. 1. График Юдена. На оси абсцисс — проба А — контрольная сыворотка А; на оси ординат — проба В — контрольная сыворотка В. \bar{X} — средняя арифметическая для пробы А; \bar{Y} — средняя арифметическая для пробы В; XX' и YY' — две взаимно перпендикулярные прямые; S — среднеквадратическое отклонение; W — прямая, которую проводят под углом 45° через пересечение прямых XX' и YY' ; S' и t — две касательные к окружности, проведенные параллельно прямой W .

Точки, попавшие в верхний левый и нижний правый квадраты, указывают на случайные ошибки, а попавшие в верхний правый и нижний левый квадраты — на систематические ошибки, допущенные лабораторией при исследовании контрольных проб.

Пары значений для А и В, полученные от каждого участника, наносят в виде точек на график. Если точки попали внутрь окружности, результаты пригодны. Если точки располагаются вне окружности, но между параллельными прямыми, это значит, что лаборатории получили завышенные или заниженные величины для обеих проб и что имеются систематические ошибки. Точки, близкие к прямой W , показывают, что лаборатория работает стабильно. Точки, попавшие в другие секции графика, не дают представления о составе образца и свойственны случайным ошибкам.

Таким образом, график Юдена позволяет наглядно дифференцировать систематические и случайные ошибки, допущенные в работе лабораторий, а также установить, какие лаборатории работают в допустимых пределах.

2. ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ.

Проведение контроля воспроизводимости и правильности, построение контрольных карт, оценка результатов .

Контроль воспроизводимости (Метод контрольных карт; установление контрольных пределов). После приготовления контрольной сыворотки устанавливают содержание в ней различных компонентов. В связи с тем что невозможно получить одну и ту же величину для каждого компонента из-за изменчивости лабораторных результатов, определяют допустимую область или контрольные пределы исследований. Для этого каждый компонент, исследуемый в лаборатории, определяют в контрольной сыворотке 20 раз в течение 2—3 нед.

Полученные результаты подвергают статистическому анализу на каждый компонент по следующей схеме:

1. определение средней (X) и среднеквадратического отклонения (S);
2. исключение сомнительных значений с помощью критерия T или если они попали за пределы $X \pm 2S$;
3. перерасчет средней и среднеквадратического отклонения;
4. определение контрольных пределов $X + 2S$.

Приготовление контрольных карт. После установления статистических параметров строят карту контроля качества, откладывая на оси абсцисс дни исследования, а на оси ординат — концентрацию компонента в соответствующих единицах. Через середину ординаты параллельно абсциссе проводят прямую (она означает среднюю и обозначается X), а вверх и вниз от средней и параллельно ей проводят (в соответствии с масштабом) прямые, которые обозначают $+1S$, $+2S$, $+3S$, $-1S$, $-2S$ и $-3S$.

Каждый результат, полученный при исследовании контрольного материала той же серии в последующие дни, отмечается на карте в виде точки и служит для оценки воспроизводимости лабораторных исследований.

Интерпретация результатов контрольных исследований. 95 % аналитических результатов исследования контрольной сыворотки должны находиться внутри контрольных пределов, т. е. результаты 19 из 20 анализов должны оказаться внутри $A \pm 2S$, причем результаты должны распределяться примерно с одинаковой частотой на каждой стороне от линии средней.

Контрольная карта дает возможность в очень наглядной форме своевременно выявить и предотвратить ошибки в выполнении методики и тогда, когда результаты анализов контроля не выходят за принятые границы.

Ниже приведены характерные примеры предупредительных и контрольных критериев, ориентируясь на которые можно даже без расчетов обнаружить изъяны в работе лабораторий.

1) О недостатках предупреждают следующие признаки:

- а) шесть результатов подряд — по одну сторону от линии средней;
- б) три результата подряд—за пределами одного среднеквадратического отклонения;
- в) один результат — за пределами двух среднеквадратических отклонений;
- г) шесть результатов подряд обнаруживают тенденцию однообразного отклонения по одну сторону от средней.

При наличии этих признаков результаты исследований можно выдавать в клинические отделения, однако необходимо тщательно проверить стандартные или калибровочные растворы, работу измерительных приборов.

2) Контрольные признаки, при которых результаты исследований ставят под сомнение и до исправления недостатков в отделение не выдают. К числу таких признаков относятся следующие:

- а) восемь результатов подряд — по одну сторону от линии средней;
- б) пять результатов подряд — за линией одного среднеквадратического отклонения;
- в) три результата выходят за пределы двух среднеквадратических отклонений;
- г) один результат выходит за пределы трех среднеквадратических отклонений.

Когда аналитическая система функционирует должным образом, результаты контрольной сыворотки не нарушают вышеуказанные статистические правила. Когда распределение результатов нарушает эти правила, то анализ вышел из-под контроля.

Контроль правильности. Кроме контрольной слитой сыворотки собственного приготовления, лаборатории могут использовать контрольные сыворотки промышленного изготовления. Эти сыворотки бывают двух видов: с исследованным и неисследованным содержанием компонентов. Сыворотка с

исследованным содержанием используется так же, как и неисследованная; различие состоит только в том, что в ней среднюю и среднеквадратическое отклонение определяет производство и все исследованные значения для каждого теста с указанием метода исследования представлены в паспорте, прилагаемом к сыворотке.

Ежедневный анализ контрольной сыворотки с неисследованным содержанием помогает поддерживать на должном уровне сходимость и воспроизводимость исследований. Применение контрольной сыворотки с исследованным содержанием позволяет гарантировать также и правильность результатов, получаемых в лаборатории.

Исследование правильности целесообразно проводить в условиях хорошей сходимости результатов. Контроль правильности осуществляет периодически работник лаборатории в следующих случаях: а) если результаты исследования контрольного материала выходят за пределы $\pm 2S$; б) при налаживании нового метода; в) при использовании новой измерительной аппаратуры, новой партии реактивов и т. д. При этом следует сделать не менее 10 параллельных исследований методом, указанным в инструкции, прилагаемой к контрольной сыворотке. Эти же данные могут быть использованы для оценки сходимости. Контроль правильности должен осуществляться во всем диапазоне прямолинейного хода калибровочного графика. Для этого используют контрольную сыворотку с нормальным и патологическим содержанием компонентов.

Статистическим критерием правильности исследований является средняя арифметическая (\bar{X}) и степень ее отклонения от истинного (номинального) значения.

Методы, не требующие контрольных материалов.

Исследование параллельных проб позволяет оценить воспроизводимость результатов исследований с помощью образцов крови больных. Для этого отбирают 10 контрольных проб и каждую пробу исследуют дважды.

Сначала находят разницу между значениями каждой пары, опуская знаки; затем разницу возводят в квадрат, все складывают и делят на $2n$ (n — число пар), так как каждая пара представляет собой индивидуальную переменную и каждый член пары имеет свою собственную вариабельность. Затем рассчитывают среднее отклонение различий и строят контрольную карту для оценки воспроизводимости. Разницу между двумя анализами для одной и той же

пробы, отмечают каждый день на карте. Результаты, попадающие за границы контрольных пределов, с 95 % вероятностью покажут существование каких-то нарушений в аналитической системе. В этом случае возможную причину большого разброса результатов, и исследование повторяют более тщательно.

Исследование случайной пробы. Метод этот аналогичен предыдущему методу параллельных проб. Разница заключается том, что вместо анализа всех проб лаборант выборочно исследует повторные пробы (одну или две пробы за неделю). Эти пробы могут быть случайно выбраны заведующим лабораторией без ведома лаборанта. Таким путем заведующий лабораторией оценивает воспроизводимость результатов, получаемых лаборантами.

Исследование повторных проб. Принцип метода состоит в повторном исследовании нескольких случайно выбранных проб. Сравнивая соответствующие пары результатов, получают объективные данные о качестве проведенных исследований. Повторные исследования проб должны проводиться после выполнения анализов текущего дня.

Метод повторных определений дает возможность оценить качество работы аппаратуры и лаборанта во время исследований. Метод может использоваться в любой лаборатории независимо от количества производимых анализов. Недостатком его является невозможность контроля правильности полученных результатов.

Исследование смешанной пробы. При оценке воспроизводимости методом дублированных проб получают более близкие значения, чем обычно получают при наличии случайных ошибок. В методе смешанной пробы это исключено. Метод состоит в следующем: из группы образцов случайно выбирают два — А и В; из каждого образца А и В берут равные объемы и смешивают (образец С); исследуют все три образца.

Использование постоянных величин (констант). Некоторые гематологические показатели у здоровых людей колеблются в незначительных пределах, и эти пределы колебаний используют в целях контроля качества исследований.

Для этого требуется отобрать не менее 11 проб крови здоровых взрослых людей. Пробы считаются нормальными, если отвечают следующим условиям: число эритроцитов — $4 \times 10^{12}/л$ и выше, гематокрит — 36 или выше, эритроциты в мазке — норма; среднее содержание гемоглобина в эритроците (ССГЭ) — 26—32 пг или средняя концентрация гемоглобина в эритроците (СКГЭ) — 32—36 %, определяется также общее содержание гемоглобина. При соблюдении этих условий средние величины (константы) вышеперечисленных параметров в 11 отобранных пробах (или для большего количества

проб) должны быть следующими: для ССГЭ — 29— 30 пг; для СКГЭ—32— 33%.

Кроме того, в область $X \pm 2S$ должны входить приблизительно нормальные величины. Контрольную карту готовят с использованием этих пределов.

Для каждой серии проб, содержащей достаточно данных, рассчитывают среднюю арифметическую и среднеквадратическое отклонение; если один из двух параметров окажется вне контроля, то проводят соответствующие мероприятия по выявлению причин ошибок. Метод очень чувствителен даже к небольшим постоянным ошибкам и помогает выявлять слишком суженные нормальные области.

Метод средних нормальных величин (по данным обследования больных) основан на статистическом анализе результатов проб больных. Предполагается, что средняя величина, полученная по данной методике за один день или за определенное время, при большом объеме работы лаборатории (не менее 30 определений) приблизительно постоянна изо дня в день. Если при выполнении анализа будет допущена систематическая ошибка, то это выразится в сдвиге средней величины результатов.

Для построения контрольной карты необходимо в течение 20 дней ежедневно рассчитывать среднюю нормальных величин, данного компонента (не менее 16 величин), где нормальную область рассматривают в пределах $X \pm 2S$. Величины, выходящие за эти пределы, отбрасывают. Затем следует рассчитать среднюю арифметическую и среднеквадратическое отклонение средних за 20 дней. Стандартную ошибку средних для группы нормальных величин рассчитывают по формуле:

$$m = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

где n — число нормальных величин в группе.

Затем рассчитывают контрольные пределы $X \pm 2m$. Выбор пределов $2m$ делает метод более чувствительным и увеличивает частоту выявления внеконтрольных величин. После построения контрольной карты ежедневно находят среднюю арифметическую нормальных результатов данного компонента и откладывают на карте. Чем больше результатов входит в расчет средней, тем более эффективной становится средняя в определении действительной области.

Метод средней арифметической нормальных величин дает возможность обнаруживать ошибки, не выявленные другими методами контроля, и является достаточно эффективным контролем на всех этапах исследования проб больных.

Пример контрольной карты



ЛИТЕРАТУРА.

1. Практика лабораторных биохимических исследований: учебное пособие. Пустовалова Л.М. – Ростов н/Д.: Феникс, 2014
2. Теория лабораторных биохимических исследований (основы биохимии): учебное пособие. Пустовалова Л.М. – Ростов н/Д.: Феникс, 2014
3. Теория и практика лабораторных биохимических исследований учебник/Н.В.Любимова,И.В.Бабкина,Ю.С.Тимофеев-М.:ГЭОТАР-Медиа,2020.416с.:ил.
4. Статистическая обработка данных при проведении контроля качества в лабораторной диагностике. Учебно-методическое пособие /Л.Ф.Сизых,М.А.Ружникова,С.В.Круглова:Иркутск ИГМУ2011.

1.ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ ПО РАЗДЕЛУ ОБМЕН УГЛЕВОДОВ

1. На результаты анализа могут повлиять следующие факторы внелабораторного характера:

- А) физическое и эмоциональное напряжение больного
- Б) положение тела
- В) прием медикаментов
- Г) все перечисленное

2. На результаты анализа могут влиять следующие факторы внутрилабораторного характера:

- А) условия хранения пробы
- Б) характер пипетирования
- В) гемолиз, липемия
- Г) все перечисленное

3. При работе с контрольной сывороткой возможны погрешности:

- А) потери вещества при открывании ампулы
- Б) несоблюдение времени растворения пробы и хранение при комнатной температуре
- В) многократное замораживание контрольной сыворотки
- Г) все перечисленное

4. Для проведения контроля правильности биохимических исследований рекомендуется использовать:

- А) калибровочные растворы аналитов
- Б) донорскую кровь

В) промышленную коммерческую контрольную (жидкую или лиофилизованную) сыворотку

Г) сливные сыворотки

5. При проведении контроля качества пользуются критериями:

А) воспроизводимость

Б) правильность

В) точность

Г) всеми перечисленными

6. Воспроизводимость измерения - это качество измерения, отражающее:

А) близость результатов к истинному значению измеряемой величины

Б) близость результатов измерений, выполняемых в одинаковых условиях

В) близость результатов измерений, выполняемых в разных условиях

Г) близость к нулю систематических ошибок в их результатах

7. Правильность измерения - это качество измерения, отражающее:

А) близость результатов к истинному значению измеряемой величины

Б) близость результатов измерений, выполняемых в одинаковых условиях

В) близость результатов измерений, выполняемых в разных условиях

Г) близость к нулю систематических ошибок в их результатах

8. Сходимость измерения - это качество измерения, отражающее:

А) близость результатов к истинному значению измеряемой величины

Б) близость результатов измерений, выполняемых в одинаковых условиях

В) близость результатов измерений, выполняемых в разных условиях

Г) близость к нулю систематических ошибок в их результатах

9. Точность измерения - это качество измерения, отражающее:

- А) близость результатов к истинному значению измеряемой величины
- Б) близость результатов измерений, выполняемых в одинаковых условиях
- В) близость результатов измерений, выполняемых в разных условиях
- Г) близость к нулю систематических ошибок в их результатах

10. Критериями оценки надежности метода являются:

- А) специфичность, чувствительность
- Б) воспроизводимость
- В) правильность
- Г) все перечисленное

11. Основным этапом контроля качества лабораторного анализа является:

- А) преаналитический
- Б) аналитический
- В) постаналитический
- Г) все перечисленное верно

12. Коэффициент вариации используют для оценки:

- А) воспроизводимости
- Б) чувствительности метода
- В) правильности
- Г) специфичности метода

13. Коэффициент вариации рассчитывают по формуле

- А) $V = X_{cp}/S * 100\%$

Б) $V = X_{\text{ср}} + S$

В) $V = (X_1 + X_2 + \dots + X_n) / n$

Г) $V = S / X_{\text{ср}} * 100\%$

14. Контрольная карта - это:

А) перечень нормативных величин, принятых в данной лаборатории

Б) порядок манипуляций при проведении анализа

В) схема расчета результатов

Г) график сопоставимых измеряемых величин со временем наблюдения

15. Основное значение контрольных карт состоит в:

А) выявлении ошибок, когда результаты анализов контроля не выходят за принятые границы

Б) выявлении ошибки, когда результаты анализов контроля выходят за принятые границы

В) оценке возможности метода

Г) оценке чувствительности метода

16. Преимуществом использования жидкого контрольного материала перед сухим контрольным материалом является:

А) исключение ошибки при растворении

Б) использование материала без подготовки

В) исключение потери вещества при небрежном открывании

Г) все перечисленное

17. Для контроля воспроизводимости используются контрольные материалы, приготовленные на основе:

А) лошадиной сыворотки

Б) сыворотки крупного рогатого скота

В) человеческой сыворотки

Г) всех перечисленных

18. Слитую сыворотку своего приготовления можно использовать для:

А) контроля воспроизводимости

Б) контроля правильности

В) контроля чувствительности

Г) все перечисленное верно

19. Лабораторный техник должен уметь:

А) строить калибровочный график

Б) проводить контрольные исследования

В) проводить дезинфекцию материала

Г) все перечисленное верно.

20. Метрологической проверке подлежат:

А) весы и разновесы

Б) рН-метр

В) ФЭК

Г) все перечисленное

21. Кюветы для колориметрирования обеззараживают:

А) 6% раствором перекиси водорода 1 час

Б) 3% раствором перекиси водорода 2 часа

В) 3% раствором хлорамина 1 час

Г) кипячение в 2% растворе соды - 15 мин.

Задание для самостоятельной работы:

Построить контрольную карту для указанного аналита, используя аттестованные значения из паспорта к используемому контрольному материалу.

РАЗДЕЛ 4. Исследование показателей обмена белков.

Практическое занятие №11-12: Общая характеристика белков, их биологическое значение, структурная организация. Аминокислоты. как структурные компоненты белков.

Формируемые профессиональные компетенции: 2.1, 2.2, 2.3.

Учебные цели (знать, уметь, иметь практический опыт):

Знать	Уметь	Владеть навыками
1-12	1-13	1-9

Воспитательная цель Привитие умений и навыков учебной работы и коллективного труда. Формирование целостного миропонимания и современного научного мировоззрения, основанного на признании приоритетов общечеловеческих ценностей: гуманности, милосердия, сострадания, уважения к жизни и здоровью человека.

Развивающая цель Формирование навыков самообразования, самореализации личности и развитие речи, мышления, памяти

Межпредметные связи ОПД. 03 Химия, ОПД. 16 Физико-химические методы исследования и техника лабораторных работ, ОПД . 02 Анатомия.

Вопросы для подготовки к занятию

1. Основные правила техники безопасности при работе в лаборатории.
2. Строение и классификация α -аминокислот.
3. Кислотно-основные свойства аминокислот. Реакции на их функциональные группы.
4. Уровни структурной организации белка.
5. Основные функции белков.
6. Элементарный состав белков.
7. Понятие об изоэлектрической точке (pI).
8. Качественное обнаружение белков с помощью цветных реакций.

Список понятий для усвоения темы

Амфотерность, белки, структура белка, заменимые аминокислоты, изоэлектрическая точка аминокислоты (белка), нативный белок, незаменимые аминокислоты, изоэлектрическая точка белка, гидролиз.

1. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Аминокислоты – это органические карбоновые кислоты, у которых один атом водорода углеводородной цепи замещен на аминогруппу.

Аминокислоты входят в состав белков и пептидов организма человека. Они образуют в организме многие низкомолекулярные биологически активные вещества: ГАМК (γ – аминomásляная кислота), биогенные амины и др. Гормоны щитовидной железы и адреналин – производные аминокислот. Аминокислоты – предшественники азотистых оснований (входящих в состав нуклеиновых кислот), порфиринов (идущих на биосинтез гемма – для гемоглобина и миоглобина), азотистых оснований (входящих в состав сложных липидов – холина, этаноламина). Участвуют в биосинтезе медиаторов в нервной системе (ацетилхолин, дофамин, серотонин, норадреналин и др.).

Структура аминокислот

Все аминокислоты, входящие в состав белков, имеют NH (амино) – группу в α – положении и относятся к α – аминокислотам.

Все аминокислоты – левовращающиеся и отличаются друг от друга строением бокового радикала, т.е. физико – химическими свойствами, присущими этим радикалам. Всего известно 23 аминокислоты.

Структура аминокислот может быть выражена общей формулой:



Пептиды – это органические молекулы, в состав которых входит несколько остатков аминокислот, связанных пептидной связью.

Пептиды обладают значительной биологической активностью, являясь регуляторами ряда процессов жизнедеятельности.

Белки – это органические соединения, представляющие собой полимеры природных аминокислот со специфическими структурами.

Белки являются важнейшей составной частью клеток живого организма. Они не встречаются в неживой природе. Играют первостепенную роль в функционировании живой материи. Все биологические процессы связаны при участии белков. Они – регуляторы численности нуклеиновых кислот. В качестве ферментов участвуют во всех стадиях биосинтеза полипептидов, нуклеотидов и др. соединений. Катализируют все метаболические процессы. Сократительные белки ответственны за клеточные и внутриклеточные движения. Белки и фосфолипиды образуют бислой мембраны всех клеток и субклеточных единиц. Белки обеспечивают активный транспорт веществ в клетку и из нее, транспорт кислорода к тканям и углекислого газа из тканей, перенос жирных кислот, липидов стероидов, витаминов, лекарственных веществ, неорганических ионов. Низкомолекулярные пептиды и гормоны стимулируют функциональную активность других тканей и органов. Белки защищают от проникновения в организм чужеродных агентов (за счет наличия γ – глобулинов). Входя в состав кожи, соединительных тканей, костей и др. выполняют опорную динамическую функцию (за счет наличия коллагена, эластина, фибронектина). Являются противоядием при отравлении солями тяжелых металлов и алкалоидами. При расщеплении 1г белка выделяется 4,1Ккал энергии. Белок расщепляется на мочевины, углекислый газ, воду.

Таким образом, белки выполняют следующие функции: ферментативную, гормональную, рецепторную, структурную (пластическую), иммунологическую, гемостатическую, противосвертывающую, геннорегуляторную (белки – гистоны, кислые белки играют роль в регуляции процесса трансляции), транспортную, сократительную, обезвреживающую, опорную (механическую), энергетическую.

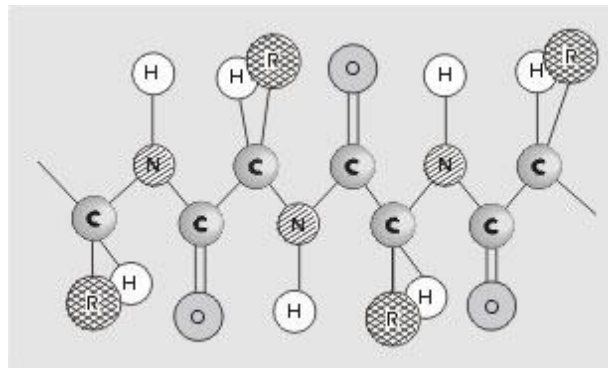
Структура белков.

Первичная структура – последовательность аминокислотных остатков в олипептидной цепи. Образуется за счет пептидных связей α – карбоксильной группы одной аминокислоты и L – аминогруппы последующей аминокислоты.

(NH – CO) – пептидная связь

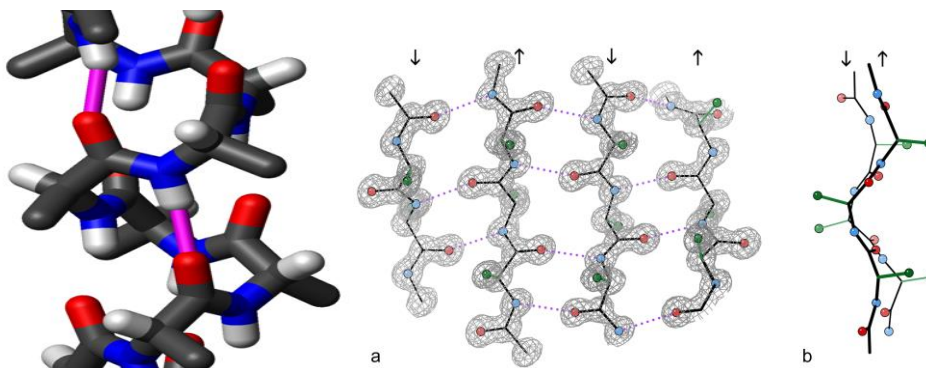


Например:



Вторичная структура – способ укладки полипептидной цепи в упорядоченную структуру, которая стабильна за счет водородных связей.

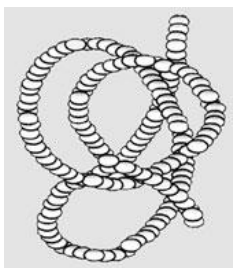
Различают: α – спираль Полинга и β – складчатые или слоистоскладчатые структуры (β – структура и кросс – β – форма).



α – спираль Полинга

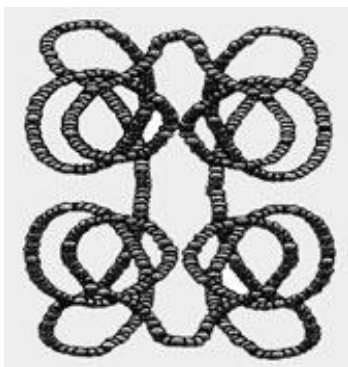
Степень спирализации может быть различной и говорит о наличии условий, при которых происходит нарушение спирализации, и образуются более компактные белки – формируется третичная структура белка.

Тетичная структура белка – укладка полипептидной цепи в пространстве. По способу укладки различают: глобулярные и фибриллярные. Уровнем третичной организации являются домены. *Домены* – это структурно обособленные области белковой молекулы, соединенные короткими аморфными участками полипептидных цепей. Третичная структура удерживается за счет водородных ($H^{\delta+} \dots O^{\delta-}$), ионных (солеобразующих) ($-NH^3+ \dots COO^-$), дисульфидных ($-S-S$), гидрофобных (сил Ван – дер – Вальса) связей.



Белки, состоящие из одной полипептидной цепи, характеризуются наличием только третичной организации. Третичная структура – субъединица.

Четвертичная структура. Состоит из нескольких полипептидных цепей, из которых каждая цепь – это субъединица, характеризующаяся своей вторичной и третичной пространственной структурой (олигомеры) – гемоглобин, лактатдегидрогеназа, глутаминсинтетаза, гексокиназа и др. Связь между протомерами – нековалентная. Число протомеров может быть от 2 до нескольких тысяч.



Физико – химические свойства белков.

Большинство белков хорошо растворимы в воде и растворах (лучше в солевых – физиологический, сульфат аммония и др., слабые кислоты). Есть белки практически не растворимые – белки опорных тканей (кератин, фиброин, коллаген). Белки обладают большой гидрофильностью, чем обусловлено высокое онкотическое давление белков. Белки в воде образуют растворы, близкие по свойствам к коллоидным растворам. Сходство определяется размером частиц. Различие – растворы белков гидрофильны по сравнению с коллоидным раствором. С коллоидным состоянием белков связан ряд характерных свойств, в частности явление светорассеивания, лежащее в основе количественного определения белков методом нефелометрии. Коллоидные частицы не проходят через полупроницаемые мембраны (целлофан, коллоидную пленку, стенку мочевого пузыря быка и т.д.), т.к. их поры меньше коллоидных частиц. Непроницаемыми для белка являются все биологические мембраны. Это свойство белковых растворов широко используется в медицине и химии для очистки белковых препаратов от посторонних примесей. Такой процесс разделения называется *диализом*. Явление диализа лежит в основе действия аппарата «искусственная почка», который широко используется для лечения почечной недостаточности. При поражении почек, капсула почечного клубочка (капсула Шумлянскогo – Боумена) становится непроницаемой для альбуминов сыворотки крови, и они появляются в моче.

Каждая белковая молекула окружена достаточно плотной собственной водной оболочкой, прочно фиксированной на ее поверхности. Сила, с которой белки плазмы притягивают к себе воду, называется *коллоидно – осмотическим или онкотическим давлением*. Оно равно 23 – 28 мм.рт.ст. При уменьшении количества белков или снижении их гидрофильности в плазме образуется избыток «свободной» воды, повышается гидростатическое давление в мельчайших сосудах (капиллярах) и вода начинает просачиваться сквозь стенки капилляров в ткани. Образуются онкотические (зависящие от количества и свойств белков) отеки. Онкотическое давление является частью осмотического и имеет большое значение для удержания жидкости в сосудистом русле. Входя в состав буферных систем, белки влияют на кислотно-основное равновесие крови.

Свойства растворов белков: способность к диффузии ограничена; осмотическое давление низкое, а онкотическое – высокое; некоторые растворы белков имеют высокую вязкость; способны к желатинированию (образованию гелей), белки способны к осаждению из раствора.

Растворы белков относительно стабильны в виду гидрофильности белков. Молекулы белка в растворе имеют 2 фактора устойчивости: гидратная оболочка и электрический заряд как результат ионизации функциональных групп аминокислот. Осаждаться могут только агрегаты белка, а затем идет седиментация (выпадение в осадок). Осаждение белков можно вызвать уменьшением влияния факторов устойчивости. Гидратную оболочку можно удалить действием солей сульфата аммония или спирта. Заряд можно уменьшить (удалить) изменяя рН среды, т.е. влияя на диссоциацию карбоксильной и аминогрупп. Различают обратимое и необратимое осаждение белков. При обратимом – структура белка не нарушается (высаливание сульфатом аммония), т.к. эти ионы оттягивают воду от белка. Необратимое – является результатом денатурации белка.

Денатурация белка – это негидролитическое нарушение нативной структуры белка, которая сопровождается изменением физико – химических и биологических свойств белка.

Первичная структура белка при денатурации сохраняется, а нарушается только при гидролизе. Другие уровни организации белковых молекул нарушаются. При этом разрываются нековалентные связи (водородные, ионные, гидрофобные), иногда разрываются дисульфидные связи. Молекула белка при денатурации «развертывается» («выворачивается наизнанку»). На поверхность молекулы выходят гидрофобные аминокислоты. За их счет происходит агрегация и осаждение белков. Поэтому первый признак денатурации – осаждение белков из раствора. При этом изменяется оптическое свойство раствора белков и биологическая активность (снижается или полностью исчезает). Денатурированные белки осаждаются не всегда: в сильно кислой и сильно щелочной средах белок не выпадает в осадок. Осаждению белка препятствует большой заряд на поверхности молекулы.

Оптические свойства раствора белка. За счет большого размера молекулы белка способны к светорассеиванию. Наблюдается явление опалесценции – легкая мутность раствора (часть света огибает молекулу белка, а часть

рассеивается, поэтому возникает эффект мутности). Эффект Фарадея – Тиндаля – появление светящегося конуса при прохождении света через раствор.

Белки способны вращать плоскость поляризованного света, т.к. белки – оптически активные вещества и состоят только из α – аминокислот.

Белки способны к поглощению света. Если через раствор белка пропускать свет, то часть этого света будет поглощаться молекулами вещества только в ультрафиолетовой части спектра (до 360нм).

Белки способны к флуоресценции за счет наличия триптофана. Флуоресценция – очень чувствительный метод, зависящий от формы молекулы.

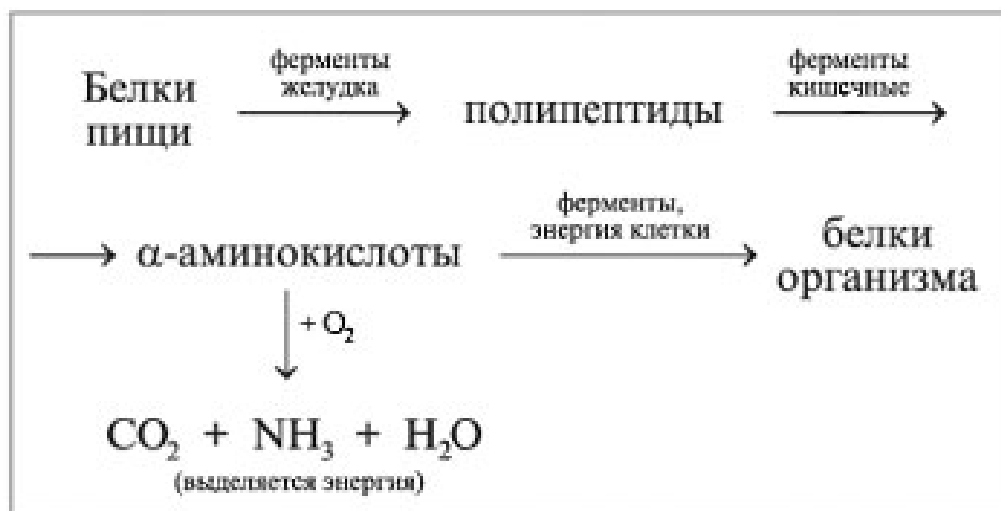
Электрические свойства растворов белков. Белки – полиэлектролиты, т.к. содержат в своем составе большое количество ионногенных групп, способных заряжаться (карбоксильная и аминогруппы).

Изоэлектрическая точка белка – это значение рН, при котором суммарный заряд белка равен нулю. Для большинства белков и.э.т. находится в слабокислой среде. И.э.т. основных белков находится в слабощелочной среде. В сильнокислой среде молекула белка имеет «+» заряд. При подкислении раствора «+» заряд увеличивается. Подщелачивание среды ведет к увеличению «-» заряда.

Если рН ниже и.э.т., то молекула белка всегда заряжена «+» и, наоборот. Заряд белка зависит от аминокислотного состава белка и рН среды. И.э.т. зависит только от аминокислотного состава. Например: альбумин – и.э.т. = 4,7, при рН = 4,7, заряд белка равен нулю; гистон – и.э.т. = 9 – 10, при рН = 4,7. И.э.т. белка определяется путем электрофореза или методом осаждения. В и.э.т. белок наименее устойчив к осаждению, т.е. осаждается очень легко.

Молекулярная масса. Молекулярная масса белков выражается в Дальтонах и равняется $1/12$ массы углерода ^{12}C . Молекулярная масса белков очень большая. Существуют межвидовые различия молекулярной массы гомологичных белков. Например, Нв человека = 64,5кДа, Нв быка = 62кДа, инсулин человека = 5734Да, инсулин свиньи = 5704Да, инсулин быка = 5660Да.

Схема превращения белка в организме



2. ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ ЗАНЯТИЯ

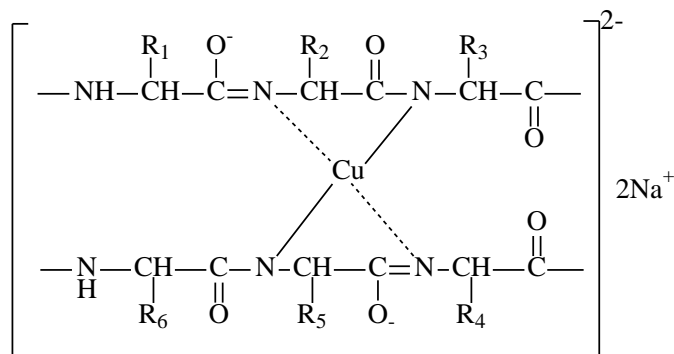
Работа 1. Цветные реакции на белки

Реактивы: водный раствор яичного белка (белок одного куриного яйца отделяют от желтка, растворяют в 15-20-кратном объеме дистиллированной воды, затем раствор фильтруют через марлю, сложенную в 3-4 слоя, и хранят в холодильнике.); 10 %-ный раствор гидроксида натрия; 30 %-ный раствор гидроксида натрия; 1 %-ный раствор сульфата меди; 1 %-ный раствор ацетата свинца; концентрированная азотная кислота, 2 %-ый раствор гипобромита натрия, раствора тирозина, раствора желатина, альбумина, раствора казеина 0,1%-ного раствора фенола, реактив Миллона (раствор ртути в азотной кислоте).

Оборудование: пробирки; водяная баня или спиртовка, пробиркодержатель.

Задание 1. Биуретовая реакция.

В щелочной среде белки, а также продукты их гидролиза – пептиды дают фиолетовое или красно-фиолетовое окрашивание с солями меди. Реакция обязана наличию пептидных связей в белках:



Интенсивность окраски зависит от длины полипептида.

Ход работы:

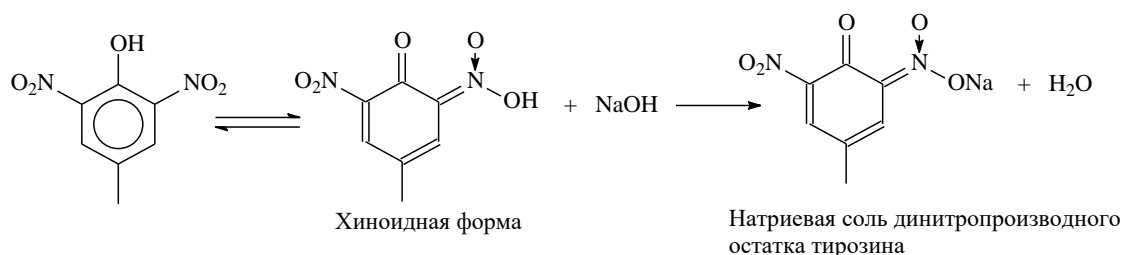
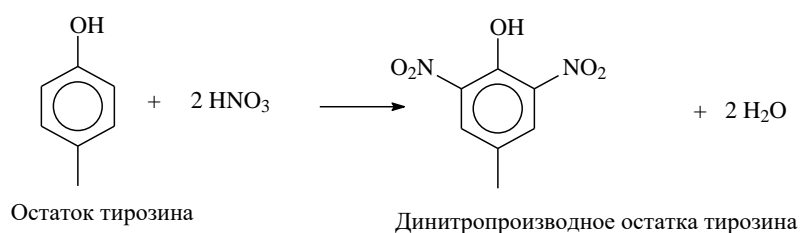
В пробирку налейте 5 капель раствора яичного белка, затем 10 капель 10 %-го раствора щелочи.

Добавьте 1-2 капли раствора сульфата меди, смесь перемешайте. Появляется красно-фиолетовое окрашивание.

Внимание! В пробирки нельзя добавлять избыток сульфата меди, так как синий осадок гидрата окиси меди маскирует характерное фиолетовое окрашивание биуретового комплекса белка.

Задание 2. Ксантопротеиновая реакция.

Реакция характерна для некоторых ароматических аминокислот (фенилаланина, тирозина, триптофана), а также для пептидов, их содержащих. При действии азотной кислоты образуется нитросоединение желтого цвета. Далее нитропроизводные могут реагировать со щелочью с образованием натриевой соли, имеющей желто-оранжевое окрашивание:



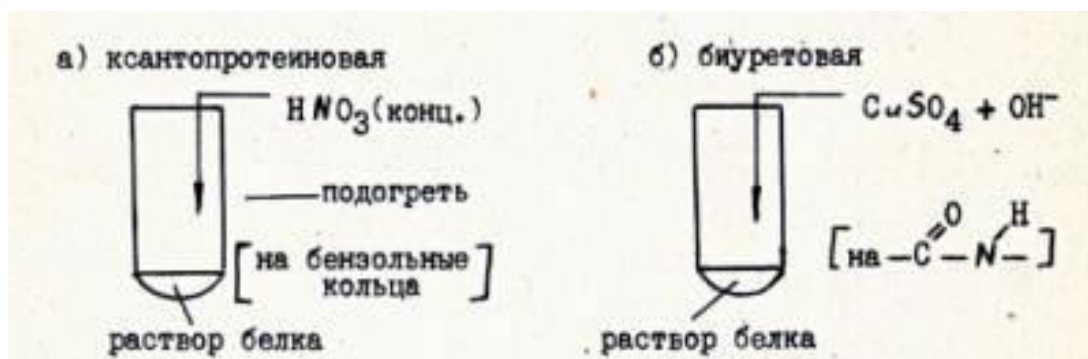
Ход работы:

Данную работу необходимо выполнять соблюдая особую **ОСТОРОЖНОСТЬ!**

В пробирку налейте 5 капель раствора яичного белка и **ОСТОРОЖНО** по стенке прибавьте 3-4 капли концентрированной азотной кислоты.

Смесь осторожно нагрейте. Выпадает осадок, который окрашивается в желтый цвет.

После охлаждения в пробирку **ОСТОРОЖНО** по стенке прилейте 10 капель 30 %-ого раствора NaOH, желтая окраска переходит в оранжевую.



Задание 3. Реакция Фоля

В остатках серусодержащих аминокислот сера при щелочном гидролизе отщепляется, образуя сульфиды. Сульфиды, взаимодействуя с ацетатом свинца, дают осадок сульфида свинца черного или буро-черного цвета.

Ход работы.

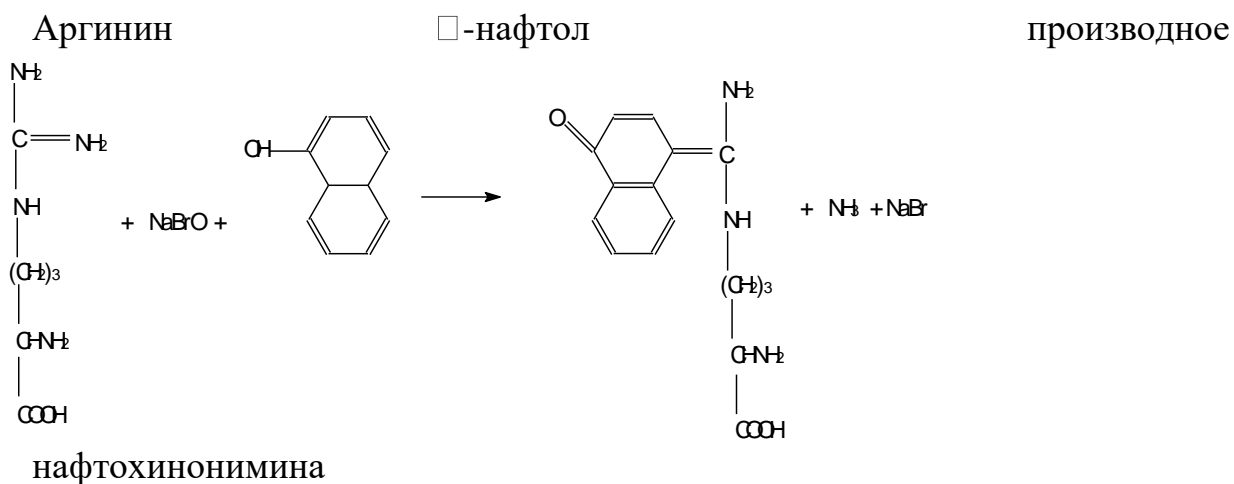
В пробирку налейте 5 капель реактива Фояля, добавьте 5 капель раствора белка.

Доведите до кипения над пламенем спиртовки, отметьте изменение окраски раствора.

Задание 4. Реакция на аргинин (реакция Сакагучи)

Реакция обусловлена присутствием в белке аминокислоты аргинина, имеющей гуанидиновую группировку $\text{NH}_2\text{-C-NH-NH}$

В щелочном растворе в присутствии гипохлорита натрия гуанидиновая группа аргинина окисляется. Окисленный продукт, соединяясь с нафтолом, образует продукт конденсации розово-красного цвета:



Ход работы:

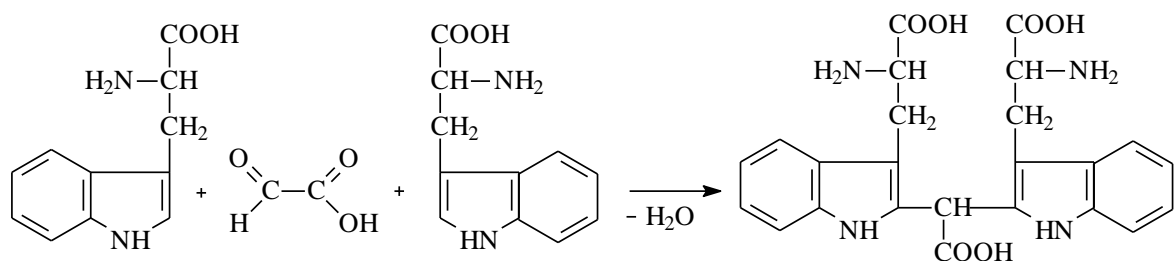
В одну пробирку налейте 1 мл 1%-ного раствора аргинина, в остальные три пробирки по 1 мл 1%-ных растворов овальбумина, казеина и желатина

Добавьте по 1-2 капли 10 % раствора NaOH и затем по 1-2 капли спиртового раствора 1-нафтола.

Перемешайте, прилейте по 1-2 капли гипохлорита натрия и вновь перемешайте. Развивается розово-красное окрашивание.

Задание 5. Реакция Адамкевича (реакция на триптофан)

Триптофан в кислой среде реагирует со многими альдегидами, вследствие чего образуются цветные продукты конденсации с общей структурой:



триптофан
конденсации

глиоксилат

триптофан

продукт

Ход работы:

В одну пробирку налейте 1 каплю неразбавленного белка добавьте 10 капель ледяной CH_3COOH , нагрейте до растворения белка.

Содержимое пробирки охладите и, сильно наклонив пробирку, очень осторожно, по стенке наслоите 1 мл концентрированной серной кислоты (жидкости не должны смешаться). При стоянии на границе двух жидкостей образуется красно-фиолетовое кольцо. При нагревании окрашивание развивается быстрее.

Задание 6. Контрольное определение

С контрольным раствором последовательно проведите все изученные реакции на белки и аминокислоты. На основании полученных результатов сделайте вывод о присутствии в растворе того или иного белка или аминокислоты. Результаты контрольного определения оформите в виде таблицы.

п/п	Название реакции	Используемые реактивы и условия	Окраска продукта	Чем обусловлена реакция (определяемые аминокислоты)

Работа 2. Реакции осаждения белка

Реакции обратимого осаждения белков

Реакции осаждения белков бывают обратимыми и необратимыми.

При обратимом осаждении макромолекулы белка в основном не подвергаются глубокой денатурации, а осадки могут быть снова растворены в первоначальном растворителе. Обратимое осаждение вызывается действием нейтральных солей аммония, щелочных и щелочно-земельных металлов (высаливание), спирта, ацетона, эфира и некоторых других органических растворителей.

Реакции необратимого осаждения белков

При необратимом осаждении происходит глубокая денатурация белка. Денатурированный белок не способен к восстановлению своих первоначальных физико-химических и биологических свойств. Необратимое осаждение вызывается высокой температурой, действием концентрированных минеральных и некоторых органических кислот, ионов тяжелых металлов, алкалоидных реагентов, детергентов, красителей.

Реактивы: раствор яичного белка с добавлением хлорида натрия (белок одного куриного яйца отделяют от желтка и растворяют в 230 мл дистиллированной воды, к которой прибавляют 100 мл насыщенного раствора хлорида натрия, раствор фильтруют через марлю, сложенную в 3-4 слоя, и хранят в холодильнике); насыщенный раствор сульфата аммония; сульфат аммония, растертый в порошок; 10 %-ый раствор гидроксида натрия; 1 %-ый раствор сульфата меди, концентрированные серная,

соляная и азотная кислоты; 5 %-ый раствор ацетата свинца; 2,5 %-ый раствор нитрата серебра; 5 %-ый раствор сульфата меди.

Оборудование: пробирки; воронка для фильтрования; бумажные фильтры.

Ход работы:

Задание 1. Осаждение белков сульфатом аммония.

В пробирку отмерьте 2-3 мл раствора яичного белка, добавьте равный объем насыщенного раствора сульфата аммония и смесь перемешайте.

Выпадает осадок глобулинов, альбумины остаются в растворе. Осадок отфильтруйте на бумажном фильтре.

К фильтрату добавьте порошок сульфата аммония до получения насыщенного раствора (последняя порция не растворяется).

Выпадает осадок альбуминов, который также отфильтруйте.

Фильтр с осадком альбуминов промойте 5 мл воды, собирая фильтрат в чистую пробирку.

Проделайте с фильтратом биуретовую реакцию. Произошло ли растворение альбуминов?

Задание 2. Осаждение белков спиртом.

Органические растворители вызывают осаждение белков вследствие разрушения гидратной оболочки макромолекул.

В пробирку налейте 1 мл раствора яичного белка с добавлением хлорида натрия.

По каплям прилейте 4-6 мл спирта и сильно взболтайте. Через 5-8 мин. выпадает осадок белков.

Задание 3. Осаждение белков минеральными кислотами.

Реакция находит применение для быстрого определения белка в биологических жидкостях, например, моче.

Ход работы:

Данную работу необходимо выполнять соблюдая особую ОСТОРОЖНОСТЬ!

В три пробирки налейте по 15-20 капель концентрированных кислот: в первую – серной; во вторую – азотной и в третью - соляной.

Пробирки наклоните под углом 45° и ОСТОРОЖНО (из пипетки) наложите по стенке раствор белка. Пробирку держите отверстием от себя. На границе белка и кислоты появляется белое кольцо.

Пробирки осторожно встряхните. Осадки растворяются в серной и соляной кислотах, но не растворяются в азотной кислоте.



Задание 4. Осаждение белков солями тяжелых металлов.

Белки осаждаются солями меди, свинца, ртути, цинка, серебра и других тяжелых металлов. Свойство белков связывать ионы тяжелых металлов используется в медицине при оказании первой помощи пострадавшим от отравления солями меди, свинца, ртути.

Ход работы:

В три пронумерованные пробирки налейте по 5-10 капель раствора белка.

В первую пробирку по каплям прибавьте раствор ацетата свинца. Образуется осадок. Добавьте еще несколько капель, осадок должен раствориться в избытке раствора соли.

Во вторую пробирку по каплям прилейте раствор нитрата серебра. Образовавшийся осадок в избытке соли не растворяется.

В третью пробирку прибавьте 5% раствор сульфата меди до появления осадка. Убедитесь, что осадок растворяется в избытке соли.

Задание 5. Осаждение белков при нагревании

Ход работы:

В 5 пробирок налейте по 10 капель раствора белка

В первой пробирке нейтральный раствор белка нагрейте. Усиливается опалесценция, может выпасть осадок. Нагревание проводить осторожно, все время встряхивая пробирку.

К нейтральному раствору белка во второй пробирке прибавьте 1-2 капли 1% раствора уксусной кислоты, осадка при этом не образуется. При нагревании вначале появляется опалесценция, а затем при дальнейшем кипячении выпадает белый хлопьевидный осадок. Осадок появляется вследствие того, что в слабокислой среде белок находится в изоэлектрическом состоянии, денатурируясь при нагревании, легко теряет свою растворимость в результате агрегации.

В третью пробирку добавьте 1-3 капли 10% раствора уксусной кислоты и нагрейте до кипения. Осадок не выпадет, т.к. при избытке водородных ионов белки, имевшие в исходном растворе отрицательный заряд, перезаряжаются и приобретают положительный заряд, что придает им устойчивость.

В четвертую пробирку добавьте 1-3 капли 10% раствора уксусной кислоты и 2-3 капли насыщенного раствора хлорида натрия, доведите до кипения. Появляется белый хлопьевидный осадок белка, вследствие экранирования положительного заряда перезаряженных частиц белка противоположно заряженными ионами хлористого натрия путем адсорбции их.

В пятой пробирке к раствору белка добавьте 2-4 капли 10% раствора едкого натра и доведите до кипения. Осадка не образуется, так как в щелочной среде подавляется основная диссоциация белка, усиливается кислотная и отрицательный заряд на коллоидных частицах белка возрастает еще больше.

Оформление результатов:

Оформите результаты проведенных исследований в виде таблицы.

Реакция среды	Описание осадка (цвет и характер осадка)
нейтральная	
слабокислая	
Сильнокислая (10%CH ₃ COOH)	
Сильнокислая (10%CH ₃ COOH + NaCl)	
Щелочная (10%NaOH)	

Выполнить задания в тетрадях для самостоятельной работы

Литература:

1. Практика лабораторных биохимических исследований: учебное пособие. Пустовалова Л.М. – Ростов н/Д.: Феникс, 2014
2. Теория лабораторных биохимических исследований (основы биохимии): учебное пособие. Пустовалова Л.М. – Ростов н/Д.: Феникс, 2014

Практическое занятие №13-14: Переваривание белков. Общие пути превращения аминокислот. Определение общего белка, альбумина. Клинико-диагностическое значение.

Формируемые профессиональные компетенции: 2.1, 2.2, 2.3.

Учебные цели (знать, уметь, иметь практический опыт):

Знать	Уметь	Владеть навыками
1-12,17,18	1-14,17,18	1-9

Воспитательная цель Привитие умений и навыков учебной работы и коллективного труда. Формирование целостного миропонимания и современного научного мировоззрения, основанного на признании приоритетов общечеловеческих ценностей: гуманности, милосердия, сострадания, уважения к жизни и здоровью человека.

Развивающая цель Формирование навыков самообразования, самореализации личности и развитие речи, мышления, памяти .

Межпредметные связи ОПД. 03 Химия, ОПД. 16 Физико-химические методы исследования и техника лабораторных работ, ОПД . 02 Анатомия.

Вопросы для подготовки к занятию

1. Основные правила техники безопасности при работе в лаборатории.
2. Этапы переваривания белков в ЖКТ.
3. Какие ферменты принимают участие в переваривании белков в ЖКТ.
4. Промежуточный обмен аминокислот.
5. Фракции белков сыворотки крови человека, их функции.
6. Унифицированные методы определения общего белка и альбумина.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ.

Переваривание белков

Переваривание белков происходит в желудке и в тонком кишечнике. Оно сводится к ферментативному гидролитическому расщеплению белков пищи до аминокислот. Переваривание белков в желудочно-кишечном тракте имеет ряд особенностей:

- протеолитические ферменты выделяются в неактивном состоянии (защитный механизм от переваривания тканевых белков);
- их активирование происходит в просвете желудочно-кишечного тракта путём частичного протеолиза;
- протеазы желудочно-кишечного тракта отличаются субстратной специфичностью, могут относиться или к эндопептидазам, или экзопептидазам.

В желудке основным ферментом, расщепляющим белки, является **пепсин**. Он выделяется в неактивном состоянии в виде профермента пепсиногена. При участии HCl происходит частичный протеолиз пепсиногена и превращение его в активную форму пепсин.

Пепсин относится к эндопептидазам, разрывает в белках внутренние пептидные связи, образованные с участием остатков тирозина и фенилаланина..

Роль HCl в переваривании белков:

- участвует в активации пепсиногена;
- обеспечивает оптимум pH для пепсина ($pH = 1-2$);
- вызывает частичную денатурацию белка, способствует их набуханию;
- является бактерицидным барьером.

Слизистая желудка имеет целый ряд защитных механизмов от агрессивного действия пепсина и соляной кислоты. К ним относятся:

- а) выработка слизи (основной её компонент протеогликаны);
- б) выделение пепсина в неактивном состоянии;

Дальнейшее переваривание белков осуществляется в тонком кишечнике под действием ферментов поджелудочной железы и собственных ферментов

слизистой оболочки кишечника. К ферментам *поджелудочной железы* относятся трипсин, химотрипсин, эластаза, карбоксипептидазы. **Трипсин** выделяется поджелудочной железой в неактивном состоянии в виде трипсиногена, который активируется ферментом энтеропептидазой (энтерокиназой), вырабатываемой слизистой кишечника. Трипсин, в свою очередь, активирует в кишечнике другие протеолитические ферменты. **Химотрипсин** вырабатывается в неактивном состоянии в виде химотрипсиногена, активируется частичным протеолизом трипсином. Химотрипсин относится к эндопептидазам, содержит в активном центре гидрофобные аминокислоты, расщепляет в белках связи, образованные COOH – группами ароматических аминокислот (фенилаланин, тирозин). **Эластаза** образуется из проэластазы под действием трипсина путём частичного протеолиза. **Карбоксипептидазы** относятся к экзопептидазам, отщепляют от белков концевые аминокислоты.

В тонком кишечнике происходит полное гидролитическое расщепление пищевых белков до аминокислот, которые не обладают видовой специфичностью. Образовавшиеся аминокислоты подвергаются всасыванию.

Всасывание аминокислот

Всасывание аминокислот представляет собой активный Na-зависимый процесс, требующий затрат энергии АТФ. Перенос отдельных аминокислот осуществляется специальными переносчиками с участием трипептида глутатиона.

Гниение белков в толстом кишечнике

Процессу гниения в толстом кишечнике под действием ферментов

гнилостной микрофлоры подвергаются не полностью расщепившиеся белки и отдельные не всосавшиеся аминокислоты. При гниении белков образуются:

1. Токсичные продукты-фенол, скатол, крезол, индол, сероводород, амины,

меркаптан

2. Нетоксичные продукты-кетокислоты, оксикислоты, жирные кислоты, спирты

Продукты гниения белков чрезвычайно токсичны, по системе *vena porta*, они поступают в печень, где подвергаются процессам обезвреживания.

Обезвреживание продуктов гниения белков в печени

Выделяют несколько вариантов обезвреживания в печени токсичных продуктов гниения белков.

1. Синтез нетоксичной мочевины из чрезвычайно токсичного NH_3 .
2. Микросомальное окисление токсичных веществ при участии ферментов монооксигеназ. В результате процесса гидроксилирования снижается токсичность, повышается водорастворимость, увеличивается реакционная способность обезвреживаемого вещества.
3. Образование парных нетоксичных соединений путём присоединения к обезвреживаемым продуктам H_2SO_4 , глюконовой кислоты, глицина.

Белки тканей организма постоянно обновляются, то есть подвергается распаду, и постоянно замещаются вновь синтезированными белками.

Пути образования и использования аминокислот в тканях

В ткани всегда существует определённый *запас аминокислот*. Он поддерживается на достаточно постоянном уровне благодаря сбалансированности путей образования и использования аминокислот.

Пути пополнения запаса тканевых аминокислот:

1. аминокислоты, всосавшиеся из кишечника в результате переваривания пищевых белков (1/3 фонда);
2. аминокислоты, образовавшиеся при распаде тканевых белков;
3. синтезированные в тканях заменимые аминокислоты.

серина, треонина

Пути расходования аминокислот в тканях:

1. синтез тканевых белков и пептидов;
2. образование небелковых N-содержащих веществ (пуриновые основания, креатинин, биогенные амины, фосфолипиды);
3. использование на энергетические цели;
4. расходование на синтез углеводов (глюконеогенез);
5. образование из аминокислот некоторых метаболитов липидного обмена (кетоновые тела).

Катаболизм аминокислот условно делят на общие реакции (происходят в отношении радикала, аминогрупп, карбоксильных групп) и специфические реакции.

Трансаминирование аминокислот

Начальным процессом деградации аминогрупп является процесс

трансаминирования. Трансаминирование - ферментативный процесс переноса NH_2 - группы с аминокислоты на α - кетокислоту при участии ферментов трансаминаз и витамина B_6 . В процесс трансаминирования могут включаться практически все аминокислоты.

Биологическое значение реакций трансаминирования заключается в следующем:

1. происходит потеря аминогрупп из аминокислоты без выделения токсичного NH_3 ;
2. возможность последующего включения безазотистого остатка аминокислот в цикл Кребса с выделением энергии;
3. способ синтеза новых заменимых аминокислот в тканях

Дезаминирование аминокислот

В тканях различают несколько вариантов дезаминирования: окислительное, не прямое, внутримолекулярное дезаминирование.

Окислительное дезаминирование

Окислительное дезаминирование – это ферментативный процесс отщепления

NH_2 - группы от аминокислоты после предварительного окисления аминокислоты

Биологическое значение реакций окислительного дезаминирования состоит в том, что эта реакция позволяет аминокислотам освободиться от аминогруппы и, переходя в альфа - кетокислоту, включатся в цикл Кребса.

Не прямое дезаминирование

В тканях для большинства аминокислот реакции трансаминирования и

окислительного дезаминирования тесно друг с другом связаны, Сочетание их получило название непрямого дезаминирования.

Около трети аминокислот включается в не прямое дезаминирование.

Внутримолекулярное дезаминирование

В процесс внутримолекулярного дезаминирования вступают аминокислоты гистидин, серин, треонин, цистеин.

Декарбоксилирование аминокислот. Биогенные амины

Декарбоксилирование аминокислот – ферментативный процесс высвобождения CO_2 из COOH - групп аминокислот с образованием аминов.

Наиболее активно в процесс декарбоксилирования включаются аминокислоты гистидин, тирозин, глутамат, триптофан. Образующиеся амины называются биогенными аминами, поскольку они, как правило, обладают широким спектром физиологических эффектов, влияют на тонус сосудов, являются нейромедиаторами, участвуют в воспалительных реакциях. К основным биогенным аминам относятся гистамин, серотонин, катехоламины, гамма-аминомасляная кислота, полиамины.

Образование и обезвреживание аммиака в организме

Аммиак образуется в результате дезаминирования таких веществ как аминокислоты, амины, пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды.

Аммиак чрезвычайно токсичное вещество. Токсичность аммиака объясняется

многими его эффектами, главным среди которых является связывание альфа-кетокислот и блокирование включения их в цикл Кребса, что нарушает энергетический обмен в тканях. Аммиак может нарушать обмен глутамата и глутамина в ткани мозга, вызывать повышение концентрации глутамата до токсичных концентраций. Кроме того, аммиак вызывает защелачивание в тканях и нарушает транспорт ионов Na^+ и Ca^{2+} . В связи с этим концентрация аммиака в тканях и в крови поддерживается на очень низком уровне. В плазме крови она составляет 20-80 мкмоль/л. Такая низкая концентрация обеспечивается наличием в организме различных путей связывания

(обезвреживания) аммиака. Эти способы можно разделить следующим образом:

- временные пути (протекают в тканях):
 - восстановительное аминирование альфа-кетокислот;
 - амидирование белков;
 - синтез глутамина;
- образование конечных продуктов азотистого обмена:
 - соли аммония;
 - мочевины.

БЕЛКИ ПЛАЗМЫ КРОВИ

Общее количество белков в плазме крови составляет 7—8%. Общее количество белков в плазме составляет 60-85 г/л. С возрастом количество белков в плазме крови человека уменьшается до 65-67 г/л. В сыворотке крови 0,18-0,37 г/л.

Белки плазмы могут быть подразделены на две фракции, отличающиеся по своим физико-химическим свойствам:

- **сывороточные альбумины**
- **сывороточные глобулины**

Методом электрофореза белки плазмы крови можно разделить на 5 фракций:

- Альбумины 55-65%
- α_1 - глобулины 2-4%
- α_2 - глобулины 6-12%;
- β - глобулины 8-12%
- γ -глобулины 12-22%

Содержание белка снижается при заболеваниях печени, сопровождающихся нарушением её белоксинтезирующих функций (циррозы, хронические гепатиты). Падает содержание и при повышении проницаемости сосудов клубочка нефрона (нефротический синдром).

Физиологическая роль БПК – общее содержание белков плазмы определяет коллоидно-осмотическое, или онкотическое, давление плазмы. Обладая свойством кислоты и основания, белки плазмы способны выявлять буферные свойства при поступлении в кровь кислот и оснований. Белки плазмы крови принимают непосредственное участие в белковом обмене всего организма. Белки плазмы интенсивно образуются и, очевидно, столь же

быстро потребляются. Наряду с некоторыми другими факторами, белки плазмы крови играют существенную защитную роль при внедрении в организм инфекционного начала. Невосприимчивость организма к инфекционным заболеваниям (иммунитет), в особенности приобретаемая в результате перенесенной болезни или проведенных прививок, в ряде случаев зависит от образования особых защитных или иммунных тел белковой природы, поступающих в плазму крови. Во всех случаях, когда в организм попадает чужеродный белок (антиген), в организме образуются так называемые антитела — вещества тоже белковой природы. Местом образования их является ретикуло-эндотелиальная и лимфоидная ткань. В одних случаях эти вещества обезвреживают ядовитые вещества (токсины), выделяемые микроорганизмами (антитоксины). В других случаях в сыворотке крови образуются вещества, или склеивающие микробы (агглютинины), или растворяющие их (лизины), или осаждающие чужеродные для организма белки (ипритины).

Сывороточные альбумины являются белками, имеющими частицы почти шарообразной формы с небольшим молекулярным весом 68 000. Около 40% альбуминов находится в крови, остальное 60% — в межклеточной жидкости. Эти белки хорошо растворимы в воде и не выпадают в осадок даже в том случае, если путем диализа или электродиализа из раствора целиком удаляются электролиты. При прибавлении электролитов альбумины высаливаются с трудом. Альбумины не осаждаются при половинном насыщении серноокислым аммонием, только при полном насыщении. Содержание альбуминов в плазме крови человека составляет 4—5%. Альбумины удерживают в растворенном состоянии некоторые липоиды и тем самым способствуют их переносу кровью. Они создают 80% онкотического давления плазмы крови. Осуществляют питательную функцию, являются резервом аминокислот для синтеза белков, транспортируют холестерин, жирные кислоты, билирубин, соли желчных кислот, тяжелых металлов, лекарственных препаратов (антибиотиков, сульфаниламидов, барбитуратов, сердечных гликозидов), катионы Ca^{2+} , Si^{2+} , Zn^{2+} , прогестерон, тироксин, трийодтиронин. Синтезируются в печени. Нормальное содержание — 37-55 г/л сыворотки крови. Снижение содержания наблюдается при нефротическом синдроме, заболеваниях печени, связанных с нарушением её белоксинтезирующей функции (цирроз), ожоги, сепсис.

Сывороточные глобулины представляют группу белков с меньшей степенью дисперсности и с неодинаковым молекулярным весом. Молекулярный вес их большой около 100 000. В совершенно чистой воде глобулины нерастворимы. Поэтому при диализе они выпадают в осадок. Глобулины высаливаются уже при половинном насыщении серноокислым

аммонием. Количество глобулинов в плазме крови человека составляет примерно 2.5%. Синтезируются в печени, костном мозге, селезенке, лимфатических узлах.

α_1 -глобулины

В этой фракции обнаруживается два белка, оценка которых имеет определенное клиническое значение.

α_1 -антитрипсин – ингибитор ряда протеиназ: трипсина, химотрипсина, плазмина. На долю этого белка приходится до 90% всей антитрипсиновой активности сыворотки крови. Его содержание повышается при воспалительных заболеваниях и механических повреждениях тканей. В детском возрасте дефицит α_1 -антитрипсина – причина холестаза и цирроза печени, желтух. Нормальное содержание – 2-5 г/л сыворотки.

α_1 -гликопротеин – содержит до 41% углеводов, участвует в транспорте прогестерона и тестостерона, связывая небольшие количества этих стероидов. Содержание возрастает при острых и хронических воспалительных процессах, после оперативных вмешательств, снижается – при циррозе печени. Норма – 0,5-1,4 г/л сыворотки.

α_2 -глобулины

α_2 -макроглобулин – цинкосодержащий гликопротеин с большой молекулярной массой. Ингибирует протеолитические ферменты – трипсин, химотрипсин, тромбин, плазмин. В отличие от многих белков плазмы синтезируется вне печени. Содержание увеличивается при циррозе, нефротическом синдроме, микседеме и сахарном диабете, не изменяется при остром воспалении, падает при ревматическом полиартрите. Норма – 1,5-4,2 г/л сыворотки. У детей содержание в 2,5 раза выше, чем у взрослых, у мужчин ниже, чем у женщин.

Гаптоглобин – молекула белка состоит из 2-х субъединиц, каждая из которых содержит 4 полипептидные цепи. Связывает и транспортирует свободный гемоглобин А в клетки РЭС. Содержание снижается при поражениях паренхимы печени, гемолитической анемии, увеличивается при остром воспалительном процессе и при сахарном диабете. Норма – 0,0-0,35 г/л, у новорожденных значительно ниже, у плода отсутствует.

Церулоплазмин – медьсодержащий белок с голубой окраской. Окисляет Fe^{2+} в Fe^{3+} , что обеспечивает его транспорт трансферрином. Синтез усиливается при беременности или при подавлении овуляции (прием

противозачаточных средств). Содержание растёт при остром воспалении, холестазае, ревматоидном артрите, снижается при циррозах печени, хроническом гепатите. Норма – 0,25-0,45 г/л.

β-глобулины

В этой фракции интерес представляют 2 белка, участвующие в обмене железа:

Трансферрин – белок с красноватой окраской. Участвует в транспорте Fe (III). Содержание снижается при воспалительных процессах, нефротическом синдроме, заболеваниях печени. Норма – 2-4 г/л сыворотки, при беременности выше.

Гемопексин – кислоторастворимый белок, переносит свободный гем, порфирин, связывает гемоглобин, миоглобин, каталазу и доставляет их в клетки РЭС печени, чем снижает потери железа, обеспечивая его реутилизацию. Содержание падает при гемолитической анемии, заболеваниях печени, нефротическом синдроме, увеличивается – при воспалительных заболеваниях.

γ-глобулины

включают в себя антитела и называются **иммуноглобулинами**. Известно 5 основных классов иммуноглобулинов, отличающихся некоторыми особенностями структуры и биологических свойств (г/л):

IgG	12	Поздние антитела
IgA	3,5	Антитела, защищающие слизистые оболочки
IgM	1,3	Ранние антитела
IgD	0,03	Рецепторы В-лимфоцитов
IgE	<0,01	Реагин

Фибриноген — обладает замечательным свойством становиться нерастворимым в определенных условиях и принимать при этом волокнистую структуру, переходя, таким образом, в фибрин. Содержание фибриногена в плазме крови составляет всего 0,3%, но именно его переходом в фибрин обуславливается свертывание крови, благодаря которому жидкая кровь в течение нескольких минут превращается в плотный сгусток.

Он обладает свойствами глобулинов и при электрофорезе обнаруживается между фракциями β- и γ-глобулинов. Является первым фактором свертывания крови. Синтезируется в печени. Концентрация фибриногена в

среднем 3-4 г/л. увеличивается содержание этого белка в период беременности, при различных заболеваниях воспалительного характера, злокачественном росте, туберкулезе и др. Понижение содержания наблюдается при заболеваниях печени, при отравлении фосфором или другими токсическими веществами. Синтез этого белка происходит в РЭС печени.

Диспротеинемия — нарушение нормального соотношения между фракциями белков, а также появление С-реактивного протеина.;

Наблюдается при воспалительных процессах, опухолях, инфарктах различных органов, коллагенозах. Является чувствительным методом для суждения о минимальной активности хронических воспалительных заболеваний (например, ревматизма, туберкулеза).

- Для острых процессов характерно повышение альфа-2-глобулинов;
- для хронических – гамма-глобулинов.
- Гипермакроглобулинемия патогномична для болезни Вальден-стрема.

По содержанию общего белка сыворотки крови выделяют нормо-, гипо- и гиперпротеинемические диспротеинемии. Все они характеризуются нарушениями в объемных соотношениях разных типов белков.

Гипопротеинемические диспротеинемии наиболее часто наблюдаются при недостаточном поступлении белков в организм, потере белков через выпот, кровопотерю, протеинурию или пищеварительный канал, повышении обмена веществ с усилением распада эндогенных белков, как, например, при лихорадочных состояниях, опухолевых процессах, повышении функции щитовидной железы, лучевых повреждениях, нарушениях функции органов, обеспечивающих белковый синтез в организме.

Гиперпротеинемические диспротеинемии более часто наблюдаются при воспалительных процессах инфекционной и неинфекционной природы, особенно в случае иммунопатологического воспалительного процесса, характерного для системных заболеваний соединительной ткани, некоторых опухолевых заболеваниях, в первую очередь кроветворных органов.

Нормопротеинемические диспротеинемии встречаются при многих из вышеперечисленных заболеваниях и состояниях.

Электрофоретическое разделение протеинов позволяет изучать их биологические и физические характеристики, являясь индикатором заболеваний печени и почек, иммунной системы, злокачественной патологии, острых и хронических инфекций, генетических поломок, заболеваний центральной нервной системы и многих других видов патологии.

2. ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

1. Определение общего белка в сыворотке крови по биуретовой реакции (метод калибровочного графика)

Определение общего белка по биуретовой реакции является на сегодняшний день самым распространенным методом определения общего белка в сыворотке крови. Метод относительно дешев, прост, обладает хорошей воспроизводимостью и специфичностью, использование его позволяет выполнять исследование как на анализаторах (автоматических и полуавтоматических), так и на обычном фотометре.

Принцип метода

Белки реагируют в щелочной среде с сульфатом меди с образованием комплексных соединений, окрашенных в фиолетовый цвет. По интенсивности окрашивания, которое пропорционально количеству белка, определяют содержание его в сыворотке крови.

Подготовка пациента

Для определения общего белка крови по биуретовой реакции кровь желательно брать утром натощак.

Реактивы

1. Натрия хлорид, ч. д. а. или х. ч., 154 ммоль/л (изотонический раствор): 9 г хлорида натрия помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, растворяют в воде и доводят до метки водой.
2. Натр едкий, ч. д. а. или х. ч., 0,2 моль/л: 8 г едкого натра помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, осторожно растворяют в воде и доводят до метки водой.
3. Калия йодид, ч. д. а. или х. ч., 30 ммоль/л раствор йодида калия в 0,2 моль/л растворе едкого натра: 0,5 г йодида калия помещают в мерную

колбу вместимостью 100 мл, доводят 0,2 моль/л раствором едкого натра до метки и растворяют. Реактив стабилен в течение 2 недель при хранении в посуде из темного стекла.

4. Калий-натрий виннокислый 4-водный (сегнетова соль) ч. д. а.
5. Меди сульфат 5-водный ч. д. а. или х. ч.
6. Биуретовый реактив: 4,5 г сегнетовой соли растворяют в 40 мл 0,2 моль/л 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 не более месяца.
7. Рабочий раствор биуретового реактива: 20 мл биуретового реактива смешивают с 80 мл 0,5% раствора йодида калия. Реактив хранят в темном месте не более 2 недель.
8. Калибровочный раствор альбумина (из человеческой или бычьей сыворотки) - 100 г/л раствор альбумина в 154 ммоль/л растворе хлорида натрия: 1 г альбумина из человеческой или бычьей сыворотки растворяют в 6 — 7 мл 0,9% раствора хлорида натрия и доводят изотоническим раствором хлорида натрия до объема 10 мл; 1 мл стандартного раствора содержит 0,1 г белка.

Материал для исследования

Для анализа могут использоваться как сыворотка, так и плазма. При этом обычно получают сравнимые результаты, хотя, из-за присутствия фибриногена, уровень общего белка в плазме на 2–4 г/л выше, чем в сыворотке.

Определение содержания белка в сыворотке, полученной в вакуумных системах с разделяющим гелем и без него, дает сопоставимые результаты. Не было получено существенных различий в содержании белка в образцах крови, собранных в стеклянных или пластмассовых вакуумных системах.

Для исследования не следует использовать гемолизированную сыворотку, так как гемоглобин также является белком и будет вступать в биуретовую реакцию, что приведет к ложному завышению результатов анализа: присутствие гемоглобина приводит к завышению результатов на 3 % на каждый 1 г/л свободного гемоглобина в сыворотке.

Нежелательно использовать хилезную сыворотку, так как она из-за мутности будет оптически интерферировать с результатами определения, а следовательно приведет к ложному завышению результатов. Для устранения интерференции, вызванной значительной липемией применяют экстракцию диэтиловым эфиром. При незначительном

присутствии липидов можно провести исследование, установив "бланк" по пробе больного, либо развести пробу изотоническим раствором хлорида натрия, а затем умножить результат на степень разведения.

Интерферирующее действие оказывает и билирубин при концентрации более 85 мкмоль/л. Поэтому в случае гипербилирубинемии также используют либо разведение сыворотки, либо установку «бланка» по пробе больного.

В ряде случаев в реакцию могут вмешиваться препараты, применяющиеся для лечения, особенно у тяжелых больных. Так, например, декстраны, используемые в качестве плазмозамещающих растворов, образуют комплекс с медью и тартратом в реакционной смеси и приводят к образованию рыхлого синего осадка. Степень вмешательства зависит от концентрации декстрана и состава биуретового реактива. При вводимых обычно количествах декстрана величина ошибки может составлять от 3 до 50 %. Полагают, что добавление глицерина в реактив или использование низкой концентрации NaOH способны предотвратить вмешательства декстрана в ход реакции. Присутствие в образце ионов аммония может способствовать образованию комплексов аммония с ионами меди, приводить к снижению концентрации ионов меди в реакционной среде, и, соответственно, к снижению скорости реакции и ложноотрицательным результатам. В редких случаях вмешательство лекарственных препаратов, находящихся в сыворотке таково, что при взаимодействии биуретового реактива с сывороткой наблюдается либо развитие окраски, отличной от фиолетовой, либо появление мутности. Оценить количество белка в такой сыворотке невозможно.

Содержание общего белка устойчиво в сыворотке и плазме в течение 1 недели при комнатной температуре и, по крайней мере, 2 месяца при -20 °С.

Ход определения общего белка в сыворотке крови по биуретовой реакции

Опытная проба: к 0,1 мл сыворотки прибавляют 5 мл рабочего раствора биуретового реактива и смешивают, избегая образования пены. Через 30 минут (и не позднее чем через час) 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 готовят рабочие растворы как указано ниже.			
№ пробирки	Калибровочный раствор альбумина, мл	154 ммоль/л раствор хлорида натрия, мл	Концентрация альбумина, г/л
1	0,2	0,8	20
2	0,4	0,6	40
3	0,6	0,4	60
4	0,8	0,2	80
5	1	-	100

Из каждого разведения берут по 0,1 мл рабочего раствора и прибавляют по 5 мл рабочего биуретового реактива; через 30 — 60 минут измеряют на фотометре, как в опыте, против холостой пробы, начиная с наименьшей концентрации. По полученным данным строят калибровочный график. Калибровочная кривая линейна до 100 г/л альбумина.

Работа № 2. Определение общего белка в сыворотке крови биуретовым методом (с помощью стандартного раствора).

Принцип метода: в щелочной среде белок образует с ионами меди комплексное соединение фиолетового цвета, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации белка в пробе (сыворотка крови, плазма).

Оборудование:

штатив с пробирками,
микропипетки – дозаторы,
наконечники, пипетки на 1 или 2 мл,
кюветы толщиной 3 мм или 5 мм,
ФЭК,анализатор

Исследуемый материал: сыворотка крови.

Реактивы:

- 1) реагент - биуретовый реактив, готовый к использованию.
- 2) калибратор – калибровочный раствор альбумина, 70 г/л, готовый к использованию.

Ход работы: Отмерить

	Опытная проба	Стандартная проба	Калибратор
Сыворотка крови	0,02мл	0,02мл	0,02мл
РЕАГЕНТ	1,0мл	1,0мл	1,0мл

Пробы перемешать, выдержать 15 мин при комнатной температуре (18- 25С). Измерить оптическую плотность опытной (Еоп) и стандартной (Ест) проб против реагента.

Расчет: концентрацию белка (С) в пробе в г/л рассчитать по формуле:

$C = E_{op} / E_{ст} \times 70$, где 70 – концентрация белка в калибраторе, г/л. Нормальные величины: в сыворотке крови - 65-85 г/л. В

Клинико-диагностическое значение. Сыворотка крови содержит смесь белков, различных по физиологическому значению, структуре и физикохимическим свойствам. Нормальное содержание белка в сыворотке крови 65-85 г/л, у детей до 6 месяцев 48-56 г/л. Нормальное содержание белка в слюне 0,5-4 г/л. Изменение содержания белка в сыворотке крови может свидетельствовать о

различных нарушениях. Снижение содержания белка (гипопротеинемия) может наблюдаться при потерях белка организмом (кровотечения, нефротический синдром, энтероколиты, ожоги, асцит), при белковом голодании (кахексия) или при снижении процессов биосинтеза белка (цирроз печени, мальабсорбция), при повышении распада белка (интоксикации, злокачественные новообразования, травма, лихорадка, гипертиреоз, сепсис). Повышенное содержание белка (гиперпротеинемия) бывает редко, это может быть при сгущении крови из-за значительной потери жидкости (длительная рвота, ожоговая болезнь), при наследственных заболеваниях – парапротеинемиях.

Работа № 3. Количественное определение альбумина в сыворотке крови.

Принцип метода. При взаимодействии альбумина с красителем бромкрезоловым зеленым в слабокислой среде образуется комплекс зеленого цвета, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации альбумина в пробе.

Оборудование:

ФЭК,

микропипетки-дозаторы,

наконечники, штатив с пробирками,

кюветы толщиной слоя 3 мм,

пипетки объемом 1 мл или 2 мл.

Реактивы: – набор реагентов «Альбумин-Ново» ЗАО «Вектор-Бест».

Состав: Реагент (Р) – раствор бромкрезолового зеленого в сукцинатном буфере, готовый к использованию.

Калибратор – калибровочный раствор альбумина, 40 г/л, готовый к использованию.

Исследуемый материал. Негемолизированная сыворотка, гепаринизированная

или ЭДТА – плазма крови.

Ход работы. Добавить в две пробирки реагенты согласно таблице:

	Опытная проба	Калибровочная проба
Калибратор		0,01
Проба (сыворотка, плазма)	0,01	
Реагент по	1,0	мл в опыт .и калибр.пробы

Перемешать, выдержать несколько минут, измерить оптическую плотность опытной (А) и калибровочной (К) проб против реагента.

Измерить в кюветах с длиной оптического пути 3 или 5 мм при длине волны 628 (578-640) нм. Окраска стабильна в течение 2-х часов.

Расчет. Концентрация альбумина в пробе (С) в г/л рассчитать по формуле:

$C = A / K \cdot 40$ 22 Норма содержания альбумина сыворотки крови: 37-53 г/л.

Клинико - диагностическое значение. Основные функции альбумина: связывание и транспорт некоторых катионов, малых и больших анионов, жирных кислот, билирубина, витамина С, лекарств, ксенобиотиков; поддержание постоянства коллоидно-осмотического (онкотического) давления и обеспечение клеток аминокислотами. Время полужизни - 15-20 дней. Гипоальбуминемия наблюдается при: а) снижении его синтеза в печени (цирроз печени, недоедание (кахексия), синдром мальабсорбции); б) повышении катаболизма (травма, инфекция, сепсис, лихорадка, гипоксия, синдром Кушинга, гипертиреоз, гиперкортицизм, злокачественные опухоли); в) аномальных потерях (шок, кровотечение, энтероколиты, нефротический синдром); г) патологическом распределении (после оперативных вмешательств, при ожогах, токсикозе, асците, плеврите). Гиперальбуминемия наблюдается при остром обезвоживании, при приеме анаболических стероидов.

ЛИТЕРАТУРА.

1.Практика лабораторных биохимических исследований: учебное пособие. Пустовалова Л.М. – Ростов н/Д.: Феникс, 2014

2. Теория лабораторных биохимических исследований (основы биохимии): учебное пособие. Пустовалова Л.М. – Ростов н/Д.: Феникс, 2014
3. Теория и практика лабораторных биохимических исследований учебник/Н.В.Любимова,И.В.Бабкина,Ю.С.Тимофеев-М.:ГЭОТАР-Медиа,2020.416с.:ил.

Задания для самоконтроля

1. Ситуационные задачи

- 1) Отношение количества альбуминов к количеству глобулинов в сыворотке крови больного равно 1,5. Рассчитайте содержание глобулинов, если концентрация альбуминов равна 50 г/л.
- 2) Определить концентрацию общего белка у пациента,если:
опт.пл.опытной пробы- 0,54
опт.пл.калибровочной пробы- 0,50
концентрация альб.в калибровочном р-ре-60г/л

2. Проверочные тесты

Выберите один правильный ответ

1. Белки – биополимеры, мономерами которых являются:
 - а) карбоновые кислоты
 - б) амины
 - в) β -аминокислоты
 - г) α -аминокислоты
 - д) амиды карбоновых кислот.
2. В белках аминокислотные остатки связаны между собой:
 - а) сложноэфирными связями
 - б) водородными связями
 - в) пептидными связями
 - г) ангидридными связями
 - д) гликозидными связями
3. К основным аминокислотам относится:
 - а) аланин
 - б) лизин
 - в) тирозин
 - г) глутамин
 - д) триптофан
4. К кислым аминокислотам относится:
 - а) лейцин

- б) цистеин
- в) аспарагиновая кислота
- г) треонин
- д) валин

5. В изоэлектрической точке пептиды имеют:

- а) отрицательный заряд
- б) положительный заряд
- в) нейтральны

6. Между остатками треонина и глутамина при формировании третичной структуры белка возникает:

- а) ионная связь
- б) ковалентная связь

7. Первичная структура белка – это:

- а) аминокислотный состав полипептидной цепи
- б) линейная структура полипептидной цепи, образованная ковалентными связями между аминокислотными остатками
- в) порядок чередования аминокислот в полипептидной цепи, соединенных пептидными связями, образованными α -карбоксильной группой одной аминокислоты и α -аминогруппой другой аминокислоты
- г) структура полипептидной цепи, стабилизированная связями

8. Вторичная структура белка:

- а) пространственное, трехмерное расположение полипептидной цепи, фиксированной межрадиальными связями, гидрофобными взаимодействиями
- б) порядок чередования α -аминокислот в полипептидной цепи, соединенных пептидными связями
- в) объединение в определенном порядке двух или большего числа протомеров в молекуле олигомерного белка посредством не ковалентных связей
- г) способ укладки полипептидной цепи в виде α -спирали

9. Третичная структура белка:

- а) пространственное, трехмерное расположение полипептидной цепи, фиксированной межрадиальными связями
- б) порядок чередования α -аминокислот в полипептидной цепи, соединенных пептидными связями
- в) объединение в определенном порядке двух или большего числа протомеров в молекуле олигомерного белка посредством не ковалентных связей и взаимного узнавания комплементарных контактных поверхностей
- г) способ укладки полипептидной цепи в виде α -спирали

10. Четвертичная структура белка:

- а) пространственное, трехмерное расположение полипептидной цепи, фиксированной межрадиальными связями, гидрофобными взаимодействиями

б) порядок чередования α -аминокислот в полипептидной цепи, соединенных пептидными связями

в) объединение в определенном порядке двух или большего числа протомеров в молекуле олигомерного белка посредством не ковалентных связей

г) способ укладки полипептидной цепи в виде α -спирали

11. Белки – биополимеры, мономерами которых является:

а) карбоновые кислоты

б) амины

в) β -аминокислоты

г) α -аминокислоты

д) амиды карбоновых кислот

12. В белках аминокислотные остатки связаны между собой:

а) сложноэфирными связями

б) водородными связями

в) пептидными связями

г) ангидридными связями

д) гликозидными связями

13. В изоэлектрической точке пептиды имеют:

а) отрицательный заряд

б) положительный заряд

в) нейтральны

3. Вопросы

1) Закончите определение:

Аминокислотами называют _____.

2) Какие связи в белковой молекуле вы знаете, укажите сильные и слабые.

3) Перечислите ферменты, принимающие участие в переваривании белков в ЖКТ

4) Гниение белков в кишечнике это...

5) Назвать одицие пути обмена аминокислот.

6) Классификация белков плазмы крови.

7) Диагностическое значение общего белка и альбумина.

основные причины гипо- и гиперпротеинемии, гипо- и гиперальбуминемии.

РАЗДЕЛ 5: Проведение лабораторных биохимических исследований по определению показателей липидного обмена.

Практическое занятие №15: Общая характеристика липидов, их биологическое значение, классификация. Выполнение качественных реакций на липиды. Исследование липидного состава биологических жидкостей

Формируемые профессиональные компетенции 2.1, 2.2, 2.3.

Учебные цели (знать, уметь, иметь практический опыт):

Знать	Уметь	Владеть навыками
1-12	1-13	1-9

Воспитательная цель Привитие умений и навыков учебной работы и коллективного труда. Формирование целостного миропонимания и современного научного мировоззрения, основанного на признании приоритетов общечеловеческих ценностей: гуманности, милосердия, сострадания, уважения к жизни и здоровью человека.

Развивающая цель Формирование навыков самообразования, самореализации личности и развитие речи, мышления, памяти .

Межпредметные связи ОПД. 03 Химия, ОПД. 16 Физико-химические методы исследования и техника лабораторных работ, ОПД . 02 Анатомия.

Вопросы для подготовки к занятию

1. Основные правила техники безопасности при работе в лаборатории.
2. Строение и свойства основных классов липидов.
3. Классификация липидов, их основные биологические функции.

Список понятий для усвоения темы

Липиды, стериды, воска, гликолипиды, липопротеиды, триацилглицериды, фосфолипиды, холестерин, хиломикронны.

1. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Липиды – это органические вещества, которые плохо растворимы или нерастворимы в воде, но растворяются в органических растворителях; они являются настоящими или потенциальными эфирами жирных кислот. Содержание липидов в организме человека составляет в среднем 10-20% от массы тела. Липиды можно условно разделить на два вида: протоплазматические и резервные. Протоплазматические (конституционные) входят в состав всех органов и тканей. Они составляют примерно 25% всех липидов организма и практически остаются на одном уровне в течение всей жизни. Резервные липиды запасаются в организме и количество их меняется в зависимости от различных условий. Биологическое значение липидов в организме велико. Так, они обнаружены в составе всех органов и тканей. Наибольшее количество (до 90%) содержится в жировой ткани. В мозге липиды составляют половину массы органа.

Функции липидов в организме:

Энергетическая – наряду с углеводами являются основным энергетическим топливом клетки. При сжигании 1 г липидов выделяется 38,9 кДж (или 9,3 ккал).

Структурная – липиды (фосфолипиды, гликолипиды) вместе с белками входят в состав биологических мембран.

Защитная – функция механической защиты, роль которой выполняет подкожная жировая клетчатка.

Терморегуляторная – реализация этой функции осуществляется благодаря двум аспектам: а) жир плохо проводит тепло, поэтому является теплоизолятором; б) при охлаждении организма на генерирование тепла за счёт выделения энергии расходуются липиды.

Регуляторная – ряд гормонов (половые, гормоны коры надпочечников) являются производными липидов.

Липиды являются источником ненасыщенных высших жирных кислот – витамина F, одного из незаменимых факторов питания.

Жир является источником эндогенной воды в организме. При окислении 100 г липидов образуется 107 г воды.

Липиды выполняют функцию естественных растворителей. Они обеспечивают всасывание в кишечнике незаменимых жирных кислот и жирорастворимых витаминов.



КЛАССИФИКАЦИЯ ЛИПИДОВ

В зависимости от химического состава липиды подразделяют на несколько классов.

1. Простые липиды включают вещества, молекулы которых состоят только из остатков жирных кислот (или альдегидов) и спиртов. К ним относят
 - жиры (триглицериды и другие нейтральные глицериды)
 - воски
2. Сложные липиды

- производные ортофосфорной кислоты (фосфолипиды)
- липиды, содержащие остатки сахаров (гликолипиды)
- стерины
- стериды

2. ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ ЗАНЯТИЯ

Работа 1. Выделение лецитинов из желтка куриного яйца.

При гидролизе лецитинов высвобождаются молекула глицерина, 2 молекулы жирных кислот (из которых одна является непредельной), молекула фосфорной кислоты и холин.

Реактивы:

Аммиак водный, концентрированный, 20% гидроксид калия, лактоза, мальтоза, спирт, ацетон, дистиллированная вода, желток куриного яйца.

Оборудование:

Химический стакан, стеклянная палочка, спиртовки, фильтр, пробирки.

Ход работы:

В небольшой стаканчик вносят 1/5-1/6 желтка куриного яйца и, помешивая стеклянной палочкой, добавляют 10 мл горячего спирта. После остывания содержимое стаканчика фильтруют в сухую пробирку. Фильтрат должен быть прозрачным. Если в нем появляется муть, фильтрацию повторяют до получения прозрачного фильтрата.

Со спиртовым фильтратом проделывают следующие реакции:

Осаждение ацетоном: в сухую пробирку наливают 2-3 мл ацетона и по каплям прибавляют спиртовый раствор лецитинов. Выпадает осадок, так как лецитины в ацетоне не растворяются.

Получение эмульсии лецитинов: для получения эмульсии к 2-3 мл спиртового раствора лецитинов добавляют по каплям дистиллированную воду. Образуется устойчивая эмульсия лецитинов в воде.

Работа 2. Обнаружение кетоновых тел в моче.

К компонентам мочи, которые у здорового человека не обнаруживаются обычными качественными реакциями и считаются патологическими, относят такие вещества как белок, сахар, кетоновые тела, желчные пигменты, желчные кислоты, кровь. Кетоновые тела появляются в моче при нарушениях углеводного и липидного обменов, в частности при сахарном диабете и голодании.

Реактивы:

Раствор Люголя, концентрированный, 10% гидроксид натрия, моча, раствор хлорного железа, ацетон, тест - полоски, 10% раствор нитропруссид натрия, концентрированная уксусная кислота.

Оборудование:

Пробирки, пипетки.

Ход работы:

(1) *Реакция на ацетон с йодом (проба Либена).* При взаимодействии ацетона с йодом в щелочной среде образуется йодоформ, присутствие которого узнается по появлению желтого осадка и характерному запаху.

К 5 каплям исследуемой мочи добавляют каплю 10% раствора гидроксида натрия и 2-3 капли раствора Люголя. При наличии ацетона выделяется желтый осадок и появляется запах йодоформа.

(2) *Реакция на ацетон и ацетоуксусную кислоту с нитропруссидом натрия (проба Легалья).* Ацетон и ацетоуксусная кислота в щелочной среде образуют с нитропруссидом натрия оранжево-красное окрашивание, которое при подкислении уксусной кислотой становится вишнево-красным.

К 5 каплям мочи добавляют 1 каплю 10% раствора нитропруссид натрия и 2 капли 10% раствора гидроксида натрия, появляется оранжево-красное окрашивание. При подкислении концентрированной уксусной кислотой окраска становится вишнево-красной.

(3) Реакция на ацетоуксусную кислоту с хлорным железом (проба Герхардта). Енольная форма ацетоуксусной кислоты, взаимодействуя с хлорным железом, образует комплексное соединение вишнево-красного цвета.

К 5 каплям мочи прибавляют по каплям раствор 1% хлорного железа, появляется вишнево-красное окрашивание.

(4) Экспресс-анализ кетоновых тел в моче с помощью диагностических (тест) полосок. Принцип анализа основан на появлении фиолетового окрашивания в процессе взаимодействия кетоновых тел с нитропруссидом натрия (реакция Легалья).

Диагностические полоски кетофан или диафан (для исследования мочи на глюкозу и кетоны) опускают на 1-2 секунды в исследуемую мочу так, чтобы зоны индикации были смочены. Избыток мочи снимают с полоски, соприкасаясь со стенкой сосуда. Полоски оставляют в горизонтальном положении. Через 60 секунд сопоставляют окраску зон индикации с соответствующей цветной шкалой.

Результаты опыта оформить в тетради.

Выполнить задания в тетрадях для самостоятельной работы

Литература:

1. Практика лабораторных биохимических исследований: учебное пособие. Пустовалова Л.М. – Ростов н/Д.: Феникс, 2014
2. Теория лабораторных биохимических исследований (основы биохимии): учебное пособие. Пустовалова Л.М. – Ростов н/Д.: Феникс, 2014

Практическое занятие №16-17: Переваривание и всасывание липидов в ЖКТ. Промежуточный обмен основных представителей класса липидов. Унифицированные методы определения общего холестерина и триглицеридов, клинико-диагностическое значение.

Формируемые профессиональные компетенции 2.1, 2.2, 2.3.

Учебные цели (знать, уметь, иметь практический опыт):

Знать	Уметь	Владеть навыками
1-12,17,18	1-14,17,18	1-9

Воспитательная цель Привитие умений и навыков учебной работы и коллективного труда. Формирование целостного миропонимания и современного научного мировоззрения, основанного на признании приоритетов общечеловеческих ценностей: гуманности, милосердия, сострадания, уважения к жизни и здоровью человека.

Развивающая цель Формирование навыков самообразования, самореализации личности и развитие речи, мышления, памяти .

Межпредметные связи ОПД. 03 Химия, ОПД. 16 Физико-химические методы исследования и техника лабораторных работ, ОПД . 02 Анатомия.

Вопросы для подготовки к занятию

- 1.Основные правила техники безопасности при работе в лаборатории.
- 2.Этапы переваривания и всасывания липидов в ЖКТ.
- 3.Функции желчных кислот.
- 4.Ферменты принимающие участие в процессе переваривания липидов.
- 5.Транспортные формы липидов.
- 6.Функции холестерина в организме человека.
- 7.Клинико-диагностическое значение определения холестерина и триглицеридов.

Список понятий для усвоения темы

Желчные кислоты,простые и смешанные мицеллы,эмульгирование,ЛПНП,ЛПВП.

1. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Липиды являются обязательной составной частью сбалансированного пищевого рациона человека.

Основные этапы переваривания:

- 1.Эмульгирование
- 2.Гидролиз
- 3.Образование смешанных мицелл из простой мицеллы
- 4.Транспорт и всасывание смешанной мицеллы в энтероцитахслизистой кишечника
- 5.Распад смешанной мицеллы в энтероцитах слизистой ЖКТ и всасывание желчных кислот и их солей в кровь с последующей доставкой в печень.
- 6.Ресинтез триацилглицеринов в энтероцитах слизистой ЖКТ.
- 7.Образование транспортных форм липидов в энтероцитах слизистой ЖКТ.
- 8.Хиломикроны и ЛОНП через лимфатическую систему кишечника попадают в грудной лимфатический проток,а затем в общий круг кровообращения.

Липолитические ферменты – гидролазы, катализирующие гидролиз липидов. Липазы расщепляют триацилглицериды (жиры), фосфолипазы – фосфолипиды, холестеразы – эфиры холестерина.

Липолитические ферменты проявляют максимальную активность при $pH = 7,8-8,2$. Обязательным условием переваривания липидов в пищеварительном тракте является эмульгирование. Эмульгаторы – вещества, понижающие поверхностное натяжение и препятствующие склеиванию частиц жира. В организме природными эмульгаторами являются соли желчных кислот и сывороточный альбумин.

Липиды с пищей поступают в ротовую полость, где нет липолитических ферментов и переваривания не происходит. В желудке липаза присутствует, однако pH желудка (1,0–1,5) не соответствует оптимуму pH липазы (7,8–8,2), поэтому происходит лишь незначительный распад жиров (молока, яичного желтка). Отделом, в котором переваривается основная часть липидов, является тонкий кишечник. Поджелудочная железа и клетки слизистой оболочки кишечника секретирует липолитические ферменты, pH кишечника 7,8–8,2, что близко к оптимуму.

Жиры гидролизуются липазой на 90–97%, из них 40% расщепляется на глицерин и жирные кислоты, 50–57% – на моноглицериды. Оставшиеся

жиры либо всасываются в тонкой кишке (если размер жировых капель не превышает 0,5 мкм), либо поступают в толстую кишку и затем выводятся из организма.

Фосфолипиды гидролизуются набором фосфолипаз, которые последовательно гидролизуют молекулу на составные части. Первый фермент, фосфолипаза А, отщепляет ненасыщенную жирную кислоту от второго углеродного атома глицерина, образуется лизофосфолипид, который также обладает свойствами эмульгатора.

Далее последовательно функционируют фосфолипазы В, С и Д. Они расщепляют молекулы на глицерин, жирную кислоту, фосфорную кислоту и азотистое основание:

Переваривание холестерина

Холестерин существует в свободной и связанной формах. Свободная форма – собственно полициклический спирт холестерин. Связанная форма – эфиры

холестерина, которые и подвергаются гидролизу в кишечнике. Эфиры холестерина распадаются по действию холестераз.

Всасывание

Продукты переваривания липидов подразделяются на водорастворимые и жирорастворимые компоненты. Водорастворимые продукты распада липидов – глицерин, моноацилглицериды, H_3PO_4 , азотистые основания. Они легко проникают в клетки слизистой оболочки кишечника. Жирорастворимые

компоненты (жирные кислоты, холестерин) всасываются с помощью желчных кислот, с которыми они образуют водорастворимые комплексы.

К желчным кислотам относятся холевая, хенодезоксихолевая и

дезоксихолевая кислоты:

Желчные кислоты синтезируются из холестерина

Для организма важны холевая и хенодезоксихолевая кислоты. Биологически активные формы – парные желчные кислоты – представляют собой

соединения данных кислот с гликоколом (глицином) и таурином, они образуются в желчном пузыре. В кишечнике парные желчные кислоты соединяются в мицеллы, наружная часть которых – гидрофильна, внутренняя – гидрофобна. Жирные кислоты, холестерин и фосфолипиды образуют простую мицеллу. Мицеллы выделяются в просвет 12-перстной кишки, где взаимодействуют с МАГ, ДАГ, ХС, ВЖК, образуя смешанные мицеллы. Смешанные мицеллы всасываются через стенку кишечного эпителия. В эпителиальных клетках ворсинок кишечника сложные мицеллы распадаются на желчные кислоты и продукты распада липидов. Желчные кислоты всасываются в кровь и поступают в печень, где снова включаются в состав желчи.

Пищеварительные липолитические ферменты

Липолизом называется гидролиз липидов, *липолитическими ферментами* — ферменты, катализирующие гидролиз липидов. К пищеварительным липолитическим ферментам относятся липазы желудка, липаза, фосфолипаза и холестерераза кишечника.

Липаза желудка — слабоактивная гидролаза, гидролизует жиры молока.

Липаза тонкого кишечника — гидролитический фермент, катализирующий гидролиз жиров. Продуктами гидролиза являются моно-и диацилглицериды, глицерин, жирные кислоты. Оптимум рН 7,8—8,2. Активатором являются желчные кислоты. Обязательным условием переваривания жиров является их эмульгирование. К природным эмульгаторам жиров относятся сывороточный альбумин и желчные кислоты.

Фосфолипазы — гидролазы, катализирующие гидролиз фосфолипидов в тонком кишечнике. Активатором фосфолипаз и эмульгаторов фосфолипидов являются желчные кислоты. К фосфолипазам относятся фосфолипазы А, В, С, Д, которые последовательно гидролизуют молекулу фосфолипидов.

Первый фермент - фосфолипаза А — отщепляет ненасыщенную жирную кислоту от второго углеродного атома глицерина, в результате чего образуется лизофосфолипид, который обладает свойствами эмульгатора. Далее последовательно действуют фосфолипазы В, С и Д, которые расщепляют молекулы фосфолипида на глицерин, жирную и фосфорную кислоты и азотистое основание.

Холестераза относится к гидролазам. Субстратом для нее являются эфиры холестерина (сложносвязанная форма холестерина). Оптимум рН 7,8—8,2.

Активатор — желчные кислоты. Продукты гидролиза — свободный холестерин и кислоты.

ПРОМЕЖУТОЧНЫЙ ОБМЕН ЛИПИДОВ

1. Внутриклеточный липолиз.
2. Окисление и биосинтез ВЖК
3. Перекисное окисление липидов.

Строение и функции холестерина.

Это особое воскообразное вещество, которое имеет свое строение, свойства и структурную формулу. Он относится к стероидам, потому что в его составе обнаружены циклические структуры. Структурная формула холестерина записывается так: $C_{27}H_{46}O$. В нормальных условиях в очищенном виде он представляет собой вещество, состоящее из маленьких кристалликов. Их температура плавления около $149\text{ }^{\circ}\text{C}$. При дальнейшем повышении температуры они закипают (около $300\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Холестерин присутствует только в животных организмах, в растениях его нет. В организме человека холестерин содержится в печени, спинном и головном мозге, надпочечниках, половых железах, жировой ткани; входит в состав оболочек почти всех клеток. Много холестерина содержится в материнском молоке. Общее количество этого вещества в нашем организме составляет примерно 350 г, из которых 90% находится в тканях и 10% — в крови (в виде сложных эфиров с жирными кислотами). Из холестерина состоит свыше 8% плотного вещества мозга.

Большая часть холестерина вырабатывается самим организмом (эндогенный холестерин), гораздо меньшая поступает с пищей (экзогенный холестерин). Примерно 80% этого вещества синтезируется в печени, остальной холестерин вырабатывается в стенке тонкой кишки и некоторых других органах.

Без холестерина невозможна нормальная работа жизненно важных органов и систем нашего организма. Он входит в состав клеточных мембран, обеспечивая их прочность и регулируя их проницаемость, а также оказывая влияние на активность мембранных ферментов.

Следующая функция холестерина заключается в его участии в метаболических процессах, производстве желчных кислот, необходимых для эмульсации и абсорбции жиров в тонком кишечнике, и различных

стероидных гормонов, в том числе половых. При непосредственном участии холестерина происходит выработка в организме витамина D (который играет ключевую роль в обмене кальция и фосфора), гормонов надпочечников (кортизола, кортизона, альдостерона), женских половых гормонов (эстрогенов и прогестерона), мужского полового гормона тестостерона.

Поэтому бесхолестериновые диеты вредны еще и тем, что длительное их соблюдение часто приводит к возникновению половых дисфункций (как у мужчин, так и у женщин).

Кроме того, холестерин необходим для нормальной деятельности мозга. Согласно последним научным данным, холестерин напрямую влияет на интеллектуальные способности человека, так как принимает участие в образовании нейронами головного мозга новых синапсов, обеспечивающих реактивные свойства нервной ткани.

И даже ЛПНП, «плохой» холестерин, тоже необходим нашему организму, так как он играет ведущую роль в работе иммунной системы, включая защиту от рака. Именно липопротеиды низкой плотности способны нейтрализовать различные бактерии и токсины, попадающие в кровь. Поэтому недостаток жиров в рационе вреден точно так же, как их избыток. Питание должно быть регулярным, сбалансированным и соответствовать индивидуальным потребностям организма в зависимости от условий проживания, физической активности, индивидуальных особенностей, пола и возраста.

Липопротеины (липопротеиды) — класс сложных белков. Так, в составе липопротеинов могут быть свободные жирные кислоты, нейтральные жиры, фосфолипиды, холестериды. Липопротеины представляют собой комплексы, состоящие из белков (аполипопротеинов; сокращенно — апо-ЛП) и липидов, связь между которыми осуществляется посредством гидрофобных и электростатических взаимодействий. Липопротеины подразделяют на свободные, или растворимые в воде (липопротеины плазмы крови, молока и др.), и нерастворимые, т. н. структурные (липопротеины мембран клетки, миелиновой оболочки нервных волокон, хлоропластов растений). Среди свободных липопротеинов (они занимают ключевое положение в транспорте и метаболизме липидов) наиболее изучены липопротеины плазмы крови, которые классифицируют по их плотности. Чем выше содержание в них липидов, тем ниже плотность липопротеинов.

Различают липопротеины :

1. очень низкой плотности (ЛОНП),
2. низкой плотности (ЛНП),
3. высокой плотности (ЛВП)
4. хиломикроны.

Каждая группа липопротеинов очень неоднородна по размерам частиц (наиболее крупные — хиломикроны) и содержанию в ней апо-липидопротеинов.

2. ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ ЗАНЯТИЯ

Метод ферментативного определения общего холестерина в сыворотке крови.

Принцип метода состоит в том, что холестерин окисляется холестеролоксидазой с высвобождением перекиси водорода, которая в присутствии пероксидазы превращает р-аминоаипирин в окрашенное соединение, интенсивность окраски пропорциональна концентрации холестерина.

Реактивы, исследуемый материал:

1. Рабочий реактив.
2. Стандартный раствор холестерина.
3. Исследуемая сыворотка.

Концентрация холестерина рассчитывается по формуле:

$$C_{\text{оп}} = (E_{\text{оп}} * C_{\text{ст}}) / E_{\text{ст}},$$

где $C_{\text{оп}}$ – концентрация холестерина в исследуемой пробе, $E_{\text{оп}}$ – оптическая плотность исследуемой пробы, $C_{\text{ст}}$ – концентрация холестерина в стандартной пробе, $E_{\text{ст}}$ – оптическая плотность стандартной пробы

Нормальный уровень общего холестерина – 3,2-5,2 ммоль/л,

Диагностическое значение:

Повышенная концентрация холестерина крови (*гиперхолестеринемия*) – это один из главных факторов развития атеросклероза. При оценке зависимости смертности от ИБС и концентрации холестерина с 5,2 до 6,5 ммоль/л, и увеличивается в 4 раза при концентрации холестерина 7,8 ммоль/л.

Европейское общество по борьбе с атеросклерозом разделяет уровень холестерина по степеням тяжести:

легкая гиперхолестеринемия – 200-250 мг/дл (5,2-6,5 ммоль/л).

умеренная гиперхолестеринемия – 250-300 мг/дл (6,5-7,8 ммоль/л).

высокая гиперхолестеринемия – свыше 300 мг/дл (7,8 ммоль/л).

Это имеет значение для оценки степени риска развития атеросклероза и ИБС и, соответственно, определения тактики ведения пациентов.

Однако изолированное определение уровня общего холестерина в настоящее время не рекомендуется проводить, даже для скрининга. Как известно общий холестерин представляет собой суммарную концентрацию холестерина основных классов липопротеинов: ХС-ЛПВП, ХС-ЛПОНП и ХС-ЛПНП. На практике проводится определение общего холестерина, холестерина ЛПВП и триацилглицеринов, на основании полученных результатов рассчитывают ХС-ЛПОНП и ХС-ЛПНП (порядок расчета изложен в работе «Расчет индекса атерогенности липидов»). Исходя из полученных результатов, определяют тип гиперлипидемии.

Гиперхолестеринемия может быть первичной или семейной, обусловлена генетической предрасположенностью (например: из-за отсутствия или недостатка рецепторов к ЛПНП) или преобладанием в рационе продуктов, богатых холестерином (животные жиры, яйца, твердые сыры и др.)

Но значительно чаще встречается вторичная гиперхолестеринемия, т.е. обусловленная различными заболеваниями.

Вторичная гиперхолестеринемия:

1. Заболевания печени, внутри- и внепеченочный холестаза.
2. Гломерулонефрит, нефротический синдром, хроническая почечная недостаточность.
3. Злокачественные опухоли поджелудочной железы и простаты.

4. Гипотиреоз.
5. Подагра.
6. Ишемическая болезнь сердца.
7. Сахарный диабет.
8. Беременность.
9. Алкоголизм.
10. Пища, богатая холестерином и ненасыщенными жирными кислотами.
11. Применение таких препаратов, как диуретики, циклоспорин, андрогены, эргокальциферол (высокие дозы), глюкокортикостероиды, леводопа, амиодарон.

Гипохолестеринемия – т.е. снижение концентрации менее 3, 2 ммоль/л (у взрослых) имеет значительно меньшее клиничко диагностическое значение, наблюдается при:

1. Кахексия, голодание.
2. Синдром мальабсорбции.
3. Обширные ожоги.
4. Тяжелые острые заболевания и инфекции.
5. Некроз гепатоцитов, терминальная стадия цирроза печени, гепатокарцинома.
6. Сепсис.
7. Гипертиреоз.
8. Дефицит α -липопротеина.
9. Мегалобластическая анемия.
10. Хронические обструктивные заболевания легких.
11. Ревматоидный артрит.
12. Умственная отсталость.
13. Лимфоангиоэктазия кишечника.

**Определение содержания триацилглицеролов в сыворотке крови
ферментативным методом**

Принцип метода: Метод определения триацилглицеролов (ТАГ) основан на реакции их гидролитического расщепления под действием фермента липазы. Высвободившийся глицерол далее ферментативно окисляется с образованием пероксида водорода. Пероксид водорода реагирует с хромогеном под действием пероксидазы с образованием окрашенного хинонимина.

Интенсивность образующейся окраски прямо пропорциональна содержанию триацилглицеролов в пробе.

Линейность метода: до 11,4 ммоль/л.

Норма: 0,6 – 2,3 ммоль/л.

Триацилглицеролы в негемолизированной сыворотке сохраняют стабильность при температуре хранения 2-8°C в течение нескольких дней.

Оборудование и реагенты:

1. Спектрофотометр с термостатированной кюветой, длина волны 540 нм, длина оптического пути 1 см; температура реакции 37°C;
2. Секундомер;
3. Автоматические пипетки на 10 мкл и 1000 мкл;
4. Сыворотка крови;
5. Дистиллированная вода;
6. Рабочий реагент (АТФ □ 1 ммоль/л, 4-аминоантипирин □ 0,4 ммоль/л, глицеролфосфатоксидаза (ГФО) □□2000 Е/л, липаза □□200 000 Е/л, глицеролкиназа (ГК) □□6000 Е/л, пероксидаза □□500 Е/л в буфере);
7. Калибратор -□ калибровочный раствор триацилглицеролов, 2,28 ммоль/л.

Проведение анализа

Добавить в пробу:	Холостая проба	Калибровочная проба	Опытная проба
1. Калибратор	--	10 мкл	--
2. Сыворотка	--	--	10 мкл
3. Реагент	1 мл	1 мл	1 мл

Перемешать тщательно содержимое пробирок и инкубировать при температуре 37°C в течение 5 минут или при комнатной температуре (18-25°C) в течение 15 минут. Измерить оптическую плотность опытной ($D_{оп}$) и калибровочной ($D_{калиб}$) проб против холостой пробы при длине волны 540 нм.

Окраска раствора стабильна в течение 30 минут.

Расчет

Содержание триацилглицеролов в сыворотке рассчитывают по стандарту (калибратор) по формуле:

$$C_{(ммоль/л)} = (D_{оп}/D_{калиб}) * C_{калиб}$$

где C – концентрация триацилглицеролов в анализируемой пробе, ммоль/л;

$D_{оп}$ – оптическая плотность опытной пробы;

$D_{калиб}$ – оптическая плотность калибровочной пробы;

$C_{калиб}$ – концентрация триацилглицеролов в калибраторе, ммоль/л.

Клинико-диагностическое значение определения триглицеридов.

Рекомендованы пороговые уровни для оценки триглицеридемии:

- норма — 0,5–1,7 ммоль/л.
- пограничные величины — 1,82—5,65 ммоль/л;
- гипертриглицеридемия — выше 5,65 ммоль/л;
- высокий риск панкреатита — выше 11,3 ммоль/л.

Увеличение концентрации ТГ (гипертриглицеридемия) наблюдается при эссенциальной гиперлипемии и при первичной (семейной) гиперлипопротеидемии. Считают, что определение ТГ является одним из решающих показателей для диагностики отдельных типов врожденного нарушения обмена липидов.

К вторичному повышению концентрации триглицеридов приводят: ожирение; нарушение толерантности к глюкозе; вирусный гепатит; алкоголизм; алкогольный цирроз; билиарный цирроз; острый и хронический панкреатит; нефротический синдром; хроническая почечная недостаточность; гипертоническая болезнь; острый инфаркт миокарда; хроническая ИБС; тромбоз сосудов мозга; гипотиреоз; сахарный диабет; подагра; невротическая анорексия;

Снижение ТГ наблюдается при α - β -липопротеидемии, гиполипопротеидемии, хронических обструктивных заболеваниях легких, инфаркте мозга, гипертиреозе, гиперпаратиреозе, недостаточности питания и другие.

Индекс атерогенности (ИА, КА, ХКА) – числовое значение, которое отражает нарушение холестерина обмена. Для его определения необходимы данные анализа на общий холестерол и липопротеины высокой плотности. Расчет выполняется по формуле: $(\text{ОХС}-\text{ЛПВП})/\text{ЛПВП}$. Коэффициент помогает оценить вероятность развития атеросклероза, сердечных, сосудистых патологий, отследить эффективность профилактических мероприятий у лиц из групп риска.

В норме меньше 3.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Практика лабораторных биохимических исследований: учебное пособие. Пустовалова Л.М. – Ростов н/Д.: Феникс, 2014
2. Теория лабораторных биохимических исследований (основы биохимии): учебное пособие. Пустовалова Л.М. – Ростов н/Д.: Феникс, 2014
3. Теория и практика лабораторных биохимических исследований учебник/Н.В.Любимова, И.В.Бабкина, Ю.С.Тимофеев-М.: ГЭОТАР-Медиа, 2020. 416 с.: ил.

Задания для самоконтроля

Тестовые задания по разделу липидный обмен:

1. Нейтральные жиры - это:
 - а) сложные эфиры глицерола и жирных кислот
 - б) сложные эфиры одноатомных спиртов и жирных кислот
 - в) сложные липиды, содержащие остатки моносахаров
 - г) производные карбоновых кислот

2. Холестерин является:

- а) предшественником витамина D
- б) предшественником стероидных гормонов
- в) предшественником желчных кислот
- г) всё выше перечисленное подходит

3. Ланолин относится к:

- а) нейтральным жирам
- б) воскам
- в) стероидам
- г) фосфолипидам

4. Воска выполняют в основном функцию:

- а) энергетическую
- б) каталитическую
- в) регуляторную
- г) защитную

5. В состав гликолипидов не входит:

- а) спирт сфингозин
- б) фосфорная кислота
- в) жирные кислоты
- г) сиаловые кислоты

6. Триглицериды- это:

- а) многоатомные спирты
- б) эфиры спирта глицерина и жирных кислот
- в) эфиры спирта сфингозина и жирных кислот
- г) эфиры спирта глицерина и жирных кислот с остатками фосфорной кислоты

7. Фосфолипиды - это:

- а) сложные липиды, содержащие углеводы
- б) сложные липиды, содержащие фосфор
- в) простые липиды
- г) сложные липиды, содержащие белок

Ситуационные задачи:

1. Рассчитать концентрацию холестерина в крови пациента, если известна оптическая плотность опытной пробы пациента, оптическая плотность стандартного раствора и концентрация холестерина в стандартном растворе. Интерпритировать результат.

2. Рассчитать концентрацию триглицеридов в крови пациента, если известна оптическая плотность опытной пробы пациента, оптическая плотность стандартного раствора и концентрация триглицеридов в стандартном растворе. Интерпритировать результат.

3. Рассчитать индекс атерогенности, если известно значение общего холестерина и ЛПВП.

ПРОДОЛЖИТЬ ПРЕДЛОЖЕНИЕ:

1. В состав смешанной мицеллы входят...

2. Эмульгирование – это...

3. Гидролиз липидов идет под действием...

4. Основные транспортные формы липидов ...
5. Вторичные гиперхолестеринемии это следствие заболеваний...
6. Этапы переваривания липидов...
7. Холестерин необходим для...

РАЗДЕЛ 6: Проведение лабораторных биохимических исследований по определению показателей водно-минерального обмена, кислотно-основного состояния.

Практическое занятие №18-19: Потребность в воде, роль воды в организме. Регуляция водного баланса. Осмотическое давление. Осмолярность плазмы.

Формируемые профессиональные компетенции 2.1, 2.2, 2.3.

Учебные цели (знать, уметь, иметь практический опыт):

Знать	Уметь	Владеть навыками
1-12,17,18	1-14,17,18	1-9

Воспитательная цель Привитие умений и навыков учебной работы и коллективного труда. Формирование целостного миропонимания и современного научного мировоззрения, основанного на признании приоритетов общечеловеческих ценностей: гуманности, милосердия, сострадания, уважения к жизни и здоровью человека.

Развивающая цель Формирование навыков самообразования, самореализации личности и развитие речи, мышления, памяти .

Межпредметные связи ОПД. 03 Химия, ОПД. 16 Физико-химические методы исследования и техника лабораторных работ, ОПД . 02 Анатомия.

Вопросы для подготовки к занятию

1. Основные правила техники безопасности при работе в лаборатории.
2. Роль воды в организме .
3. Потребность в воде, распределение воды в организме.
4. Регуляция водно-электролитного обмена.
5. Расчет осмолярности плазмы.

Список понятий для усвоения темы

Электролиты, осмолярность, осмотическое давление, рН, вазопрессин, альдостерон, ренин-ангиотензивная система, кислотно-основное состояние (КОС), ацидоз, алкалоз.

1. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Водно-солевой и минеральный обмен

Водно-солевой обмен – обмен воды и основных электролитов организма

(Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , HCO_3^- , H_3PO_4).

Электролиты – вещества, диссоциирующие в растворе на анионы и катионы. Их измеряют в моль/л.

Неэлектролиты – вещества, недиссоциирующие в растворе (глюкоза, креатинин, мочевина). Их измеряют в г/л.

Минеральный обмен – обмен любых минеральных компонентов, в том числе и тех, которые не влияют на основные параметры жидкой среды в организме.

Вода – основной компонент всех жидкостей организма.

Биологическая роль воды

1. Вода является универсальным растворителем для большинства органических (кроме липидов) и неорганических соединений.

2. Вода и растворенные в ней вещества создают внутреннюю среду организма.
3. Вода обеспечивает транспорт веществ и тепловой энергии по организму.
4. Значительная часть химических реакций организма протекает в водной фазе.
5. Вода участвует в реакциях гидролиза, гидратации, дегидратации.
6. Определяет пространственное строение и свойства гидрофобных и гидрофильных молекул.
7. В комплексе с ГАГ вода выполняет структурную функцию.

Общие свойства жидкостей организма

Все жидкости организма характеризуются общими свойствами: объемом, осмотическим давлением и величиной pH.

Объем. У всех наземных животных жидкости составляет около 70% от массы тела.

Распределение воды в организме зависит от возраста, пола, мышечной массы, телосложения и количества жира. Содержание воды в различных тканях распределяется следующим образом: легкие, сердце и почки (80%), скелетная мускулатура и мозг (75%), кожа и печень (70%), кости (20%), жировая ткань (10%). В целом, у худых людей меньше жира и больше воды. У мужчин на воду приходится 60%, у женщин - 50% от массы тела. У пожилых людей больше жира и меньше мышц. В среднем в организме мужчин и женщин старше 60 лет содержится соответственно 50% и 45% воды.

При полном лишении воды смерть наступает через 6-8 дней, когда количество воды в организме снижается на 12%.

Вся жидкость организма разделена на внутриклеточный (67%) и внеклеточный (33%) бассейны.

Внеклеточный бассейн (экстрацеллюлярное пространство) состоит из:

1. Внутрисосудистой жидкости;
2. Интерстициальной жидкости (межклеточная);
3. Трансцеллюлярной жидкости (жидкость плевральной, перикардальной, перитонеальной полостей и синовиального пространства, цереброспинальная и внутриглазная жидкость, секрет потовых, слюнных и

слезных желез, секрет поджелудочной железы, печени, желчного пузыря, ЖКТ и дыхательных путей).

Между бассейнами жидкости интенсивно обмениваются. Перемещение воды из одного сектора в другой происходит при изменении осмотического давления.

Осмотическое давление – это давление, которое создают все растворенные в воде вещества. Осмотическое давление внеклеточной жидкости определяется главным образом концентрацией NaCl.

Осмолярность и осмоляльность представляют собой общую концентрацию растворенных частиц в 1 л раствора (осмолярность) или в 1 кг воды (осмоляльность). Осмоляльность крови в значительной степени зависит от концентрации ионов натрия и хлора, в меньшей степени глюкозы и мочевины. В норме осмоляльность сыворотки крови 275— 296 мосмоль/кг H₂O

Внеклеточная и внутриклеточная жидкости значительно отличаются по составу и концентрации отдельных компонентов, но общая суммарная концентрация осмотически активных веществ примерно одинакова.

pH– отрицательный десятичный логарифм концентрации протонов. Величина pH зависит от интенсивности образования в организме кислот и оснований, их нейтрализации буферными системами и удалением из организма с мочой, выдыхаемым воздухом, потом и калом.

В зависимости от особенности обмена, величина pH может заметно отличаться как внутри клеток разных тканей, так и в разных отсеках одной клетки (в цитозоле кислотность нейтральная, в лизосомах и в межмембранном пространстве митохондрий - сильно кислая). В межклеточной жидкости разных органов и тканей и плазме крови величина pH, как и осмотическое давление, относительно постоянная величина.

Регуляция водно-солевого баланса организма

В организме водно-солевой баланс внутриклеточной среды поддерживается

постоянством внеклеточной жидкости. В свою очередь, водно-солевой баланс внеклеточной жидкости поддерживается через плазму крови с помощью органов и регулируется гормонами.

1. Органы, регулирующие водно-солевой обмен

Поступление воды и солей в организм происходит через ЖКТ, этот процесс контролируется чувством жажды и солевым аппетитом. Выведение излишков воды и солей из организма осуществляют почки. Кроме того, воду из организма выводят кожа, легкие и ЖКТ.

Баланс воды в организме

Поступление	Выведение
1,1-1,4л жидкая пища через ЖКТ	1,2-1,5л с мочой через почки
0,8-1л твердая пища через ЖКТ	0,5-0,6л испаряется через кожу
0,3л метаболическая вода	0,4л с выдыхаемым воздухом через легкие
	0,1-0,3л с калом через ЖКТ
Итого: 2,2-2,7л	Итого: 2,2-2,7л

Для ЖКТ, кожи и легких выведение воды является побочным процессом, который происходит в результате выполнения ими своих основных функций.

Например, ЖКТ теряет воду, при выделении из организма непереваренных веществ, продуктов метаболизма и ксенобиотиков. Легкие теряют воду при дыхании, а кожа при терморегуляции.

Изменения в работе почек, кожи, легких и ЖКТ может привести к нарушению водно-солевого гомеостаза. Например, в жарком климате, для поддержания температуры тела, кожа усиливает потовыделение, а при отравлениях, со стороны ЖКТ возникает рвота или диарея. В результате усиленной дегидратации и потери солей в организме возникает нарушение водно-солевого баланса.

2. Гормоны, регулирующие водно-солевой обмен

Антидиуретический гормон (АДГ), или вазопрессин— пептид с молекулярной массой около 1100 Д, содержащий 9 АК, соединённых одним дисульфидным мостиком.

АДГ синтезируется в нейронах гипоталамуса, переносится в нервные окончания задней доли гипофиза (нейрогипофиз).

Высокое осмотическое давление внеклеточной жидкости активирует осморецепторы гипоталамуса, в результате возникают нервные импульсы, которые передаются в заднюю долю гипофиза и вызывают высвобождение АДГ в кровотоки.

Механизм действия: усиливает реабсорбцию воды из первичной мочи, что приводит к задержке воды в организме и снижению диуреза.

В отсутствие АДГ моча не концентрируется (плотность $<1010\text{г/л}$) и может выделяться в очень больших количествах ($>20\text{л/сут}$), что приводит к дегидратации организма. Это состояние называется **несахарный диабет**.

Альдостерон — минералокортикоид, вырабатывается в корковом слое надпочечников. Усиливает реабсорбцию ионов натрия и хлора из первичной мочи, уменьшает ионов калия, усиливает секрецию вазопрессина, суживает кровеносные сосуды, повышает АД.

Ренин-ангиотензиновая система. При снижении АД в почках вырабатывается протеолитический фермент ренин, отщепляющий в крови от ангиотензиногена (синтезируемого в печени) — ангиотензин-1, который в легких превращается в более активную форму — ангиотензин-2. Клетки-мишени для ангиотензина-2: кровеносные сосуды, надпочечники.

Механизм действия: стимулирует секрецию альдостерона и вазопрессина, вызывает сужение артериол, что приводит к увеличению АД, полидипсии.

Лабораторные показатели КОС крови.

Показатели КОС — кислотно-основного состояния — отражают тесную взаимосвязь между кислотно-основным, кислородным и водно-электролитным обменами. Разбалансирование одного из них всегда влечет за собой резкие нарушения в двух других и в нормальном течении физиологических реакций гомеостаза вообще.

Гипоксия сопровождается нарушениями КОС и водно-электролитного баланса следующего характера: натрий — основной катион внеклеточной жидкости, поступает в чрезмерном количестве внутрь клеток и с каждым ммоль Na в клетку вводится 6 мл H₂O, что влечет за собой оттек клеток и, вместе с тем, искусственную гиповолемию. Это, в свою очередь, вызывает повышение осмоляльности плазмы и приводит к увеличению секреции антидиуретического гормона с понижением диуреза.

Снижение объема циркулирующей крови сопровождается повышенной секрецией альдостерона и задержкой Na и жидкости в организме. То есть, компенсаторные механизмы организма дестабилизированные гипоксией, не только не справляются, но и препятствуют выведению избытка жидкости из организма. В результате перераспределения воды в организме возникает ложная «гипоксическая гиповolemия» за счет отека клеток. Лечебные мероприятия клиницистов в таком случае направлены на ликвидацию гипоксии. Переливание больному жидкостей для восполнения объема циркулирующей крови на фоне выраженной гипоксии, может лишь утяжелить состояние больного за счет усиления клеточного и внутриорганного отека.

Лабораторные показатели кислотно-основного равновесия:

pH крови

Дает информацию о содержании ионов H⁺ в крови.

В норме: в артериальной крови pH = 7,36-7,42, в венозной крови pH = 7,26-7,36, в капиллярной крови pH = 7,35-7,44. Следует иметь в виду, что нормальное значение pH не всегда свидетельствует об отсутствии нарушений

КОС, так как в этом случае нельзя исключить компенсированный ацидоз или алкалоз.

pCO₂ цельной крови

Парциальное давление углекислого газа в крови.

В норме: в артериальной крови 35-45 мм рт. ст., в венозной крови — 46-58 мм рт. ст. Повышение либо понижение pCO₂ по сравнению с нормальным уровнем служит признаком респираторного нарушения КОС.

Общее содержание CO₂

Общее содержание CO₂ (TCO₂ — Total CO₂) плазмы крови. Соответствует суммарной концентрации бикарбонатов и угольной кислоты в плазме крови при физиологических условиях.

В норме составляет 52-73% либо 23-53 ммоль/л.

PO₂ — парциальное давление кислорода

Является показателем снабжения тканей кислородом. В норме составляет в венозной крови 38-40 мм рт. ст., в артериальной крови — 80-108 мм рт. ст. Снижение этого показателя свидетельствует о дефиците кислорода в тканях — гипоксии. Однако, описаны случаи, когда pO₂ оставалось в пределах нормы или было выше нормы при ряде патологических состояний организма (выраженный лактатацидоз).

Буферные основания цельной крови (BB — buffer bases)

Это сумма анионов всех слабых кислот, главными из которых являются бикарбонаты и анионы белков в крови, полностью насыщенной O₂. В норме составляют 42-52 ммоль/л. Этот показатель не изменяется при сдвигах pCO₂. Поэтому по величине BB можно судить о наличии нереспираторных нарушений КОС, связанных с изменением содержания нелетучих кислот в крови.

Нормальные буферные основания (NBV)

Нормальные буферные основания (NBВ) — сумма всех основных (анионных) буферов в крови больного, но приведенных к стандартным условиям (рН = 7,38; рСО₂ = 40 мм рт. ст.; 38 °С; НвО₂ = 100%).

Смещение буферных оснований

Смещение буферных оснований (BE — base excess) по отношению к стандартным условиям.

$$BE = BV - NBV.$$

Допустимый предел смещения $\pm 2,0$ ммоль/л. Показатель изменяется при нереспираторных нарушениях КОС. В случае ацидоза отмечается дефицит буферных оснований за счет связывания их нелетучими кислотами — отрицательный BE. При алкалозе буферные основания возрастают за счет снижения нелетучих кислот — положительный BE.

Актуальный бикарбонат крови

Актуальный бикарбонат крови (AB — Actual bicarbonate) отражает концентрацию бикарбонатов (НСО₃⁻) в плазме крови при физиологических условиях. В норме составляет 21-26 ммоль/л.

Стандартный бикарбонат

Стандартный бикарбонат (SB — Standart bicarbonate) — концентрация бикарбоната в плазме крови, приведенной к стандартным условиям. В норме составляет 20-26 ммоль/л. По разнице между стандартным и актуальным бикарбонатам также, как и по рСО₂ можно судить о наличии респираторных нарушений КОС по тому, что основная часть ионов НСО₃⁻ переносится в виде углекислоты. При этом, если SB = AB — нарушений нет; если SB > AB — респираторный алкалоз; если SB < AB — респираторный ацидоз.

Концентрация лактата (молочной кислоты) в крови

Используется как показатель наличия или отсутствия у больных гипоксии. Лактат — промежуточный продукт расщепления глюкозы. Его полное окисление происходит при достаточной насыщенности организма кислородом через преобразование в пируват и в дальнейшем, путем ресинтеза гликогена в печени или распада до СО₂ и Н₂О. В норме содержание лактата в артериальной крови не превышает 1 ммоль/л, а в венозной крови — не более 2 ммоль/л. При отсутствии у больного диабета, острого гепатита,

выраженной почечной недостаточности, увеличение лактата в крови — гиперлактатацидемия, трактуется как показатель дефицита кислорода в организме.

Содержание остаточных (резидуальных — R) анионов в крови

Данный показатель информативен для оценки нарушения КОС, вызванных накоплением недоокисленных продуктов обмена в организме. К остаточным анионам относят анионы нелетучих (органических и неорганических) кислот.

Нормальная концентрация R-анионов оставляет, в среднем 12 ммоль/л. Отмечена достоверная корреляционная связь между лактатом и R-анионами в крови. Поэтому, при невозможности в лаборатории определять молочную кислоту, R-анионы могут служить надежным критерием в оценке содержания лактата. Увеличение R-анионов соответствует увеличению содержания лактата в крови и в совокупности с другими показателями КОС позволяет подтвердить в качестве причины метаболических нарушений гипоксию.

Характеристика КОС.

КОС представляет собой соотношение концентраций водородных и гидроксильных ионов в биологических средах.

Ионы водорода создают кислую реакцию среды, а щелочную среду создают гидроксильные ионы и другие компоненты биологических жидкостей.

pH - это концентрация ионов водорода.

Необходимо отметить, что у здорового человека в норме основные компоненты преобладают над кислыми, реакция крови человека слабо щелочная и составляет $7,4 \pm 0,05$. Пределы изменения величины pH крови, совместимые с жизнью человека, составляют $7,4 \pm 0,4$ ед (7,0 - 7,8).

Даже незначительные колебания pH в ту или другую сторону могут иметь для организма тяжелые последствия.

Реакция среды некоторых биологических жидкостей организма:

- Кровь - 7,35 - 7,45
- Желудочный сок - 1,0 - 2,0.
- Желчь - 7,5 - 8,0.
- Панкреатический сок - 7,5 - 9,0.
- Кишечный сок - 7,8 - 8,0.

Количество веществ в организме, обладающих кислыми и основными свойствами зависит от количества и вида принимаемой пищи, от интенсивности обменных процессов, динамики выведения этих веществ из организма, величины легочной вентиляции, уровня оксигенации тканей и от состояния гемодинамики.

Для здорового человека характерно относительное постоянство показателей КОС, обусловленное совместным действием буферных систем и систем физиологического контроля, и определяющее характер метаболических реакций в клетках организма.

Регуляция рН в организме человека:

- химический механизм регуляции рН - буферные системы крови и тканей: бикарбонатная, фосфатная, белковая, гемоглобиновая.
- физиологической регуляции КОС - выделительная функция почек, дыхательная функция легких, печень, костная система, пищеварительная система.

Все системы (химические и физиологические) действуют взаимосвязано.

Буфер может быть представлен слабой кислотой или основанием, удерживающим или смягчающим резкие изменения рН. Буферное действие трактуется связыванием свободных H^+ и OH^- ионов компонентами буфера и переводом их в недиссоциированную форму - слабую кислоту или воду.

рН буфера зависит от соотношения слабых кислот и их солей с сильным основанием. Количественной характеристикой буферного действия служит буферная емкость, которая зависит от абсолютных концентраций компонентов буфера.

Бикарбонатный буфер состоит из угольной кислоты (H_2CO_3) и её производных: CO_2 , бикарбоната HCO_3^- , карбонат иона CO_3^{2-} . Они оказывают свое действие в крови и в тканях. рН бикарбонатного буфера равен 7,4 и зависит от соотношения концентрации бикарбоната натрия ($NaHCO_3$) и угольной кислоты.

Механизм действия буфера.

1. При поступлении в кровь кислых продуктов из тканей H^+ связывает HCO_3^- из соли и образуется слабая угольная кислота. рН остается 7,4.
2. При поступлении в кровь оснований из тканей гидроксил-ион (OH^-) связывают ионы водорода, образующиеся при диссоциации угольной кислоты. рН остается 7,4.

Если изменяется соотношение бикарбоната натрия и угольной кислоты в организме, изменяется и рН крови.

Фосфатный буфер представлен дигидрофосфатом натрия NaH_2PO_4 и гидрофосфатом натрия Na_2HPO_4 . Наиболее активно свое действие проявляет в клетках почек.

Механизм действия буфера.

1. При поступлении в кровь кислых продуктов H^+ связываются HPO_4^{2-} из Na_2HPO_4 . Избыток удаляется почками.

2. При поступлении в кровь оснований избыток OH^- нейтрализуется H^+ из NaH_2PO_4 , образуется вода.

Действие фосфатного буфера контролируется выделительной функцией почек. При ее нарушении происходит задержка кислых фосфатов в организме.

Белковый буфер - так как белки, являются амфотерными электролитами, они ведут себя при смещении реакции в кислую или щелочную сторону, как буферные системы: при закислении среды они становятся основанием, при защелачивании кислотой. В плазме крови буферное действие выполняют альбумины и глобулины.

Гемоглобиновый буфер включает в себя восстановленный гемоглобин (Hb-H^+) или калиевую соль связанного с кислородом гемоглобина ($\text{K}^+\text{Hb-O}_2$).

В легких кислород, входя в молекулу гемоглобина ($\text{K}^+\text{Hb-O}_2$) повышает его способность к диссоциации. В капиллярах O_2 переходит в ткани, а образовавшийся в тканях из CO_2 и H_2O ион водорода связывается с Hb^+ . HCO_3^- удаляется с выдыхаемым воздухом.

Физиологическая регуляция КОС

Легкие. Главная функция легких в поддержании постоянства КОС в организме заключается в сохранении оптимальной концентрации угольной кислоты в крови. Увеличение уровня CO_2 в крови (гиперкапния) влечет за собой раздражение дыхательного центра и учащение дыхания. В результате избыток CO_2 удаляется легкими и рН нормализуется. Понижение уровня CO_2 в крови (гипокапния) приводит к угнетению дыхательного центра, снижению частоты дыхания. В результате CO_2 накапливается в организме и рН нормализуется.

Почки. Основная функция почек по поддержанию КОС связана с деятельностью проксимального отдела нефрона. Почки активно вырабатывают ионы водорода и реабсорбируют гидрокарбонат натрия. Оба процесса способствуют выведению из крови избыточного количества ионов

водорода и поддержанию в крови нормальной концентрации гидрокарбонатов.

Печень. В клетках печени происходит образование белков (альбуминов и глобулинов) - белковый буфер крови, осуществляется окисление органических кислот до H_2O и CO_2 , синтезируется гликоген, для которого используется молочная кислота, а также вместе с желчью удаляется часть кислых и щелочных продуктов.

ЖКТ поддерживает КОС, тем, что сохраняет постоянство водно-электролитного баланса, синтезирует соляную кислоту в желудке, секретирует бикарбонаты в поджелудочной железе.

Костная ткань содержит ионы электролитов (кальций, фосфор, натрий, калий), которые при хроническом закислении организма могут обмениваться на ионы водорода.

2. ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Методы исследования кислотно основного баланса.

pH, Парциальное давление двуокиси углерода (PCO_2).

Метод исследования. Потенциометрия.

Требования к пробе. Цельная кровь, артериальная. Собирать без доступа воздуха в шприц, обработанный гепарином. Поместить на лед и немедленно отправить в лабораторию. Не допускать ошибок при разведении и измерении pH, избегать ошибочного добавления жидкого гепарина. В качестве адекватного заменителя артериальной крови можно использовать свободно текущую капиллярную кровь, собранную в обработанный гепарином капилляр.

Бикарбонаты (HCO_3)

Метод исследования. Вычисление. (AB, SB, BB)

Требование к пробе. Артериальная или венозная кровь. Брать пробу в анаэробных условиях. В качестве антикоагулянта предпочтительнее гепарин.

Избыток оснований (BE)

Метод исследования. Номограмма.

Требования к пробе. Цельная кровь, артериальная. Собирать без доступа воздуха в шприц, обработанный гепарином.

Парциальное давление кислорода (pO_г)

Метод исследования. Электрохимический.

Требования к пробе. Артериальную кровь берут в анаэробных условиях в герметичный шприц, обработанный раствором гепарина. Пробу помещают на лед и немедленно отправляют в лабораторию. Не использовать пластиковые шприцы; может иметь место потеря кислорода. Для того, чтобы избежать ошибок: разбавление пробы и изменение рН, не использовать избыток жидкого гепарина.

Клинические формы нарушений КОС

Снижение рН крови называется ацидозом, а повышение рН алкалозом. Ацидозы и алкалозы бывают респираторные и метаболические.

Соотношение рН, бикарбонатов и рСО₂ при различных формах ацидоза и алкалоза представлены в таблице 1.

Таблица 1. Соотношение рН, бикарбонатов и рСО₂

Нарушение	рН	НСО₃'	рСО_а
Метаболический ацидоз ↓	↓	↓(1)	↓(2)
Респираторный ацидоз ↓	↓	↑(2)	↑(1)
Метаболический алкалоз ↑	↑	↑(1)	↑(2)
Респираторный алкалоз ↑	↑	↓(2)	↓(1)

Примечание: 1 - первичные нарушения; 2 - вторичные нарушения

1. Метаболический ацидоз

Основными причинами метаболического ацидоза являются:

1. Увеличение образования ионов водорода.
2. Введение кислот.
 1. Снижение экскреции ионов водорода.
 2. Потеря бикарбонатов при профузной диарее и кишечной фистуле.

Метаболический ацидоз наблюдается при тяжелых формах нарушения кровообращения, кровопотерях, прогрессирующей сердечно-сосудистой недостаточности, инфекционных заболеваниях, перитонитах, абсцессах, гипотермии, введении донорской крови с высоким содержанием СО₂, заболеваниях печени, кишечника, а также при ОПН, ХПН.

При *компенсаторном механизме* происходит увеличение интенсивности дыхания, а при нормальной функции почек - экскреция ионов водорода с мочой.

Лабораторные критерии метаболического ацидоза: рН снижается до 7,0-7,35, ВЕ повышается до -25 ммоль/л, а рСО₂ повышается в стадию декомпенсации, а в стадию компенсации уменьшается.

1. Респираторный ацидоз

Причинами развития является гиповентиляция и гиперкапния.

Респираторный ацидоз возникает вследствие:

1. Обструкции дыхательных путей.
2. Заболевания легких.
3. Внелегочные причины

Респираторный ацидоз также возникает при недостаточности кровообращения, асфиксии, в хирургии при неадекватно управляемом дыхании, высоком содержании СО₂ во вдыхаемом воздухе.

Компенсаторный механизм - соответствующие изменения метаболизма, чаще почки.

Лабораторные критерии респираторного ацидоза: рН снижается до 7,0-7,35, ВЕ понижаются до -5/-8 ммоль/л, рСО₂ повышается.

1. Метаболический алкалоз

Причины, приводящие к развитию метаболического алкалоза:

1. Потеря ионов водорода:
2. Введение щелочей:

Также при тяжелых кровотечениях, ожогах, хронических нефритах, в послеоперационном периоде при гипокалиемии развивается метаболический алкалоз.

Компенсаторный механизм - дыхательная система - дыхательный ацидоз, почки - в почках угнетается аммиогенез, с мочой выводятся натрий, калий, хлориды.

Лабораторные критерии метаболического алкалоза: рН повышается (7,0-7,35), ВЕ повышаются до 25 ммоль/л, рСО₂ компенсаторно увеличивается.

1. Респираторный алкалоз

Причины:

1. Гипервентиляция
2. Уменьшение парциального давления углекислого газа в крови.

Респираторный алкалоз наблюдается при искусственной вентиляции легких, вдыхании чистого кислорода, при одышке, лихорадке, подъеме на высоту, энцефалите, менингите, инсульте, опухолях мозга, при отравлении салицилатами, при резкой отмене алкоголя на фоне хронического алкоголизма, при невротических состояниях, состояниях возбуждения, которые развиваются при общих стрессовых реакциях организма, при интенсивном болевом синдроме, внезапном охлаждении организма, при сепсисе вызванном грамм-отрицательными бактериями, а также при перитоните, панкреатите, заболеваниях печени, абдоминальных опухолях.

Компенсаторный механизм - реакция буферных систем крови, почки, метаболические изменения.

Лабораторные критерии респираторного алкалоза: рН повышается (7,0-7,35), ВЕ повышаются (5 ммоль/л), рСО₂ снижается.

Определение содержания электролитов (калия, натрия).

Общая характеристика

Среди макроэлементов особого внимания заслуживает исследование содержания натрия и калия в плазме и в эритроцитах крови.

Калий является основным внутриклеточным катионом. Концентрация калия у практически здоровых взрослых людей составляет: в цельной крови 38,4-64,0 ммоль/л; в плазме (сыворотке) 3,6-6,2 ммоль/л; в эритроцитах 79,4-112,6 ммоль/л. Поскольку содержание калия в эритроцитах намного выше, чем в плазме, она, как и сыворотка, не должна иметь следов гемолиза. Сыворотку рекомендуется отделять не позже чем через 2 ч после взятия крови.

Калий плазмы крови отражает общее содержание калия в организме при условии, если отсутствуют нарушения кислотно-основного состояния. Измерение рН на 0,1 единицы вызывает обратный по направленности сдвиг концентрации ионов калия в плазме (сыворотке) крови на 0,5 ммоль/л.

Натрий - основной внеклеточный катион, входит в состав всех тканей и жидкостей организма, поддерживает осмотическое давление и определяет движение воды. Общее содержание его составляет около 105 г, из них половина находится во внеклеточной жидкости, 6%- в клетках, 44% - в костях.

Потребность натрия в сутки для взрослых колеблется от 4 до 5 г (174-217 ммоль), для детей — 1 ммоль на 1 кг массы тела. В организм натрий поступает с пищей, главным образом в виде соли хлорида натрия. В желудке он почти не всасывается, а наибольшая реабсорбция его происходит в кишечнике. Выведение натрия осуществляется в основном почками. Взрослый человек теряет с мочой 3-6 г (130-261 ммоль). Часть натрия экскретируется кишечником и выделяется потовой жидкостью. Баланс натрия в организме регулируется главным образом гормоном коры надпочечников альдостероном. Содержание натрия в плазме крови взрослого человека колеблется в пределах 137-150 ммоль/л; в цельной крови 70-90 ммоль/л; в эритроцитах 9-28 ммоль/л.

Исследование калия, натрия желательно проводить на анализаторах электролитов, в которых используют ионселективные электроды.

Метод исследования: прямое потенциометрическое измерение.

Самостоятельно:

Задача 1.

У пациента были получены следующие результаты исследования кислотно-основного состояния крови:

- щелочные резервы (BE) = +4 ммоль/л
- парциальное давление CO₂ (pCO₂) = 36 мм рт. ст.
- pH = 7,57

Оцените результаты, сделайте заключение о состоянии КОС у пациента.

Задача 2.

Пациент находится в стационаре на обследовании. Из КДЛ получены следующие результаты исследования крови:

- щелочные резервы (BE) = -2,9 ммоль/л
- парциальное давление CO₂ (pCO₂) = 42 мм рт. ст.

pH = 7,2

Оцените полученные результаты, сделайте заключение о состоянии КОС у пациента.

Практическое занятие №20-21: Роль макро- и микроэлементов в процессах жизнедеятельности организма. Регуляция минерального обмена. Методы определения макро- и микроэлементов

Формируемые профессиональные компетенции 2.1, 2.2, 2.3.

Учебные цели (знать, уметь, иметь практический опыт):

Знать	Уметь	Владеть навыками
1-12,17,18	1-14,17,18	1-9

Воспитательная цель Привитие умений и навыков учебной работы и коллективного труда. Формирование целостного миропонимания и современного научного мировоззрения, основанного на признании приоритетов общечеловеческих ценностей: гуманности, милосердия, сострадания, уважения к жизни и здоровью человека.

Развивающая цель Формирование навыков самообразования, самореализации личности и развитие речи, мышления, памяти .

Межпредметные связи ОПД. 03 Химия, ОПД. 16 Физико-химические методы исследования и техника лабораторных работ, ОПД . 02 Анатомия.

Вопросы для подготовки к занятию

1. Основные правила техники безопасности при работе в лаборатории.
2. Минеральный обмен.
3. Макро- и микроэлементы, роль в организме.
4. Регуляция минерального обмена.

5. Клинико-диагностическое значение определения показателей минерального обмена.

Список понятий для усвоения темы

Минеральный обмен, калицитонин, паратгормон, обмен, макроэлементы, микроэлементы

1. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Минеральный обмен.

Минеральный обмен - совокупность процессов всасывания, распределения, усвоения и выделения минеральных веществ, находящихся в организме преимущественно в виде неорганических соединений.

Всем без исключения организмам абсолютно необходимы **С, Н, N, О, Р и S**. Более **96 %** органической массы приходится на долю четырех элементов - **водорода, кислорода, углерода и азота** и почти **4 %** - на долю семи так называемых макроэлементов: **кальция, фосфора, натрия, серы, калия, хлора и магния**. Среди важнейших микроэлементов выделяют **железо, кобальт, медь, цинк, хром, молибден, марганец, фтор, йод и селен**.

Минеральные вещества поступают в организм с пищевыми продуктами и водой. Дополнительно человек употребляет только поваренную соль. Большинство солей легко всасываются в кишечнике и поступают в кровь, тканевые жидкости и ткани. Некоторые ионы задерживаются определенными тканями, являющимися их депо. Например, **NaCl** - в коже, **Fe, Cu, Co, Mn** - в печени, **I** - в щитовидной железе, **K** в мышцах, **Ca, P, Mg, F** - в костной ткани.

В крови минеральные вещества находятся либо в связанном с белками состоянии - транспортная неактивная форма, либо в ионизированном состоянии - активная форма, а также в виде солей, например, в костной ткани.

Минеральные вещества имеют большое значение для функционирования организма. Они используются как пластический материал в образовании костной ткани, построении клеточных мембран, влияют на проницаемость клеточных мембран и сосудов, определяют многие химические и физические

свойства биологических жидкостей (осмотическое давление, буферные свойства и др.), участвуют в нервно-мышечном возбуждении, входят в состав биологически активных веществ.

Суточная потребность в минеральных веществах незначительна и близка к потребности в витаминах. В организме человека около 65 минеральных элементов.

Макроэлементы (кислород, углерод, водород, азот, кальций, фосфор, натрий, калий, магний, сера, магний, железо) содержатся в сравнительно больших количествах в организме (в концентрации от 0.001% до 70%).

Натрий – основной катион внеклеточного отдела, играет главную роль в поддержании осмотического давления и сохранения кислотно-щелочного состояния, которое определяется тем, что натрий входит в состав буферных систем, в частности обеспечивает щелочной резерв крови – концентрацию бикарбоната плазмы. Натрий участвует в возникновении и поддержании электрохимического потенциала, влияет на процессы нервной деятельности, на состояние мышечной и сердечно-сосудистой системы, на способность внутритканевых коллоидов к набуханию, активизирует ряд ферментов (амилазу, транспортную АТФазу).

У здорового человека содержание натрия в плазме колеблется от 135 до 150 ммоль/л. Главная роль в поддержании гомеостаза натрия в плазме крови принадлежит почкам. Гормон, задерживающий натрий в организме – альдостерон. Он усиливает реабсорбцию натрия в почечных канальцах.

Гипонатриемия наступает вследствие недостаточного поступления натрия в организм (бессолевая диета), при обильном пототделении, тяжелых длительных рвотах, острой и хронической надпочечниковой недостаточности (снижении секреции альдостерона), избыточном выведении натрия почками, избыточном поступлении воды в организм или задержке ее в организме (сердечная недостаточность). Гипернатриемия может возникнуть при олигоурии или анурии любого происхождения, гиперпродукции коры надпочечников (синдром Кушинга, первичный альдостеронизм), вследствие приема большого количества лекарственных средств (кортикостероидов, АКТГ), при парентеральном введении гипертонического раствора натрия или в результате ограничения приема жидкости.

Калий – основной катион внутриклеточной жидкости. Содержание калия в сыворотке крови – 4-5,5 ммоль/л. Физиологическая роль калия в организме обусловлена участием K^+ в создании электро-химического потенциала на клеточной мембране. Встроенная в плазматическую мембрану клетки Na^+ , K^+ -

АТФаза (Na^+ , K^+ -насос) осуществляет сопряженный с гидролизом АТФ активный выброс Na^+ из клетки и закачивание K^+ в клетку: транспорт калия и натрия через клеточную мембрану лежит в основе возникновения процесса возбуждения мышечной и нервной ткани.

Ионы K^+ обладают выраженной биологической активностью и участвуют в регуляции функций сердца, нервной системы, скелетной и гладкой мускулатуры, участвует в биосинтезе гликогена, поддержании осмотического давления и кислотно-щелочного состояния (буферные системы).

Гипокалиемия возникает при недостаточном приеме калия с пищей; усиленном выделении калия с мочой (гиперфункция коры надпочечников и передней доли гипофиза); усиленной секреции АДГ; алкалозе; гиперсекреции (введении) АКГТГ, альдостерона.

Гиперкалиемия наблюдается при повышенном распаде клеток и тканей; нарушении выделения калия с мочой; обезвоживании; анафилактическом шоке.

Кальций – внеклеточный катион. Содержание кальция в плазме (сыворотке) крови человека, весьма тонко регулируемая биологическая константа, колеблется в пределах 2,25-2,5 ммоль/л. Физиологическая роль кальция сводится к тому, что он:

- основа минерального компонента костей и зубов;
- необходим для свертывания крови (фактор IV);
- играет роль в стабилизации клеточных мембран;
- участвует в механизмах синаптической передачи;
- участвует в нервно-мышечной проводимости и мышечном сокращении;
- является вторичным посредником в действии гормонов;
- регулирует активность многих ферментов (АТФазы, сукцинатдегидрогеназы, щелочной фосфатазы, α -амилазы, липазы, фосфолипазы, нуклеазы);
- ограниченно участвует в поддержании осмотического давления;
- активатор мембранных фосфолипаз и перекисного окисления липидов клеточных мембран, которые вызывают деструкцию мембран и гибель клеток.

Большая часть кальция (около 99 %) находится в костной ткани и зубах. Общий кальций крови включает три фракции: белок-связанный, ультрафильтрующийся (ионизированный) и неионизированный (в составе пирофосфата, сульфата и фосфата). В регуляции кальциевого обмена участвуют:

1. Паратгормон – активирует мобилизацию кальция из костной ткани, усиливает канальцевую реабсорбцию кальция и тормозит реабсорбцию фосфата.
2. Кальцитонин – обеспечивает депонирование кальция в костной ткани.
3. Активная форма витамина D₃– 1,25-дегидроксиголекальцеферол - в слизистой кишечника способствует превращению белка предшественника в кальций-связывающий белок, который участвует во всасывании кальция из кишечника.

Гипокальциемия наблюдается при гипофункции паращитовидных желез; нарушении всасывания или повышенном выведении кальция при нарушениях переваривания и всасывания; дефиците витамина D или резистентности к нему при рахите; нарушении образования кальцитонина. Гиперкальциемия возникает при приобретенной повышенной чувствительности к витамину D; гиперпаратиреозе; повышенном всасывании кальция; снижении выделения кальция с мочой.

Магний. Содержание магния в сыворотке крови составляет от 0,74 до 1,23 ммоль/л. Во внеклеточном сегменте содержится в меньших количествах по сравнению с внутриклеточной жидкостью (примерно в 10 раз). Депонируется магний, главным образом, в коже и мышцах, а выводится через желудочно-кишечный тракт от 40 до 80 %. Магний имеет большое значение для нормальной жизнедеятельности, т.к. входит в состав многих ферментных систем (биосинтеза белка, ассоциации рибосом), активирует ацил-КоА-синтетазу, фосфорилазу, обеспечивает гликолиз, циклы Кребса и мочевинообразования, принимает участие в нервно-мышечной возбудимости; в виде фосфата и бикарбоната входит в состав костной ткани; является антагонистом кальция.

Повышение концентрации магния в крови происходит при ануриях, хронической почечной недостаточности, гипотиреозе. Снижение концентрации магния в крови наблюдается при раковых опухолях, хронической сердечной недостаточности, острой и хронической почечной недостаточности, гипертиреозе.

Фосфор. Содержание фосфатов в плазме крови 0,8-2 ммоль/л, в клетках крови примерно в 30-40 раз выше, чем в плазме.

Фосфат крови и костной ткани находится в состоянии динамического равновесия – при снижении содержания фосфатов в плазме они переходят в кровь из костей и наоборот.

Биологическая роль:

- входит в состав нуклеотидов, нуклеиновых кислот, фосфолипидов, фосфопротеидов, витаминов, коферментов и т.д.;
- фосфорилирование и дефосфорилирование биомолекул является одним из механизмов активации и инактивирования;
- присоединения фосфата к АДФ – основа процесса окислительного фосфорилирования;
- анионы HPO_4^{2-} и H_2PO_4^- представляют фосфатную буферную систему, которая участвует в регуляции кислотно-щелочного равновесия;
- анионы фосфата – главные минеральные компоненты скелета.

Гиперфосфатемия наблюдается при гиперпаратиреозе; гипервитаминозе D; поражении почек. Гипофосфатемия сопровождается диабетический кетоацидоз; гиповитаминоз D; нарушения реabsорбции фосфатов и др.

Хлор. Содержание хлора в сыворотке крови – 45-110 ммоль/л. В организме он находится в ионизированном состоянии в виде солей натрия, калия, кальция, магния и др. Играет важную роль в поддержании кислотно-щелочного равновесия (между плазмой и эритроцитами), осмотического давления (между кровью и тканями) и баланса воды в организме, активирует ферменты (амилазу). Соляная кислота входит в состав желудочного сока, участвует в переваривании белковой пищи. Хлор – важнейший анион внеклеточного пространства. В регуляции обмена хлора принимает участие щитовидная железа: при недостаточной функции ее происходит задержка хлора и натрия и развивается микседема.

Сера в организме находится, преимущественно, в составе сложных органических соединений. Сера теснейшим образом связана с белковым, углеводным и липидным обменом. В составе аминокислот метионина, цистеина и цистина сера входит в состав различных белков, стабилизируя их структуру дисульфидными связями. Кроме того, сера является одним из липотропных факторов, принимает участие в биосинтезе фосфолипидов, предотвращая жировую инфильтрацию печени. С углеводами сера связана в форме гликозаминогликанов (основа соединительной ткани), является составной частью липидов нервной ткани - сфинголипидов. Сера входит в состав гормонов (инсулина), витаминов (биотина, тиамина, липоевой кислоты), коэнзима А, глутатиона, ФАФС.

Микроэлементы - железо, медь, марганец, цинк, фтор, молибден, иод и др. содержатся в организме в низких концентрациях (10^{-3} - 10^{-5} % весовых процентов, не превышают 1 мкг на грамм веса живой ткани), Биологическая роль микроэлементов определяется участием практически во всех видах обмена веществ: они являются кофакторами многих ферментов, компонентами витаминов, гормонов, участвуют в процессах кроветворения, роста, размножения и дифференцировки, стабилизации клеточных мембран, тканевом дыхании, иммунных реакциях и многих других процессах, обеспечивающих нормальную жизнедеятельность.

Железо содержится в организме 3,5 – 4,2 г, в сыворотке крови – 11,64-31,34 мкмоль/л. Суточная потребность в железе – 15 мг. Снижение содержания железа в пище до 5-6 мг приводит к малокровию, т.к. снижается синтез гемоглобина; избыток железа в организме вызывает гемохроматоз. Во всасывании железа участвует апоферритин, белок крови трансферрин регулирует количество железа в сыворотке крови. Депонируется железо в форме ферритина (резервная форма). Железо выделяется в основном через кишечник и в незначительном количестве с мочой.

Функции железосодержащих биомолекул:

1. Транспорт электронов - цитохромы a,b,c; железопротеиды – сукцинат-дегидрогеназа (СДГ), дегидрогеназа электронпереносящего белка, НАДН-дегидрогеназа и др.
2. Транспорт и депонирование кислорода (миоглобин, гемоглобин).
3. Участие в формировании активных центров окислительно-восстановительных ферментов: пероксидазы, каталазы, лактороксидазы (в слюнных, слезных, гарднеровых железах – концентрирует йод, окисление иодидов), тиреопероксидаза (биосинтез йодтиронинов).
4. Транспорт и депонирование железа (трансферрин, ферритин, лактоферрин, гемосидерин, гастротферрин).

Медь участвует в биохимических процессах как составная часть электронпереносящих белков, осуществляющих реакции окисления органических субстратов молекулярным кислородом. Находясь в составе церулоплазмينا (белок, обладающий ферментативной активностью, транспортирует медь по крови), медь участвует в переводе железа из двухвалентного в трехвалентное состояние, ускоряя образование трансферрина, и таким образом, участвует в кроветворении. Ферменты, содержащие медь:

- аминоксидаза и др. (окисление первичных аминов);
- супероксиддисмутаза (СОД); тирозиназа;

- цитохром-с-оксидаза;

- церулоплазмин – обладает активностью ферроксидазы, аминноксидазы, СОД, участвует в гомеостазе меди, играет роль реактанта острой фазы в воспалительных процессах, защищает липидные мембраны от перекисного окисления.

Цинк играет важную роль в обмене белков, кроветворении и окислительно-восстановительных процессах. Цинку принадлежит важная роль в синтезе белка и нуклеиновых кислот. Он присутствует во всех 20 изученных в настоящее время нуклеотидилтрансферазах, необходим для стабилизации структуры ДНК, РНК и рибосом, играет важную роль в процессе трансляции, развитии скелета и процесса кальцификации, стабилизирует клеточные мембраны. Он входит в состав инсулина, усиливает активность половых гормонов. Ферменты, содержащие цинк: алкогольдегидрогеназа; супероксиддисмутаза (СОД); карбоксипептидаза А, В; щелочная фосфатаза; карбоангидраза.

Марганец активизирует биологическое окисление, в ряде биологических реакциях действует как окислитель и активизирует ряд ферментов, принимающих участие в углеводном обмене. Ферменты, содержащие марганец: аргиназа; пируваткарбиксилаза. Ферменты, активируемые марганцем: мевалонаткиназа; РНК-полимераза; ДНК-полимераза; галактозилтрансфераза; щелочная фосфатаза; кислая фосфатаза; фосфоенолпируват-карбоксикиназа; глутаминсинтетаза. Марганец необходим для нормальной секреции инсулина.

Хром усиливает действие инсулина во всех метаболических процессах, регулируемых этим гормоном. Прочно связывается с нуклеиновыми кислотами и защищает их от денатурации. Способен замещать йод в тиреоидных гормонах.

2. ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Методы исследования макро- и микроэлементов.

Методы определения уровня кальция в сыворотке (плазме) крови.

Общая характеристика.

Кальцию принадлежит весьма важная роль в осуществлении процессов жизнедеятельности. Он влияет на проницаемость биологических мембран,

возбудимость нервов и мышц; участвует в нервно-мышечной проводимости, сокращении и расслаблении мускулатуры (в том числе мышцы сердца), формировании кости и хряща; воздействует на обмен веществ в клетках, секрецию гормонов, биологически активных веществ, секреторную деятельность желудка; является важным фактором свертывания крови.

Уровень кальция в плазме крови зависит от:

1. количества кальция, поступающего в организм
2. величины его экскреции
3. состояния процессов обмена кальция между кровью и костной тканью.

В норме концентрация так называемого общего кальция в плазме колеблется в довольно узких пределах: 2,25-2,75 ммоль/л. Большая часть (44-46%) общего кальция связана с белками сыворотки крови, преимущественно альбумином.

Химические методы исследования ионизированного и общего кальция в сыворотке (плазме) крови можно разделить на две большие группы: прямые и непрямые, состоящие в предварительном осаждении кальция в виде трудно растворимых в воде соединений.

Кальций стабилен в сыворотке крови в течение 24 ч при комнатной температуре (18-25°C), одну неделю при 2-8°C, 5 мес. В замороженном состоянии (пробы нельзя многократно размораживать). Точное определение содержания кальция в моче может проводиться только после полного растворения осадка солей мочи перед исследованием, для чего к суточному объему мочи добавляют 15 мл концентрированной соляной кислоты либо прогревают мочу при 56°C в течение 15 мин, что способствует растворению осадка.

Определение общего кальция в сыворотке крови по цветной реакции с ортокрезолфталейнкомплексом.

Принцип метода. Крезолфталейнкомплексон образует с кальцием в щелочной среде комплекс красно-фиолетового цвета, интенсивность окраски пропорциональна концентрации кальция. В реакционную смесь добавляют 8-оксихинолин, который связывает металлы, мешающие определению, но образует с кальцием менее прочный комплекс, чем крезолфталейнкомплексон.

Необходимые реактивы

1. Боратный буфер

2. Глицин
3. 8-оксихинолин (оксин)
4. Рабочий буферный раствор
5. Крезилфталейнкомплексон.

Ход исследования. К 3 мл рабочего раствора крезолфталейнкомплексона добавляют 0,05 мл исследуемой сыворотки, перемешивают.

Через 5 мин фотометрируют в кювете с длиной оптического пути 0,5 см при длине волны 500—560 нм (зеленый светофильтр) против рабочего раствора крезолфталейнкомплексона. Одновременно обязательно ставят хотя бы одну калибровочную пробу. Расчет ведут по калибровочной кривой, либо по правилу пропорций.

Некоторые сорта стекла могут выщелачиваться, отдавая в раствор соли кальция, поэтому лабораторную посуду, особенно пробирки, желательно предварительно прокипятить в соляной кислоте.

Определение желательно проводить в сыворотке или в плазме, полученной из гепаринизированной крови, так как щавелевая, лимонная кислота и другие антикоагулянты, связывающие кальций, могут помешать определению.

Клинико-диагностическое значение определения уровня неорганического фосфора в сыворотке крови и моче.

Концентрация неорганического фосфора в сыворотке крови во многом зависит от функции паращитовидных, щитовидных желез, регулирующего влияния витамина D и функции почек. В норме содержание неорганического фосфора в сыворотке крови у взрослых составляет 0,87-1,45 ммоль/; в суточной моче -12,9-42,0 ммоль/сут.

Гиперфосфатемия встречается при почечной недостаточности, гипопаратиреодизме, акромегалии, СД, кетозе, приеме больших доз витамина D, ультрафиолетовом облучении, в некоторых случаях при болезни Аддисона, спазмофилии, болезни Иценко-Кушинга. Гиперфосфатемия при гломерулонефритах и нефротическом симптомокомплексе (3,23-6,46 ммоль/л) является одним из неблагоприятных прогностических признаков; эти заболевания часто сопровождаются понижением резервной щелочности крови. Увеличение содержания фосфатов в крови наблюдается при токсикозах беременных.

Гипофосфатемия в детском возрасте наблюдается при рахите. Важно отметить, что снижение уровня неорганического фосфора в сыворотке крови отмечается в ранней стадии рахита (0,19-0,97 ммоль/л), когда клинические симптомы еще недостаточно выражены. Гипофосфатемия при рахите может перейти в гиперфосфатемию, что нередко сопровождается явлениями спазмофилии. Снижение содержания неорганических фосфатов в крови наблюдается при остеомаляции, пеллагре, длительном лечении инсулином и хлористым кальцием. Для диагностики различных патологических состояний важное значение имеет установление количественного соотношения между содержанием кальция и неорганического фосфора в крови. При рахите количество экскретируемого с мочой фосфата увеличивается в 2-10 раз по сравнению с нормой. Повышение выделения неорганических фосфатов с мочой отмечается при распаде клеток у больных лейкозами, гипертиреозом, диабетом, менингитом и некоторыми другими заболеваниями; снижение - при туберкулезе, лихорадочных состояниях, острой желтой атрофии печени, недостаточной функции почек, акромегалии.

Определение фосфора в сыворотке крови.

Реактивы.

1. 10% раствор трихлоруксусной кислоты.
2. Раствор молибдата аммония: 5г молибденово-кислого аммония доводят до 100мл 5% серной кислотой.
3. 5% серная кислота: 140мл концентрированной серной кислоты смешать с 860мл дистиллированной воды.
4. 1% раствор аскорбиновой кислоты на 0,1н растворе соляной кислоты.
5. Стандартные растворы фосфора:
 - а) основной – 4,394г KH_2PO_4 , высушенного до постоянного веса и доведенного дистиллированной водой до 1л. В 1мл такого раствора содержится 1мг фосфора;
 - б) рабочий – 1мл основного стандартного раствора доводят дистиллированной водой до 50мл. В 1мл такого раствора содержится 0,02мг фосфора.

Оборудование: фотоэлектроколориметр, центрифуга, центрифужные пробирки, обыкновенные пробирки, пипетки на 5мл, пипетки на 1мл.

Принцип определения.

Белки крови осаждают трихлоруксусной кислотой. Неорганический фосфор после осаждения белков реагирует с молибденовой кислотой с образованием фосфомолибденовой кислоты, которая восстанавливается аскорбиновой кислотой до фосфомолибденового комплекса, окрашенного в синий цвет. Интенсивность окраски пропорциональна количеству неорганического фосфора.

Ход определения.

В центрифужную пробирку последовательно вносят 3 мл дистиллированной воды, 1мл сыворотки крови, 1мл 10% раствора трихлоруксусной кислоты. Содержимое пробирки перемешивают стеклянной палочкой и через 5 минут центрифугируют при 2500-3000 об/сек в течение 15-20 мин.

В опытную пробирку (О) вносят 2,5мл центрифугата крови (что соответствует 0,5мл сыворотки крови), добавляют 0,5мл раствора молибдата аммония, 0,5мл 1% раствора аскорбиновой кислоты и 6,5мл дистиллированной воды. Перемешивают путем переливания из одной пробирки в другую.

Одновременно готовят стандартную пробу. В пробирку для стандартного раствора (С) вносят 1мл рабочего стандартного раствора фосфора: 0,5мл 10% раствора трихлоруксусной кислоты, 0,5мл молибдата аммония, 0,5мл 1% раствора аскорбиновой кислоты и 7,5 мл дистиллированной воды.

Через 10 минут опытную и стандартную пробы колориметрируют на фотоэлектроколориметре с красным светофильтром при длине волны 660-680 нм, в кювете на 10мм, против дистиллированной воды.

Протокол работы.

1. Экстинкция стандартной пробы.
2. Экстинкция опытной пробы.
3. Количество неорганического фосфора в исследуемой сыворотке крови выражают в мг% и находят по формуле:

$$X = E_o * 0,02 * 100 / E_c * 0,05, \text{ где}$$

X - количество неорганического фосфора в исследуемой сыворотке крови, мг%;

E_o - экстинкция опытной пробы;

E_c - экстинкция стандартной пробы;

0,02 - количество фосфора в 1мл рабочего стандартного раствора фосфора в мг;

0,5 – количество мл сыворотки крови взятой для конечного определения;
100 – коэффициент пересчета количества фосфора на 100 мл сыворотки крови.

Заболевания, вызывающие гипер- и гипофосфатурию

Снижение/повышение нормальных объёмов выведения неорганического фосфора зачастую указывает на развитие следующих недугов:

- хроническая почечная недостаточность и другие сбои в работе этих парных органов. Такие процессы снижают интенсивность всасывания неорганического фосфора через почечные каналы;
- гиперпаратиреоз — сбой в работе эндокринной системы, вследствие которого происходит снижение интенсивности усвоения фосфора и кальция;
- проблемы с органами ЖКТ. Различные заболевания вызывают ухудшение всасывания веществ-фосфатов в тонком кишечнике;
- рахит, вследствие которого пациент потребляет с пищей большое количество кальция. При этом объёмы выведения фосфора возрастают в 2-10 раз.

Гипо- и гиперфосфатурия нередко диагностируются в детском возрасте. Основная причина таких сбоев — повышенная/пониженная выработка гормона роста.

Лабораторная диагностика обмена железа

Алгоритм исследования обмена железа (сывороточное железо, общая железосвязывающая способность сыворотки, % насыщения трансферрина железом, ферритин)

В организме взрослого человека массой 70 кг содержится 3,5-4,5 г железа, большая часть которого состоит в связанной с белками форме

Соединения	Концентрация, мг на 1 кг массы тела	
	Мужчины	Женщины
Гемоглобин	31,0	28,0

Миоглобин	4,0	3,5
Ферменты	1,5	1,0
Трансферрин	0,5	0,5
Ферритин	13,0	5,0

Железо в организме человека играет важную роль. Оно осуществляет: регуляцию обмена веществ, транспорт кислорода в ткани, принимает участие в кроветворении, в окислительно-восстановительных реакциях, в процессах тканевого дыхания, железо активирует и ингибирует ферментативные системы организма, а также поддерживает иммунологическую резистентность.

Обмен железа представляет собой сложный цикл поступления, усвоения, хранения, переноса, использования, разрушения железосодержащих веществ и повторного использования высвободившегося железа.

С пищей в организм человека поступает около 10-15 мг железа в день, из которых не более 10% оказывается в сыворотке крови. В результате всасывания в двенадцатиперстной, тощей и подвздошной кишках происходит окисление двух- и трехвалентного железа, что приводит к образованию комплексов железа с белками в энтероците. Затем ионы железа поступают в сыворотку крови, где связываются с трансферрином. В сосудистом русле осуществляется транспорт железа в комплексе с трансферрином в костный мозг для синтеза гемоглобина в энтероцитах, в клетки печени, селезенки, костного мозга для депонирования (ферритин, гемосидерин) и в ткани для образования железосодержащих ферментов и миоглобина.

Известно, что сывороточный пул железа в большей части (до 80%) необходим для формирования гемоглобина эритроцитов.

Повышение образования гемоглобина - главное условие, оказывающее выраженное влияние на метаболизм железа. Железо, в составе гемоглобина, это своего рода буферная система, смягчающая большие колебания в поступлении железа с пищей. В физиологических условиях эритропоэз - основной потребитель железа в организме.

Содержание железа в организме

Железо в организме содержится в форме депонированного элемента в виде *ферритина* и *гемосидерина* ретикулярных клеток.

Главная форма депонирования железа - *ферритин*, он аккумулируется в печени, селезенке и костном мозге. По строению у ферритина есть оболочка

(апоферритин) и ядро молекулы, в котором накапливается до 4500 атомов железа в форме гидроксилфосфата.

Молекула *гемосидерина* образуется путем частичного разрушения ферритина. Гемосидерин присутствует в виде нерастворимого комплекса в клетках ретикулоэндотелиальной системы. Железо, циркулирующее в плазме крови, имеет функциональную связь с депонированным железом, которое при необходимости может быть мобилизовано и транспортировано в сыворотку крови от ретикулоэндотелиальных клеток, вовлеченных в катаболизм гемоглобина, к гепатоцитам.

Возрастные показатели сывороточного ферритина

Возраст детей	Ферритин сыворотки (мкг/л)
0-28 дней	175
3 месяца	146
6 месяцев	51
9 месяцев	37
1 год	32
10 лет	34
14 лет	36

Транспорт железа в организме: железо в плазме крови в большей степени связано с трансферрином. Трансферрин, как и другие транспортные белки, образуется в печени, в малом количестве он также образуется в лимфоидной ткани, молочной железе, яичках и яичниках. Каждая молекула трансферрина способна связать 2 атома железа. Атом металла образует комплекс с трансферрином только в присутствии бикарбонатов, которые нужны для образования комплекса железо-трансферрин. В физиологических условиях трансферрин насыщен железом примерно на 30%. Трансферрин осуществляет обмен железа, транспортируя его между эритроидными элементами костного мозга и макрофагами.

Клинико-диагностическое значение обмена железа

Нормальные значения основных параметров обмена железа в организме человека

Параметр	Мужчины	Женщины
----------	---------	---------

Железо сыворотки крови: мкг/дл	50-160	40-150
мкмоль/л	9-29	7-27
Трансферрин, мг/дл	200-320	200-320
Ферритин, нг/мл	15-200	15-200
Общая железосвязывающая способность сыворотки крови:	250-400	250-400
мкг/дл мкмоль/л	45-72	45-72
Насыщение трансферрина, %	20-55	20-55

Клиническо-диагностическое значение: концентрация железа в сыворотке крови может быть, как повышенным, так и сниженным.

Повышение содержания железа в сыворотке крови наблюдается при усилении разрушения эритроцитов (гемолитическая и аутоиммунная анемия), нарушении синтеза гемоглобина (пернициозная анемия), остром гепатите (вирусный гепатит, токсические гепатиты) и при гемосидерозе и гемохроматозе.

Снижение уровня железа в организме развивается постепенно, иногда, с периодами обострения, пока не возникнет выраженная анемия. Понижение концентрации железа в сыворотке крови отмечают при недостаточном поступлении его в организм у детей и вегетарианцев, вследствие нарушения депонирования железа при беременности и грудном вскармливании, в условиях нарушенного всасывания железа при тотальной и субтотальной гастрэктомии, сниженной кислотности и ахлоргидрии, хронической диарее и стеаторее. Хронические повторяющиеся потери крови при язвенной болезни, неспецифическом колите также ведут к снижению содержания в крови свободного железа. В условиях хронической инфекции возможно накопление железа в клетках ретикулоэндотелиальной системы.

Показатели обмена железа

Общая железосвязывающая способность сыворотки (ОЖСС) - под ОЖСС понимают не абсолютное содержание трансферрина, а количество железа, которое может связаться с трансферрином, то есть этот показатель, косвенно характеризует уровень трансферрина в сыворотке крови.

Ненасыщенная железосвязывающая способность сыворотки - это ОЖСС минус концентрация железа сыворотки крови. В норме - 50,2 мкмоль/л.

Коэффициент насыщения трансферрина железом (КНТЖ) — это отношение железа сыворотки к ОЖСС, выраженное в процентах:

$$\text{КНТЖ} = (\text{Железо сыв/ ОЖСС}) * 100\%$$

Увеличение ОЖСС отмечается при гипохромной анемии, на поздних сроках беременности, при хронической кровопотере, остром гепатите, истинной полицитемии, при дефиците железа в пище и нарушении всасывания железа.

Снижение ОЖСС развивается при пернициозной анемии, гемохроматозе, гемолитической анемии, атрансферринемии, хронических инфекциях, хроническом отравлении железом, серповидноклеточной анемии, нефрозе, печеночной недостаточности, злокачественных опухолях и талассемии.

Биохимические маркеры степени железодефицитной анемии.

К анемиям, обусловленным недостаточностью эритропоэза относят гипохромные анемии.

Железодефицитная анемия (ЖДА). По данным ВОЗ, число лиц с дефицитом железа в мире составляет 500-600 млн человек.

Нарушение транспорта железа из депо к эритроциту имеет место при отсутствии синтеза трансферрина, заболеваниях печени, сопровождающихся нарушением белоксинтетической функции (цирроз, рак печени), а также при терапии рекомбинантным эритропоэтином (рЭПО) приводит к стимуляции эритропоэза и усиленному потреблению железа эритрокариоцитами.

Дефициту железа предшествует в первую очередь истощение его запасов (*латентный железодефицит*), затем уменьшается транспортное железо, далее - снижается активность железосодержащих ферментов и в последнюю очередь - нарушается синтез гемоглобина.

Выделяют следующие формы железодефицитных состояний:

1. Снижение содержания депонированного и транспортного железа при сохраненном эритроцитарном пуле железа, дефицит железа без анемии, бывает предлатентный и латентный железодефицит.
2. Снижение уровня всех метаболических пулов железа железодефицитная анемия.

Дефицит железа

Лабораторные критерии железодефицитных состояний у детей

Показатель	Норма	Латентный дефицит железа	Анемия Железодефицит.
Гемоглобин (г/л): - до 6 лет	110	110	110
-старше 6 лет	120	120	
Цветовой показатель	0,86-1,05	0,86-1,05	
МСН (пг)	24-33	24-33	
МСНС (%)	30-38	30-38	
Железо сыворотки (мкмоль/л)	10,6-33,6		
Общая железосвязывающая способность сыворотки (мкмоль/л)	40,6-62,5	63	63
Латентная железосвязывающая способность сыворотки (мкмоль/л)		47	47
% насыщения трансферрина (%)	17	-17	
Ферритин сыворотки (мкг/л)	12		

Предлатентный дефицит железа - состояние, предшествующее дефициту железа, сопровождается повышением всасывания железа в желудочно-кишечном тракте. Клинические симптомы отсутствуют. Лабораторные показатели (картина периферической крови, сывороточное железо, трансферрин, ферритин) обычно остаются в пределах нормы.

Латентный дефицит железа проявляется сидеропеническими симптомами, вызванными дефицитом железа в тканях (сухость кожи, ломкость ногтей, выпадение волос, изменение слизистых, мышечная слабость). Лабораторные показатели: понижение уровня ферритина (5-15 мкг/л), сывороточного

железа в плазме, повышение трансферрина. При истощении запасов железа развивается недостаток транспортируемого железа, хотя синтез гемоглобина на этой стадии не нарушен и, следовательно, показатели красной крови (Hb, Эр, MCV, MCH, MCHC) сохраняются в пределах нормы. Однако при дополнительных стрессах или потерях железа латентный дефицит железа может перейти в ЖДА.

Регенераторная стадия ЖДА характеризуется нормальной клеточностью костного мозга, умеренной гиперплазией клеток красного ряда (количество их достигает 40-60% от общего количества миелокариоцитов), преобладанием базофильных и полихроматофильных эритробластов. Морфологическим признаком ЖДА является гипохромия эритроцитов и анизоцитоз со склонностью к микроцитозу.

Определение железо-связывающей способности сыворотке крови.

Принцип метода: в щелочных условиях к сыворотке добавляется избыток ионов железа, которые специфически связываются с белками сыворотки. При добавлении феррозина образуется окрашенный комплекс, с максимумом поглощения при 560 нм, оптическая плотность которого пропорциональна концентрации оставшегося несвязанного железа. Разница между добавленным к сыворотке известным количеством железа и определенным в виде железоферрозинного комплекса соответствует железосвязывающей способности сыворотки (ЖСС).

Общая железосвязывающая способность сыворотки (ОЖСС) определяется как сумма ЖСС и количество железа в сыворотке.

Реактивы.

1. Калибровочный раствор железа – 89,5 мкмоль/л
2. Буфер
3. Раствор феррозина.
4. Сыворотка.

Оборудование.

1. Пробирки – 2 шт.
2. Пипетки 5 и 1 мл
3. Дозатор на 0.02 мл
4. ФЭК, кюветы на 1 см.
5. Термостат.

Ход определения.

Тщательно перемешивают, выдерживают 10 мин при 37⁰ С и измеряют оптическую плотность опытной (D₂) и калибровочной (D_{калибр}) пробы при 560 нм против воды в кюветах на 10 мм.

Расчет ЖСС проводят по формуле:

$$\text{ЖСС} = 89,5 \cdot (D_{\text{калибр}} - D_2 + D_1) / D_{\text{калибр}}$$

Нормальные величины:

Мужчины – 45 – 75 мкмоль/л

Женщины – 40 – 67 мкмоль/л

Какой биоматериал можно использовать для исследования?

Венозную кровь.

Как правильно подготовиться к исследованию?

1. Исключить из рациона алкоголь за 24 часа до исследования.
2. Прекратить принимать пищу за 8 часов до исследования, можно пить чистую негазированную воду.
3. Не употреблять лекарственные препараты в течение 24 часов перед анализом (по согласованию с врачом).
4. Исключить прием лекарственных препаратов, содержащих железо, в течение 72 часов до исследования.
5. Исключить физическое и эмоциональное перенапряжение и не курить в течение 30 минут до исследования.

Когда назначается исследование?

- При обследовании детей в период интенсивного роста.
- При обследовании беременных.
- При симптомах недостаточности железа в организме (бледность кожных покровов, общая слабость, утомляемость, атрофия слизистой языка, изменение структуры ногтей, аномальные вкусовые предпочтения).
- При выявлении гипохромной микроцитарной анемии по данным клинического анализа крови.
- При обследовании девушек и женщин с обильными менструальными выделениями и маточными кровотечениями.

- При обследовании ревматологических и онкологических больных.
- При контроле за эффективностью применения препаратов, содержащих железо.
- При обследовании пациентов с астенией неясного генеза и выраженной утомляемостью.

Клинико-диагностическое значение определения ЖСС.

Железо транспортируется в виде комплекса с металлсвязывающим глобулином – *трансферрином*. Обычно этот белок переносит такое количество железа, которое соответствует 1/4 -1/3 максимальной способности трансферрина к связыванию этого иона. Поэтому в норме процент насыщения железом трансферрина составляет 25 –30%.

ОЖСС повышается при:

- железодефицитной анемии;
- приеме контрацептивов;
- в поздние сроки беременности;
- нередко у детей;
- гепатитах.

ОЖСС снижается при:

- уменьшении содержания общего белка в плазме крови (нефротический синдром, голодание, рак);
- хронических инфекциях;
- талассемии.

О запасах железа в организме можно судить по определению в плазме крови *ферритина*. Концентрация ферритина плазмы крови 1 мкг/л соответствует содержанию 8 мг железа в организме.

Нормальные величины концентрации ферритина в сыворотке крови (мкг/л):

у новорожденных – 25 –200;

6 месяцев – 12 лет – 7 – 140;

взрослых мужчин – 15- 200;

взрослых женщин – 12 –150.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Практика лабораторных биохимических исследований: учебное пособие. Пустовалова Л.М. – Ростов н/Д.: Феникс, 2014
2. Теория лабораторных биохимических исследований (основы биохимии): учебное пособие. Пустовалова Л.М. – Ростов н/Д.: Феникс, 2014
3. Теория и практика лабораторных биохимических исследований учебник/Н.В.Любимова,И.В.Бабкина,Ю.С.Тимофеев-М.:ГЭОТАР-Медиа,2020.416с.:ил.

Задания для самоконтроля

Тестовые задания по разделу водно-минеральный обмен обмен:

1. Перемещение воды в организме определяется:

- А. осмотическим давлением
- Б. онкотическим давлением
- В. гидростатическим давлением
- Г. проницаемостью стенки сосудов
- Д. всеми перечисленными факторами

2. Осмотическое давление плазмы в норме составляет около:

- А. 140 мосмолей/л

Б. 300 мосмолей/л

В. 600 мосмолей/л

Г. 30 мм рт. ст.

Д. 100 мм тр. ст.

3. Диффузия – это:

А. перенос вещества из более высокой концентрации в меньшую

Б. перенос растворителя через полупроницаемую мембрану

В. перемещение вещества под влияние гидростатического давления

Г. транспорт вещества против градиента концентрации за счет потребления энергии АТФ

Д. все перечисленное верно

4. Осмотические свойства биологических жидкостей определяется:

А. количеством электролитов

Б. количеством неэлектролитов

В. молекулярной (атомарной) массой частиц

Г. суммарным количеством растворенных частиц

Д. химической природой растворенных соединений

5. Величина онкотического давления сыворотки определяется:

А. ионами

Б. углеводами

В. липидами

Г. белками

Д. низкомолекулярными азотистыми соединениями

6. К гормонам, специфически регулирующим водно-электролитный обмен организма, относятся:

А. альдостерон

Б. вазопрессин

В. натрийуретический фактор (НУФ)

Г. все перечисленные гормоны

Д. ни один из перечисленных гормонов

7. Влияние альдостерона на водно-солевой обмен:

А. задержка воды в организме

Б. увеличение почечной реабсорбции натрия

В. увеличение почечной экскреции калия

Г. увеличение содержания натрия в клетках

Д. все перечисленное верно

8. Влияние вазопрессина на водно-солевой обмен:

А. увеличение реабсорбции натрия и воды в почках

Б. уменьшение осмоляльности сыворотки крови

В. увеличение внеклеточной жидкости

Г. все перечисленное верно

Д. все перечисленное неверно

9. Полиурией сопровождаются:

- А. кистозная почка
- Б. несахарный диабет
- В. сахарный диабет
- Г. болезнь Кушинга
- Д. все перечисленные состояния**

10. Дегидротация может возникнуть при всех следующих ситуациях, кроме:

- А. недостаточного потребления воды
- Б. избыточного образования антидиуретического гормона**
- В. под влиянием диуретиков
- Г. при питье морской воды
- Д. обильного потоотделения

11. Основным ионом, определяющим перенос воды в организме, является:

- А. калий
- Б. натрий**
- В. кальций
- Г. хлор
- Д. полиэлектролиты белков

12. Молярность раствора – это:

- А. число молекул растворенного вещества в 1 л раствора

- Б. число анионов и катионов, образующихся при диссоциации
- В. число молей растворенного вещества в 1 л раствора**
- Г. число молей растворенного вещества в 1 л растворителя
- Д. суммарное количество растворенных частиц в 1 л раствора

13. Нарушение водного баланса может сопровождаться изменением:

- А. гематокрита
- Б. гемоглобина
- В. КОС
- Г. общего белка
- Д. всего перечисленного**

14. Избыток воды в организме приводит к:

- А. увеличению объема плазмы
- Б. скорости гломерулярной фильтрации
- В. подавлением системы ренин-ангиотензин-альдостерон
- Г. увеличением выделения натрия
- Д. увеличением выделения калия**

15. рН венозной крови в норме равен:

1. **7,35-7,45**
2. 7,0 – 7,45
3. 7,35-7,7
4. 6,9 – 7,35

16. Ацидоз – то снижение рН венозной крови ниже:

1. 7,05
2. 7,15
3. 7,25
4. **7,35**
5. 7,45

17. Механизмы регуляции КОС реализуются путем участия:

1. **Буферных систем**
2. **Почек**
3. **Легких**
4. **Печени**
5. Сердца
6. Мозга

18. Компонентами фосфатной буферной системы являются:

1. Угольная кислота
2. Углекислый газ
3. Уксусная кислота
4. **Однозамещенный фосфат натрия**
5. Бикарбонат натрия
6. Фосфат натрия

19. Буферные системы состоят из:

1. Слабой кислоты и слабого основания
2. Слабой кислоты и сильного основания
3. **Слабой кислоты и соли, образованной сильным основанием и слабой кислотой**

20. При закислении внутренней среды легкие регулируют КОС путем:

1. **Гипервентиляции**
2. Гиповентиляции
3. Неравномерной вентиляции

21. Повышение PCO_2 выступает в качестве причины:

1. **Респираторного ацидоза**
2. Респираторного алкалоза
3. Метаболического ацидоза
4. Метаболического алкалоза

22. Повышение PCO_2 выступает в качестве компенсаторной реакции:

1. Респираторного ацидоза
2. Респираторного алкалоза
3. Метаболического ацидоза
4. **Метаболического алкалоза**

23. Понижение PCO_2 выступает в качестве причины:

1. Респираторного ацидоза
2. **Респираторного алкалоза**
3. Метаболического ацидоза

4. Метаболического алкалоза
- 24.Понижение PCO_2 выступает в качестве компенсаторной реакции:**
 1. Респираторного ацидоза
 2. Респираторного алкалоза
 3. **Метаболического ацидоза**
 4. Метаболического алкалоза
- 25.Понижение буферных оснований (ВВ) выступает в качестве причины:**
 5. Респираторного ацидоза
 6. Респираторного алкалоза
 7. **Метаболического ацидоза**
 8. Метаболического алкалоза
- 26.Повышение буферных оснований (ВВ) выступает в качестве причины:**
 9. Респираторного ацидоза
 - 10.Респираторного алкалоза
 - 11.Метаболического ацидоза
 - 12.**Метаболического алкалоза**
- 27.Понижение буферных оснований (ВВ) выступает в качестве компенсаторной реакции:**
 5. Респираторного ацидоза
 6. **Респираторного алкалоза**
 7. Метаболического ацидоза
 8. Метаболического алкалоза
- 28.Повышение буферных оснований (ВВ) выступает в качестве компенсаторной реакции:**
 9. **Респираторного ацидоза**
 - 10.Респираторного алкалоза
 - 11.Метаболического ацидоза
 - 12.Метаболического алкалоза
- 29.Причинами газового ацидоза является:**
 1. **Гиповентиляция**
 2. Гипервентиляция
 3. **Увеличение мертвого пространства**
 4. Дыхание через трахеостомическую трубку
 5. **Дыхание воздухом с повышенным содержанием CO_2**
- 30.Причинами газового алкалоза является:**
 1. Гиповентиляция
 2. **Гипервентиляция**
 3. Увеличение мертвого пространства
 4. **Дыхание через трахеостомическую трубку**
 5. Дыхание воздухом с повышенным содержанием CO_2
- 31.Причинами метаболического ацидоза является:**

1. Гиповентиляция
2. Гипервентиляция
3. Рвота
4. **Понос**
5. Дыхание воздухом с повышенным содержанием CO_2

32. Причиной метаболического алкалоза является:

1. Гипервентиляция
2. **Рвота**
3. Понос
4. **Переливание цитратной крови**
5. Лактацидемическая кома

ПРИМЕР РЕШЕНИЯ ЗАДАЧИ ПО НАРУШЕНИЮ КОС.

Задача

- рН 7.36
 - pCO_2 52 мм.рт.ст.
 - SB 27.5 ммоль/л
 - AB 45.0 ммоль/л
 - BE +4.0 ммоль/л
1. рН в норме колеблется между значениями 7.36-7.42. Значение 7.35 – это крайняя граница нормы. Следовательно, мы в праве предположить склонность к ацидозу (компенсированный ацидоз).
 2. Норма pCO_2 – 32.5-46.6 мм.рт.ст. В нашем случае pCO_2 – 52 мм.рт.ст. Этот показатель значительно превышает норму. Следовательно, мы можем предположить повышенное накопление углекислого газа в крови. Косвенно это должно привести к увеличению AB.
 3. Показатель AB значительно превышает норму, и, что весьма важно, превышает показатель SB. Вспомним, что такая ситуация характерна для газового ацидоза.
 4. Показатель BE превышает крайнее значение нормы (+2.3), что свидетельствует о значительном накоплении буферных оснований в крови.
 5. Все рассуждения приводят нас к выводу о том, что в результате нарушения дыхания в организме возник **компенсированный газовый (дыхательный) ацидоз**.

ПРОДОЛЖИТЬ

ОТВЕТ:

1. Функции воды в

организме...

2. Состояния воды в орга-

низме...

3. В регуляции водного
обмена участвуют...

4. Какой гормон регули-
рует обмен натрия в ор-
ганизме...

5. Обмен калия в орга-
низме регулируется...

6. Интенсивность всасы-
вания кальция в кишеч-
нике зависит от вита-
мина...

7. В организме фосфор
является компонентом...

8. Для всасывания фос-
фора необходимо при-
сутствие ионов...

9. Магний является анта-
гонистом:

10. Хлор используется
слизистой желудка для
секреции...

11. Железо входит в со-
став...

РАЗДЕЛ 7:Проведение лабораторных биохимических исследований по определению активности ферментов,проведение коагулологических исследований.

Практическое занятие №22-24: Ферменты.Строение,биологическое значение.Механизм действия.Особенности ферментативного катализа.Изоферменты.Определение активности ферментов.

Формируемые профессиональные компетенции 2.1, 2.2, 2.3.

Учебные цели (знать, уметь, иметь практический опыт):

Знать	Уметь	Владеть навыками
1-13,17,18	1-14,17,18,19	1-9

Воспитательная цель Привитие умений и навыков учебной работы и коллективного труда. Формирование целостного миропонимания и современного научного мировоззрения, основанного на признании приоритетов общечеловеческих ценностей: гуманности, милосердия, сострадания, уважения к жизни и здоровью человека.

Развивающая цель Формирование навыков самообразования, самореализации личности и развитие речи, мышления, памяти .

Межпредметные связи ОПД. 03 Химия, ОПД. 16 Физико-химические методы исследования и техника лабораторных работ, ОПД . 02 Анатомия.

Список понятий для усвоения темы

1. Свойства ферментов

2. Классификация ферментов по типу катализируемой реакции, по сложности строения молекулы.

3. Химическая природа ферментов. Активный и аллостерический центры.

4. Механизм действия ферментов

5. Типы ингибирования

6. Изоферменты

7. Кофакторы ферментов: ионы металлов, коферменты. Коферментные функции витаминов.

8. Особенности ферментативного катализа. Специфичность действия ферментов.

9. Единицы измерения активности и количества фермента.

10. Значение ферментов в диагностике заболеваний.

Список понятий для усвоения темы

Ферменты, ферментативный катализ, каталитический центр, апофермент, фермент-субстратный комплекс, изоферменты, активаторы, коферменты.

1. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Материальной основой жизненных процессов является взаимодействие химических веществ и элементов живого организма. В нормальных физиологических условиях биохимические реакции протекают в организме с высокими скоростями, что обеспечивается биологическими катализаторами белковой природы – *ферментами*.

Действуя в строго определенной последовательности, ферменты катализируют расщепление молекул питательных веществ, обеспечивают запасание и преобразование химической энергии, а из простых молекул-предшественников строят макромолекулы, входящие в состав клетки.

Ферментология (энзимология) – это наука о ферментах (энзимах), специфических белках-катализаторах, синтезируемых любой живой клеткой и активирующих различные биохимические реакции, протекающие в организме.

Ферменты (энзимы) – это вещества белковой природы, обладающие каталитической активностью и ускоряющие протекание реакций обмена веществ, т.е. вещества, обеспечивающие специфический высокоскоростной катализ биохимических реакций. Термин «фермент» происходит от латинского слова «fermentum» - закваска, а «энзим» - от греческих слов «en zyme» - в дрожжах. Оба названия восходят к истории изучения процессов брожения, в ходе чего было сделано предположение, а затем и доказано существование биологических катализаторов, получивших соответствующее название.

Строение ферментов

Метаболит - вещество, которое участвует в метаболических процессах.

Субстрат – вещество, которое вступает в химическую реакцию.

Продукт – вещество, которое образуется в ходе химической реакции.

Ферменты характеризуются наличием специфических центров катализа.

Активный центр (Ац) – это часть молекулы фермента, которая специфически взаимодействует с субстратом и принимает непосредственное участие в катализе. Ац, как правило, находится в нише (кармане). В Ац можно выделить два участка: участок связывания субстрата – **субстратный участок** (контактная площадка) и собственно **каталитический центр**.

Большинство субстратов образует, по меньшей мере, три связи с ферментом, благодаря чему молекула субстрата присоединяется к активному центру единственно возможным способом, что обеспечивает субстратную специфичность фермента. Каталитический центр обеспечивает выбор пути химического превращения и каталитическую специфичность фермента.

У группы регуляторных ферментов есть **аллостерические центры**, которые находятся за пределами активного центра. К аллостерическому центру могут присоединяться “+” или “–” модуляторы, регулирующие активность ферментов.

Различают ферменты простые, состоят только из аминокислот, и сложные, включают также низкомолекулярные органические соединения небелковой природы (коферменты) и (или) ионы металлов (кофакторы).

Коферменты – это органические вещества небелковой природы, принимающие участие в катализе в составе каталитического участка активного центра. В этом случае белковую составляющую

называют *апоферментом*, а каталитически активную форму сложного белка – *холоферментом*. Таким образом: холофермент = апофермент + кофермент.

В качестве коферментов функционируют:

- ГЕМЫ,
- нуклеотиды,
- коэнзим Q,
- ФАФС,
- SAM,
- Глутатион
- производные водорастворимых витаминов:

Витамины	Коферменты
PP (никотиновая кислота)	НАД ⁺ , НАДФ ⁺
B ₂ (рибофлавин)	ФАД, ФМН
B ₆ (пиридоксаль)	Пиридоксальфосфат
B ₁ (тиамин)	Тиаминпирофосфат
B ₁₂	Кобаламины

Кофермент, который присоединен к белковой части ковалентными связями

называется *простетической группой*. Это, например, FAD, FMN, биотин, липоевая кислота. Простетическая группа не отделяется от белковой части.

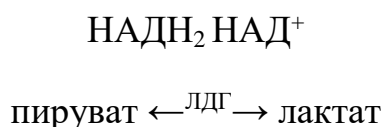
Кофермент, который присоединен к белковой части нековалентными связями называется *косубстрат*. Это, например, НАД⁺, НАДФ⁺. Косубстрат присоединяется к ферменту в момент реакции.

Кофакторы ферментов – это ионы металлов, необходимые для проявления каталитической активности многих ферментов. В качестве кофакторов выступают ионы калия, магния, кальция, цинка, меди, железа и т.д. Их роль разнообразна, они стабилизируют молекулы субстрата, активный центр фермента, его третичную и четвертичную структуру, обеспечивают связывание субстрата и катализ. Например, АТФ присоединяется к киназам только вместе с Mg²⁺.

Изоферменты – это множественные формы одного фермента, катализирующие одну и ту же реакцию, но отличающиеся по физическим и

химическим свойствам (сродству к субстрату, максимальной скорости катализируемой реакции, электрофоретической подвижности, разной чувствительности к ингибиторам и активаторам, оптимуму pH и термостабильности). Изоферменты имеют четвертичную структуру, которая образована четным количеством субъединиц (2, 4, 6 и т.д.). Изоформы фермента образуются в результате различных комбинаций субъединиц.

В качестве примера можно рассмотреть лактатдегидрогеназу (ЛДГ), фермент, который катализирует обратимую реакцию:



ЛДГ существует в виде 5 изоформ, каждая из которых состоит из 4-х протомеров (субъединиц) 2 типов М (muscle) и Н (heart). Синтез протомеров М и Н типа кодируется двумя разными генетическими локусами. Изоферменты ЛДГ различаются на уровне четвертичной структуры: ЛДГ₁ (НННН), ЛДГ₂ (НННМ), ЛДГ₃ (ННММ), ЛДГ₄ (НМММ), ЛДГ₅ (ММММ).

Существование изоформ повышает адаптационную возможность тканей, органов, организма в целом к меняющимся условиям. По изменению изоферментного состава оценивают метаболическое состояние органов и тканей.

Локализация ферментов в клетке и тканях.

Ферменты по локализации делят на 3 группы:

I – общие ферменты (универсальные)

II - органоспецифические

III - органеллоспецифические

Общие ферменты обнаруживаются практически во всех клетках, обеспечивают жизнедеятельность клетки, катализируя реакции биосинтеза белка и нуклеиновых кислот, образование биомембран и основных клеточных органелл, энергообмен. Общие ферменты разных тканей и органов, тем не менее, отличаются по активности.

Органоспецифические ферменты свойственны только определенному органу или ткани. Например: Для печени – аргиназа. Для почек и костной ткани –

щелочная фосфатаза. Для предстательной железы – КФ (кислая фосфатаза). Для поджелудочной железы – α -амилаза, липаза. Для миокарда – КФК (креатинфосфокиназа), ЛДГ, АсТ и т.д.

Внутри клеток ферменты также распределены неравномерно. Одни ферменты находятся в коллоидно-растворенном состоянии в цитозоле, другие вмонтированы в клеточных органеллах (структурированное состояние).

Органеллоспецифические ферменты. Разным органеллам присущ специфический набор ферментов, который определяет их функции.

Среди ферментов выделяется немногочисленная группа **регуляторных ферментов**, которые способны отвечать на специфические регуляторные воздействия изменением активности. Эти ферменты имеются во всех органах и тканях и локализуются в начале или в местах разветвления метаболических путей.

Строгая локализация всех ферментов закодирована в генах.

Определение в плазме или сыворотке крови активности органо-органеллоспецифических ферментов широко используется в клинической диагностике.

Классификация и номенклатура ферментов

Номенклатура – названия индивидуальных соединений, их групп, классов, а также правила составления этих названий. Номенклатура ферментов бывает тривиальной (короткое рабочее название) и систематической. По систематической номенклатуре, принята в 1961г Международным союзом биохимии, можно точно идентифицировать фермент и его катализируемую реакцию.

Классификация – разделение чего либо по выбранным признакам.

- Классификация ферментов основана на типе катализируемой химической реакции;
- На основании 6 типов химических реакций ферменты, которые их катализируют, подразделяют на 6 классов: оксидоредуктазы, лиазы, лигазы, трансферазы, гидролазы, изомеразы.
- Название фермента состоит из 2 частей: 1 часть – название субстрата (субстратов), 2 часть – тип катализируемой реакции. Окончание – АЗА;

- Дополнительная информация, если необходима, пишется в конце и заключается в скобки: L-малат + НАДФ⁺ ↔ ПВК + СО₂ + НАДН₂ L-малат: НАДФ⁺ - оксидоредуктаза (декарбоксилирующая);

В правилах названия ферментов нет единого подхода.

Регуляция каталитической активности ферментов. Бывает:

- 1). Неспецифическая регуляция. В связи с лабильностью всех ферментов, их каталитическая активность зависит от температуры, рН и давления.
- 2). Специфическая регуляция. Под действием специфических активаторов и ингибиторов изменяется активность определенных регуляторных ферментов, которые контролируют интенсивность метаболических процессов в организме.

Энзимология – это раздел биохимии, изучающий ферменты и катализируемые ими реакции.

Медицинская энзимология – это энзимология, которая изучает применение ферментов в медицине.

В медицинской энзимологии выделяют три основных направления:

- энзимопатология;
- энзимодиагностика;
- энзимотерапия.

I. Энзимопатология

Энзимопатология – это наука, которая изучает энзимопатии.

Энзимопатии – это группа заболеваний, которые вызваны различными дефектами ферментов. Энзимопатий делятся на: наследственные (первичные) и приобретенные (вторичные).

Энзимодиагностика

Энзимодиагностика (энзим[ы] + греч. *diagnostikos* способный распознавать) – методы диагностики болезней, патологических состояний и процессов,

основанные на определении активности ферментов в биологических жидкостях.

Направления энзимодиагностики:

- 1) Определение активности органо-, органеллоспецифических ферментов и их изоферментов.

Определение в биологических жидкостях активности ферментов и их изоферментов позволяет установить локализацию патологического процесса, его стадию, выраженность, а также эффективность его лечения.

Ферменты плазмы крови по происхождению можно разделить на 3 группы:

- 1) ***секреторные ферменты*** - секретируются определенными органами в плазму крови, где и выполняют свою функцию. Например: ЛПЛ, ЛХАТ, ферменты свертывающей и противосвертывающей системы крови;
- 2) ***эксреторные ферменты*** - синтезируются в железах ЖКТ, выделяются в просвет ЖКТ, где обеспечивают процесс пищеварения. В кровь эти ферменты попадают при повреждении желез. Например, при панкреатите в крови обнаруживается панкреатическая липаза, амилаза, трипсин и т.д., при воспалении слюнных желез - амилаза слюны.
- 3) ***клеточные ферменты*** - функционируют только внутри клеток, в плазму крови они попадают во время повреждения (под действием медиаторов воспаления и т.д.) и гибели клеток (при некрозе). К ним относятся общие, органо- и органеллоспецифические ферменты.

За счет естественной гибели клеток клеточные ферменты имеют в плазме крови постоянно низкую активность. При поражении органа происходит значительный выход ферментов из его клеток и многократное увеличение активности этих ферментов в плазме крови.

Например:

Аминотрансферазы. Локализуются в митохондриях, обеспечивают взаимопревращения аминокислот и кетокислот: $AK_1 + KK_2 \leftrightarrow KK_1 + AK_2$.

АСТ: асп+ α -КГ \leftrightarrow ЩУК+глу. АСТ много в миокарде, по убыванию меньше в печени, скелетной мускулатуре, ЦНС, почках, семенниках. Активность в сыворотке крови 6-25МЕ/л.

АЛТ: ала+ α -КГ \leftrightarrow ПВК+глу. АЛТ много в печени, поджелудочной железе, миокарде, скелетной мускулатуре. Активность в сыворотке крови 6-26МЕ/л.

Активность обеих трансаминаз в сыворотке крови возрастает в десятки раз при инфаркте миокарда (АСТ>АЛТ), при остром инфекционном гепатите (АЛТ>АСТ), а также при циррозе печени и мышечной дистрофии.

Информативными пробами являются креатинфосфокиназный и лактатдегидрогеназный тесты, относящиеся к некротическим ферментным методам. Их диагностическая ценность повысилась после внедрения в клиническую практику методов определения их изоферментов.

ЛДГ. Локализуется в цитозоле, обеспечивает взаимопревращения ПВК и лактата.

ЛДГ: ПВК+ НАДН₂ \leftrightarrow лактат + НАД⁺. ЛДГ₁ и ЛДГ₂ наиболее активны в сердечной мышце и почках, ЛДГ₄ ЛДГ₅ - в скелетных мышцах и печени. Активность в сыворотке крови 55-140МЕ/л.

При инфаркте миокарда в сыворотке крови резко повышается активность ЛДГ₁ и ЛДГ₂, а при поражениях скелетной мускулатуры и печени (гепатит, отравления хлорорганическими соединениями) повышается активность ЛДГ₄ ЛДГ₅.

Креатинкиназа (КК). Локализуется в цитозоле, митохондриях, миофибриллах.

КК: Креатин + АТФ \leftrightarrow креатинфосфат + АДФ. Изофермент КК-ВВ находится преимущественно в головном мозге, МВ – в миокарде, ММ – в скелетных мышцах. Активность в сыворотке крови КК в норме до 90МЕ/л.

В сыворотке крови КК-ММ повышается при повреждении скелетных мышц (при прогрессирующей мышечной дистрофии в 50 раз), КК-МВ - при инфаркте миокарда. КК-ВВ не проходит гематоэнцефалический барьер и не имеет значения для диагностики патологий ЦНС.

В сыворотке крови повышена активность **амилазы** при остром панкреатите, кисте поджелудочной железы; **γ -глутамилтранспептидазы** - при остром инфекционном или токсическом гепатите, хроническом гепатите, циррозе печени; **кислой фосфатазы** - при карциноме простаты; **щелочной фосфатазы** - при заболеваниях костей, закупорке желчных протоков, при беременности и у детей.

Определение активности ферментов с диагностической целью проводят также в моче, слюне, ликворе и биоптатах органов и тканей.

Энзимотерапия

Энзимотерапия – применение ферментов животного, бактериального или растительного происхождения и регуляторов активности ферментов с лечебной целью.

Внедрению ферментных препаратов в современную клиническую практику способствовало развитие технологий получения обогащенных ферментами препаратов и очищенных ферментов.

2. ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Методы определения ферментов ,диагностическое значение.

Определение активности альфа-амилазы в биологических жидкостях.

Альфа-амилаза (диастаза, альфа-1,4-глюкан-4-глюканогидролаза) относится к классу гидролаз, катализирующих гидролиз полисахаридов, включая крахмал и гликоген, до декстринов и простых ди- и моносахаридов (мальтоза, глюкоза). Амилаза в самых больших концентрациях находится в поджелудочной железе и слюнных железах соответственно – в форме поджелудочного и слюнного изоферментов. В физиологических условиях амилаза сыворотки крови состоит на 40% из панкреатической амилазы и на 60% из слюнной амилазы. Используя специфические ингибиторы или разделение электрофорезом, можно установить происхождение фермента, присутствующего в плазме. Амилаза удаляется из плазмы почками и экскретируется с мочой. Это обуславливает большую информативность определения активности альфа-амилазы в моче как теста оценки функционального состояния поджелудочной железы.

Рост активности амилазы имеет самое большое значение при диагностике заболеваний поджелудочной железы.

Клинико-диагностическое значение:

Активность альфа-амилазы крови и мочи в течение суток значительно меняется.

Гиперамилаземия – повышение активности амилазы в сыворотки крови.

- Острый панкреатит – максимальные значения имеют место в первые 6 – 12 часов после проявления симптомов болезни. После этого времени активность фермента снижается, нормализуется через 2 – 5 дней. Если активность сохраняется увеличенной более 5 дней, это свидетельствует о увеличении воспаления.
- Обострение при хроническом панкреатите
- Перфорация язвы двенадцатиперстной кишки
- Кишечная непроходимость
- Холецистит
- Перитонит
- Острый аппендицит
- Паротит
- Алкалоиды (морфин, героин, кодеин)
- Отравление метанолом
- Большие дозы этанола (у алкоголиков)

Гипоамилаземия – снижение активности амилазы в сыворотки крови (практически не имеет диагностического значения).

- Некроз поджелудочной железы
- Тиреотоксикоз
- Инфаркт миокарда

Гиперамилазурия – повышенное выделение амилазы с мочой.

- Острый панкреатит – повышение активности фермента наблюдается в течение первых 24 часа воспаления. Повышенное выделение фермента с мочой сохраняется в последующие 7 -10 дней, несмотря на то, что активность амилазы в крови уже после 3 – 4 дней нормальная.
- Рак поджелудочной железы
- Перфорация язвы двенадцатиперстной кишки
- Желчекаменная болезнь
- Болезни слюнных желез, паротит, камни в слюнных протоках

Гипоамилазурия – снижение выделения амилазы с мочой.

- Болезни почек
- Болезни печени

Принцип метода

Существует много разных методов определения активности \square -амилазы. Мы познакомимся с простым и надежным методом последовательных разведений фермента, предложенным еще в 1929 г. Вольгемутом и сохранившимся до настоящего времени. Метод основан на определении

максимального разведения мочи, при котором происходит полное расщепление крахмала (отсутствие цветной реакции с иодом) при заданных условиях.

Выполнение работы

Получение последовательных разведений мочи: в 6 пробирок наливают по 1 мл 0,9% раствора NaCl. В первую пробирку вносят 1 мл мочи (тщательно перемешивают). 1 мл смеси из первой пробирки переносят во вторую, перемешивают. 1 мл из второй пробирки переносят в третью пробирку и т.д. Из последней пробирки, после перемешивания, 1 мл выливают в раковину.

В результате получают ряд последовательных разведений мочи (1:2; 1:4; 1:8 и т.д. Во все пробирки быстро вносят по 2 мл 0,1% раствора крахмала. Инкубируют 30 минут при комнатной температуре. В каждую пробирку добавляют по 1 капле 1% раствора йода и тщательно перемешивают. Результаты окраски растворов в пробирках заносят в таблицу:

Проба	1	2	3	4	5	6
Разведение	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
Окраска с иодом						

Отмечают последнюю пробирку, в которой произошло полное расщепление крахмала (желтое окрашивание с иодом) и рассчитывают активность α -амилазы.

Расчет активности α -амилазы

За условную единицу активности (ед. Вольгемута) принимают активность необходимую для расщепления 1 мл 0,1% раствора крахмала при комнатной температуре за 30 мин.

$$A = 2 * P \text{ [ед. Вольгемута]}$$

2 (мл) – объем 0,1% крахмала

P – разведение (см. таблицу), например 1-я пробирка – разведение 2, 6-я пробирка – разведение 64.

Норма: от 16 до 64 условных единиц Вольгемута.

Выполнить задания в тетрадях для самостоятельной работы

Определение активности фосфатаз в сыворотке крови.

Щелочная фосфатаза (К.Ф. 3.1.3.1. фосфогидролаза моноэфиров ортофосфорной кислоты) содержится во всех органах и тканях или во всех клеточных мембранах. **Оптимум рН для ЩФ около 10.**

В сыворотке крови различают несколько изоферментов ЩФ, 7 из которых имеют наибольшее клинико-диагностическое значение.

1. Костная ЩФ. В кости щелочная фосфатаза секретируется остеобластами, ее роль в формировании кости до конца не установлена. Предполагают, что она участвует в созревании матрикса и его минерализации. Значительное увеличение ее активности в сыворотке крови наблюдается при повышенной деятельности остеобластов: рост костей (у детей активность выше, чем у взрослых, увеличивается она в последний триместр беременности), возобновлении движений после длительного постельного режима, переломах, деформирующим остите, рахите, гиперпаратиреозе. Это характерно и для процессов остеомалации (злокачественные опухоли костей, миелома), а также костного туберкулеза и лейкозов. Повышение активности костной ЩФ при рахите отмечается чаще, чем увеличение содержания неорганического фосфора; при выздоровлении активность ЩФ нормализуется позднее, чем уровень Са и Р, примерно в те же сроки, что и рентгенологические показатели. Некоторое повышение активности костной ЩФ отмечается при синдроме Фалькони.

2. Печеночная ЩФ представлена двумя изоферментами. Первый повышается в сыворотке крови при застое в печени и сниженной элиминации фермента с желчью, при васкулитах, во второй половине беременности. Это основной фермент при диагностике патологии гепатобилиарного тракта. Второй изофермент повышается при гепатоцеллюлярной патологии - вирусные гепатиты, желтая дистрофия печени, циррозы. Это увеличение значительно уступает активности аминотрансфераз.

3. ЩФ желчи - фермент холестаза. Он высвобождается из поврежденных желчных протоков. Самые высокие цифры сывороточной активности отмечаются при обтурационных желтухах, когда задержка экскреции фермента с желчью приводит к тому, что он вновь поступает в кровь.

4. **Кишечная ЩФ** синтезируется энтероцитами, поступает в просвет тонкого кишечника и частично всасывается в кровь. Вклад в ее общую активность ЩФ невелик. Ее активность может быть увеличена у лиц с первой и третьей группой крови, особенно после приема пищи, при заболеваниях кишечника, сопровождающихся поносами.
5. **Почечная ЩФ** частично всасывается в кровь, но, в основном, экскретируется с мочой. Тест используется в диагностике заболеваний почек (гломерулонефрит, пиелонефрит, нефропатии).
6. **Плацентарная ЩФ** появляется в сыворотке крови при беременности. Самое большое ее содержание отмечается в третьем триместре.
7. **Неидентифицированный изофермент ЩФ** (так называемые изоферменты Regan или Nagao) опухолевого происхождения (наиболее часто определяются при раке легкого).

Кислая фосфотаза - под этим термином понимают все фосфотазы, имеющие оптимум активности при **pH ниже 7,0**.

Кислая фосфотаза – это *ферменты лизосом*, которые имеются во всех органах и тканях. Наибольшая активность КФ обнаруживается в предстательной железе, меньшая - в печени, селезенке, почках, костном мозге и в форменных элементах крови. Фермент обнаружен в женском молоке. У мужчин половину содержащейся в крови КФ составляют изоферменты предстательной железы, остальную часть - изоферменты печени и разрушающихся эритроцитов и тромбоцитов. У женщин КФ сыворотки попадает из печени и клеток крови.

Изоферменты предстательной железы отличаются от других изоферментов КФ субстратной специфичностью и действием на них ингибиторов. Так, они имеют большое сродство к п-нитрофенилфосфату, но и к п-нафтилфосфату, тимолфалеинфосфату и др. Активность простатических изоферментов ингибируют тартраты (соли винной кислоты), ионы фтора и железа. Например, присутствие тартрата калия в концентрации 0,02 ммоль/л ингибирует активность простатической КФ на 95%, что используется для ее идентификации.

Наиболее резко повышается активность КФ в сыворотке крови за счет простатических изоферментов при карциноме предстательной железы, особенно в стадии метастазирования. Повышенная активность общей и простатической КФ имеет место практически у 75% мужчин с опухолью простаты, причем активность может повыситься в 40-50 раз и практически вся активность ингибируется тартратом. Однако отсутствие увеличения активности КФ не отрицает наличия рака простаты, так как в случае ограничения опухоли только пределами простаты не происходит выхода фермента в кровь. Повышенная активность фермента в сыворотке крови при инфаркте простаты, в результате катетеризации мочевого пузыря, после оперативного вмешательства или биопсии предстательной железы. При простатитах, при доброкачественной гипертрофии простаты активность КФ не изменяется даже после манипуляций на

простате. Костные метастазы карциномы простаты приводят, как правило, к увеличению КФ и ЩФ, в то время, как костные заболевания сопровождаются повышением лишь ЩФ.

При использовании методов, неспецифичных для простатической КФ, увеличение общей активности фермента может быть следствием патологического разрушения клеток крови, болезни Педжета, метастатической поражения костей, миеломной болезни, гиперпаратиреозе с остеопорозом, апластической и гемолитической анемий. В этих случаях основным источником КФ являются остеокласты, КФ которых не подавляется тартратом. Эритроцитарная КФ подавляется формальдегидом и ионами Cu , к которым простатическая КФ резистентна. Тем не менее, если кровь взята без гемолиза и сыворотка быстро отделена от клеточной массы, влияние эритроцитарной КФ как правило несущественно.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЩФ В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ

Принцип метода Щелочная фосфатаза катализирует реакцию гидролиза п-нитрофенолфосфата с образованием эквимольного количества п-нитрофенола и фосфата. Скорость образования п-нитрофенола прямо пропорциональна активности щелочной фосфатазы и измеряется фотометрически при длине волны 405 нм.

Нормальные величины активности активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови человека составляют: для женщин – 64 - 306 Ед/л; для мужчин – 80 - 306 Ед/л.

Рекомендуется в каждой лаборатории установить свой диапазон нормальных величин.

Анализируемые пробы

Сыворотка крови без гемолиза. Сыворотку следует отделить от форменных элементов крови не позднее, чем через 1 час после забора крови.

Меры предосторожности при работе с набором

Реагенты R1 и R2 содержат азид натрия. Не допускать попадания на кожу и слизистые. Не пипетировать ртом; при проглатывании следует выпить 0,5 л теплой воды и вызвать рвоту. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

Оборудование, материалы и реагенты:

- спектрофотометр или фотоэлектроколориметр, длина волны 405 нм, кювета с длиной оптического пути 1 см;
- секундомер;
- пипетки, позволяющие отбирать объемы 25 и 1000 мкл;
- коническая колба вместимостью 100 мл;
- вода дистиллированная;
- 0,9% раствор NaCl (физиологический раствор).

Подготовка реагентов для анализа

Приготовление рабочего реагента: смешать в конической колбе вместимостью 100 мл 4

объема реагента R1 и 1 объем реагента R2. Тщательно закрыть флаконы с реагентами R1 и R2 непосредственно после каждого использования.

Рабочий реагент стабилен в течение 60 дней при хранении при температуре 2-8 °С.

Проведение анализа

Рабочий реагент: 1000 мкл

Пробирки с рабочим реагентом необходимо предварительно прогреть в течение 5 минут при 37 °С.

Проба 20 мкл

Перемешать, после 60 секунд инкубации при 37 °С измерить скорость изменения оптической

плотности за минуту ($\Delta ОП/мин$) в течение следующих 2 – 3 минут.

Расчеты

Активность щелочной фосфатазы определить по формуле:

$$A = \Delta ОП / мин * 2757, \text{ где}$$

А – активность щелочной фосфатазы, Ед/л;

ΔОП/мин – изменение оптической плотности пробы за одну минуту, ед. опт. пл.;

2757 – фактор пересчета для выражения активности щелочной фосфатазы в Ед/л (указывается в паспорте на набор)

Примечание: 1Ед/л x 0,0167 = мкКат/л

Выполнить задания в тетрадях для самостоятельной работы

Методы определения активности АЛТ и АСТ.

Аспаратаминотрансфераза (К.Ф.2.6.1.1. L-аспартат: 2-оксоглутарат-аминотрансфераза, АСТ или АсАТ или глутаматоксалоацетаттрансаминаза (ГОТ)).

Аланинаминотрансфераза (К.Ф.2.6.1.2. L-аланин: 2-оксоглутаратамино-трансфераза, АЛТ или АлАТ или глутаматпируваттрансаминаза (ГТП)).

Аминотрансферазы катализируют процессы трансаминирования (АСТ катализирует обратимый перенос аминогрупп с L-аспарагиновой кислоты на α-кетоглутаровую, а АЛТ катализирует обратимый перенос аминогрупп с L-аланина на α-кетоглутаровую кислоту). Трансаминирование играет ключевую роль в промежуточном обмене, так как обеспечивает синтез и разрушение отдельных аминокислот в организме. Три аминокислоты: глутаминовая, аспарагиновая и аланиновая - благодаря трансаминированию превращаются в соответствующие альфа-кетокислоты, являющиеся компонентами цикла трикарбоновых кислот. Окисляясь в нем, они служат источником энергии.

Простетической группой (или коферментом) обоих энзимов служит пиридоксальфосфат, осуществляющий перенос аминогруппы за счет способности образовывать пиридоксаминовые производные с аминокислотами.

Они распределены по всем органам и тканям. *АЛТ* - энзим цитоплазматический, *АСТ* имеет изоферменты, локализованные в цитозоле и митохондриях.

АЛТ в высоких концентрациях присутствует в клетках печени и в меньшей степени в скелетных мышцах, почках, сердце и эритроцитах. Активность АСТ в эритроцитах в 6 раз превышает таковую в сыворотке крови, что следует учитывать при анализировании гемолитической сыворотки. Повышение активности АЛТ наиболее часто отмечается при острых заболеваниях печени и желчных путей. Активность АЛТ резко повышается у больных острыми вирусными гепатитами в ранние сроки болезни: приблизительно у 50% больных она увеличивается за 5 дней до появления желтухи и гепатомегалии, у 90%

больных - за 2 дня до появления этих симптомов. Пик ферментативной активности опережает максимальный уровень билирубина в крови на 7-10 дней и совпадает с появлением желтухи, т.е. периодом максимальной тяжести болезни. В не осложнённых случаях уровень активности обоих ферментов снижается до нормальных значений к исходу 8 недели болезни примерно у 75-80% больных. У небольшой части больных после нормализации наблюдается второй пик повышения активности аминотрансфераз, это сопровождается клиническим рецидивом болезни. Длительное повышение активности аминотрансфераз или увеличение её в поздние сроки болезни может означать развитие печеночного некроза. Незначительное длительное увеличение ферментативной активности в части случаев свидетельствует о хронизации процесса (хронический гепатит, цирроз).

АСТ в высоких концентрациях присутствует в клетках сердечной и скелетных мышц, печени, почках и эритроцитах. Поражение любого из этих органов и тканей может привести к существенному повышению АСТ в сыворотке крови. Активность фермента в эритроцитах незначительна и составляет, поэтому слабый гемолиз существенно не влияет на величину активности фермента сыворотки. Наиболее резкие изменения АСТ наблюдаются при поражении сердечной мышцы. Повышение активности АСТ и ЛДГ наблюдается при таких формах инфаркта миокарда, которые не диагностируются электрокардиографически. При остром инфаркте её активность АСТ повышается у 93-98% больных и является достоверным диагностическим тестом, также повышение имеет такую же динамику, как и КК-МВ, но степень увеличения активности АСТ несколько меньшая, чем у КК и ЛДГ. Отношение показателей активности КК/АСТ имеет высокую диагностическую значимость при дифференциальной диагностике инфаркта миокарда и поражения скелетных мышц: отношение КК/АСТ около 27 (13-56) свидетельствует о поражении скелетной мускулатуры, около 5 (2-9) – о патологии кардиомиоцитов. Увеличение активности обычно начинается через 6-12 ч, затем после возникновения инфаркта миокарда, достигает максимума 24-48 ч, затем постепенно падает, возвращаясь к норме через 4-5 дней. Считается, что между размерами очага инфаркта и активностью АСТ в сыворотке имеет зависимость: некроз площадью 1,5x1,5 см даёт существенное повышение активности АСТ в сыворотке. Если в течение нескольких дней не происходит нормализация активности фермента, это свидетельствует о расширении зоны инфаркта.

Причины повышения АСТ в сыворотке крови.

Артефактные	<input type="checkbox"/> Гемолиз эритроцитов <input type="checkbox"/> Существенная задержка отделения эритроцитов от сыворотки
Физиологические	<input type="checkbox"/> У новорождённых активность примерно в 1,5 раза выше, чем у взрослых

Значительное повышение	<input type="checkbox"/> Недостаточность кровообращения при шоке и гипоксии <input type="checkbox"/> Инфаркт миокарда <input type="checkbox"/> Острый вирусный или токсический гепатит
Умеренное повышение	<input type="checkbox"/> Цирроз печени (может быть нормальным или повышен в 2-3 раза) <input type="checkbox"/> Механическая желтуха <input type="checkbox"/> Метастазы опухоли в печень <input type="checkbox"/> Поражение скелетной мускулатуры (прогрессирующая мышечная дистрофия, разможение мышц) <input type="checkbox"/> После травмы или оперативного вмешательства <input type="checkbox"/> Выраженный внутрисосудистый гемолиз <input type="checkbox"/> Панкреатит <input type="checkbox"/> Дерматомиозит

Отношение АСТ/АЛТ называется коэффициентом Де Ритис. В норме он составляет 0,6-0,8. При вирусных гепатитах его значение варьируют от 0,2-0,5. В разгар болезни, при высоких значениях активности того или другого фермента, коэффициент Де Ритис может резко подняться до 1,0 и выше. Это плохой прогностический признак, свидетельствующий о наступлении дистрофии печени. Значение коэффициента Де Ритис выше 1,0 часто наблюдается при обтурационных желтухах, холециститах, гепатохолециститах, циррозах, когда абсолютные значения активности АСТ и АЛТ невелики. При хронических заболеваниях, особенно пожилom возрасте он, как правило, выше единицы.

Принцип метода

L-аланин + α-кетоглутарат ← АЛТ → пируват + L-глутамат

Количество образовавшегося в ходе ферментативной реакции пирувата определяется на основе его реакции с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ), результатом которой является окрашенный комплекс, имеющий максимум поглощения при длине волны 537 нм

Анализируемые пробы

Сыворотка крови без гемолиза. Сыворотку следует отделить от форменных элементов крови не позднее, чем через 1 час после забора крови. Исследование должно быть проведено в день забора образца, так как активность АЛТ снижается независимо от температуры хранения.

Оборудование, материалы и реагенты:

- спектрофотометр или фотоэлектроколориметр, длина волны 405 нм, кювета с длиной оптического пути 1 см;
- секундомер;
- пипетки, позволяющие отбирать объемы 25 и 1000 мкл;
- коническая колба вместимостью 100 мл;
- вода дистиллированная;
- Буфер, рН 7,5 при 37°C
- Раствор НАДН:

Подготовка реагентов для анализа:

Смешать буфер и раствор НАДН в соотношении 9:1. Рабочий реагент стабилен не менее 21 дня при температуре хранения 2-8°C в герметично закрытом флаконе.

Проведение анализа

Непосредственно перед проведением анализа нагреть рабочий реагент до 37°C.

$\lambda = 340$ нм. $d = 1$ см. Температура измерения 37°C. Измерение против воздуха.

	Внести в кювету Макроанализ, мл	Полумикроанализ, мл
--	--	----------------------------

Рабочий реагент	2,0	1,0
0,5		

Сыворотка крови 0,2 0,1
0,05

Смешать и инкубировать при 37°C в течение 1 минуты. Измерить ΔЕ/мин в течение 3-х минут.

Вычислить среднее значение ΔЕ/мин. Если значение ΔЕ/мин превышает величину 0,110 А/

мин развести исследуемый образец физиологическим раствором, повторить анализ, а результат умножить на степень разведения.

Расчеты

$ME/л = 1746 \times \Delta E/мин.$

Референтные пределы:

Мужчины до 40 ME/л

Женщины до 31 ME/л

Клинико-диагностическое значение

Значительное повышение активности АЛТ (в два раза выше нормы и более) развивается при некрозе печеночных клеток любого происхождения, тяжелом шоке, правосердечной недостаточности, острой аноксии, обширной травме печени. Подъем активности имеет место также при циррозе печени, механической желтухе, опухоли печени, обширном инфаркте миокарда, миокардите, миозите, мышечной дистрофии. Иногда активность увеличивается при гемолитической болезни, преэклампсии, умеренной мышечной травме, жировой печени, хроническом алкоголизме, тяжелых ожогах, выраженном панкреатите.

Значительное повышение активности АСТ развивается при гепатитах вирусного происхождения. Подъем активности имеет место также при некрозе клеток печени или их повреждении любой этиологии, включая холестатическую и обструктивную желтуху, хронические гепатиты, лекарственное повреждение печени, алкогольный гепатит (обычно АСТ более АЛТ), вирусные и хронические гепатиты (АЛТ более АСТ в большинстве случаев, плохой прогноз при АСТ более АЛТ); метастазах в печень и гепатомах, инфекционном мононуклеозе, некрозе или травме сердечной или скелетной мышцы, воспалительных заболеваниях скелетной или сердечной

мышцы, после острого инфаркта миокарда (АСТ более АЛТ), тяжелой физической нагрузке, сердечной недостаточности, тяжелых ожогах, тепловом ударе, гипотиреозе (40—90% случаев), обструкции кишечника, молочнокислом ацидозе, злокачественной гипотермии, посткомиссуротомном синдроме, ревматической полимиалгии, тифоидной лихорадке, большой талассемии, токсическом шоке.

Выполнить задания в тетрадах для самостоятельной работы

Определение активности гаммаглутамилтрансферазы (ГГТФ) в сыворотке крови.

Гамма-глутамилтрансфераза (К.Ф.2.3.2.2. γ -глутамилтранспептидаза) катализирует перенос γ -глутамильного остатка глутаминовой кислоты на акцепторный пептид или L-аминокислоту. Гамма-глутамилтрансфераза – мембраносвязанный фермент, который встречается во многих органах, однако, наибольшая его удельная активность обнаруживается в почках, печени, поджелудочной железе, селезенке и тонком кишечнике. В ткани простаты высокое содержание ГГТ, поэтому у мужчин в норме активность ГГТ примерно на 50% выше, чем у женщин. Фермент предпочтительно расположен на клеточной мембране и может выполнять функцию переносчика аминокислот и пептидов в клетки.

Как фермент холестаза при механической желтухе, холангите, холецистите ГГТ повышается раньше и удерживается повышенным дольше, чем ЩФ. Самые высокие цифры сывороточной активности ГГТ отмечаются при алкогольном поражении печени. Тест используется в наркологии для оценки эффективности лечебных мероприятий по выведению больного из алкогольного делирия.

Активность ГГТ увеличивается при остром инфаркте миокарда, пик её достигается примерно к 10 дню и сохраняется повышенной около месяца. Незначительный подъём наблюдается при острых панкреатитах. Опухоли головки поджелудочной железы дают значительное увеличение ГГТ, но это связано с явлениями холестаза. На активность ГГТ в сыворотке крови большое влияние оказывают сопутствующие заболевания. Например, сочетание вирусного гепатита и сахарного диабета дает резкое увеличение активности.

Причины повышения ГГТ в сыворотке крови

Превышение нормы более 10 раз	<ul style="list-style-type: none">• Алкогольное поражение печени• Холестаз
-------------------------------	---

Превышение нормы в 5-10 раз	<ul style="list-style-type: none"> • Гепатит (острый и хронический) • Цирроз печени (без холестаза) • Другие заболевания печени
Превышение нормы менее 5 раз	<ul style="list-style-type: none"> • Алкоголизм • Ятрогенные отравления (фенобарбитал,

Принцип метода

Гамма-глутамилтрансфераза катализирует реакцию переноса глутаминовой кислоты на акцепторы, подобные глицин-глицину с образованием 5-амино-2-нитро-бензоата, скорость образования которого прямо пропорциональна активности гамма-глутамилтрансферазы и измеряется фотометрически при длине волны 405 нм.

Нормальные величины активности гама-глутамилтрансферазы составляют в сыворотке и плазме крови от 5 до 50 Е/л.

Анализируемые пробы

Сыворотка и гепаринизированная или ЭДТА плазма крови.

Меры предосторожности при работе с набором

Меры предосторожности – соблюдение "Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР" (Москва, 1981 г.).

При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

Оборудование, материалы и реагенты:

- Спектрофотометр, программируемый фотометр или биохимический анализатор, длина волны 405 нм, термостатируемая кювета с длиной оптического пути 1,0 см;

- секундомер;

- цилиндр мерный вместимостью 10 мл;

- вода дистиллированная;

- 0,9% раствор натрия хлористого (физиологический раствор);
- перчатки резиновые или пластиковые.

Подготовка реагентов для анализа

Приготовление раствора реагента

К содержимому одного флакона с Реагентом добавить 10 мл дистиллированной воды, растворить при перемешивании.

Раствор реагента можно хранить при температуре (2-8)° С в темном месте в плотно закрытом флаконе не более 10 суток или при комнатной температуре (18-25)° С не более 2 суток.

Проведение анализа

Перед проведением анализа раствор реагента следует выдержать при температуре (37 ± 1)° С в течение 5 мин.

Компоненты и анализируемые пробы отмерить в количествах, указанных в таблице.

Таблица

Отмерить, мл	<i>Опытная проба</i>
Раствор реагента	1,0
Сыворотка (плазма) крови	0,05

Примечание. При использовании кюветы меньшего объема расход реагента может быть уменьшен при сохранении указанных выше соотношений.

Перемешать, инкубировать при температуре (37 ± 1)° С в течение 1 мин. Измерить оптическую плотность пробы (*E*) против воздуха при длине волны 405 нм в кювете с длиной оптического пути 1,0 см. Измерение оптической плотности повторить с интервалом 1 мин в течение 3 мин.

Расчеты

Рассчитать среднее значение $\Delta E/\text{мин}$.

Определить активность ГГТ по формуле:

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

где А - активность гамма-глутамилтрансферазы, Е/л;

$\Delta E / \text{мин}$ - изменение оптической плотности пробы за одну минуту, ед. опт. плотн.;

F - фактор пересчета для выражения активности гамма-глутамилтрансферазы,

Е/л (указывается в паспорте на набор).

Примечание. 1 Е/л = 16,67 нмоль/л/(с × л)

При активности гамма-глутамилтрансферазы выше 250 Е/л пробу следует развести физиологическим раствором и полученный результат умножить на разведение.

Выполнить задания в тетрадях для самостоятельной работы

Определение активности креатинкиназы (КК) в сыворотке крови.

Креатинкиназа или ***креатинфосфокиназа*** (К.Ф. 2.7.3.2.) катализирует

обратимую реакцию фосфорилирования креатина. КК является димером, состоящим из двух субъединиц: В (brain - мозговая) и М (muscle - мышечная).

Креатинкиназа образует три изофермента: КК-ВВ (КК-1) - мозговой, КК-МВ (КК-2) - сердечный, КК-ММ (КК-3) - мышечный.

КК-ВВ присутствует в значительных количествах в мозге, простате, желудке, легких, мочевом пузыре, уретре, плаценте, щитовидной железе. КК-МВ в основном находится в сердечной мышце и в небольшом количестве в скелетных мышцах. КК-ММ присутствует в основном в клетках скелетных и сердечной мышц. Активность КК-ММ в сыворотке крови составляет 94-96% от общей активности КК, КК-МВ - 4-6%, КК-ВВ - следы или не определяется. Все три изофермента обнаружены в цитозоле клеток или связаны с миофибриллами.

Общая КК повышается при многих заболеваниях: травмы, операции, инфаркт миокарда, уменьшение кровоснабжения мышц, миопатии, дерматомиозит, мышечные дистрофии, миокардиты, отравления, сопровождающиеся комой, гипотиреоз, инфекционные болезни (брюшной тиф). Иногда небольшое увеличение отмечается при артритах, застойной сердечной недостаточности, тахикардии, эмболии легочной артерии.

Креатинкиназа сердечной мышцы содержит значительно больше изофермента КК-МВ (примерно 30%), чем скелетные мышцы (менее 1%). При инфаркте миокарда регистрируемое повышение активности КК наблюдается в первые 3-6 ч после ангинозного приступа. Однако, определение ее активности ранее 8 ч дает положительные результаты в 31% случаев. Активность КК является достоверным тестом инфаркта миокарда, начиная с 8-10 ч после начала болевого приступа. Максимальный уровень ее достигается в течение 24 ч и даже при обширном инфаркте активность КК может возвратиться к норме в течение последующих 48 ч. Относительное повышение активности КК при инфаркте миокарда выше, чем других ферментов. Наиболее информативно исследование активности КК в динамике - каждые 4-6 ч в течение суток. При инфаркте миокарда значительно увеличивается КК-МВ. Помимо инфаркта миокарда КК-МВ может возрастать при миокардитах, стенокардии, затяжной аритмии, шоке, тяжелых отравлениях.

КК-ВВ в сыворотке крови незначительно повышается при некоторых формах рака (легкого, кишечника, мочевого пузыря, предстательной железы), травме сердечной мышцы, заболеваниях соединительной ткани. При родах КК-ВВ может увеличиваться в сыворотке до 6 раз (источниками являются плацента и матка). У новорожденных при родовой травме мозга повышена активность КК-ВВ в сыворотке.

Активность КК в сыворотке, как правило, имеет обратную зависимость с тиреоидной функцией щитовидной железы. Около 60% больных гипотиреозом имеют уровень КК выше нормы с превышением верхней границы в среднем в 5 раз. В то же время у больных с гипертиреозом имеется тенденция к низким значениям активности КК в сыворотке.

Причины повышения активности креатинкиназы плазмы

Превышение верхнего предела нормы более чем в 10	• Инфаркт миокарда
--	--------------------

Превышение верхнего предела нормы в 5-10 раз	<ul style="list-style-type: none"> • Последствия хирургического вмешательства • Травма скелетных мышц
Превышение верхнего предела нормы менее чем в 5	<ul style="list-style-type: none"> • Физиологическое (у новорожденных)

Принцип метода Фермент креатинкиназа (аденозин трифосфат: креатинин N-фосфотрансфераза; КК) катализирует превращение креатининфосфата и АДФ в креатин и АТФ. АТФ и глюкоза под действием гексокиназы превращаются в глюкозо-6-фосфат и АДФ. Глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа окисляет глюкозо-6-фосфат в 6-фосфоглюконат, при этом NADP восстанавливается в NADPH. Скорость превращения NADP в NADPH, измеренная при 340 нм, пропорциональна активности КК. N-ацетилцистеин (НАС) добавлен как активатор КК.

Нормальные величины активности общей креатинкиназы в сыворотке крови человека составляют у мужчин: 24 – 204 Ед/л, у женщин 24 – 173 Ед/л.

Рекомендуется в каждой лаборатории установить свой диапазон нормальных величин.

Анализируемые пробы

Сыворотка крови без гемолиза. Сыворотку следует отделить от форменных элементов крови

не позднее, чем через 1 час после забора крови. Активность КК в сыворотке не стабильна и

быстро уменьшается при хранении. КК инактивируется как от воздействия света, так и от

увеличения рН вследствие потери оксида углерода.

Меры предосторожности при работе с набором

Реагенты R1 и R2 содержат имидазол. Не допускать попадания на кожу и слизистые. Не пипетировать ртом; при проглатывании следует выпить 0,5 л теплой воды и вызвать рвоту.

При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

Оборудование, материалы и реагенты:

- спектрофотометр или фотоэлектроколориметр, длина волны 340 нм, кювета с длиной оптического пути 1 см;
- секундомер;
- пипетки, позволяющие отбирать объемы 40 и 1000 мкл;
- коническая колба вместимостью 100 мл;
- вода дистиллированная;
- 0,9% раствор NaCl (физиологический раствор).

Подготовка реагентов для анализа

Приготовление рабочего реагента: смешать в конической колбе, вместимостью 100 мл, 4

объема реагента R1 и 1 объем реагента R2. Тщательно закрыть флаконы с реагентами R1 и R2 непосредственно после каждого использования.

Рабочий реагент стабилен в течение 30 дней при хранении в защищенном от света месте при

температуре 2-8 °С.

Проведение анализа

Рабочий реагент: 1000 мкл

Пробирки с рабочим реагентом необходимо предварительно прогреть в течение 5 минут при

37 °С.

Проба 40 мкл

Смешайте и инкубируйте в течение 60 секунд при 37 оС, затем измерьте оптическую плотность 3 раза с интервалом в 1 минуту. Рассчитайте изменение оптической плотности за 1

минуту ($\Delta ОП/мин$)

Расчеты

Активность общей креатинкиназы определить по формуле:

$$A = \Delta ОП / мин * 4127 , где$$

A – активность общей креатинкиназы, Ед/л;

$\Delta ОП/мин$ – изменение оптической плотности пробы за одну минуту, ед. опт. пл.;

4127 – фактор пересчета для выражения активности общей креатинкиназы в Ед/л (указывается в паспорте на набор)

Примечание: 1Ед/л x 0,0167 = мкКат/л

Если $\Delta ОП/мин$ больше или равно 0,250, разведите образец 1+9 физиологическим раствором

для повторного разведения, а результат умножьте на 10.

Выполнить задания в тетрадях для самостоятельной работы

Определение активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в сыворотке крови.

Лактатдегидрогеназа (К.Ф. 1.1.1.27) катализирует обратимое восстановление пировиноградной кислоты в молочную кислоту.

ЛДГ состоит из двух субъединиц - М (muscle - мышечная) и Н (heart - сердечная). В сыворотке присутствует 5 изоферментов, различающиеся составом субъединиц. В порядке снижения их форетической подвижности к аноду их обозначают как ЛДГ-1 (НННН; Н₄), ЛДГ-2 (НННМ; Н₃М), ЛДГ-3 (ННММ; Н₂М₂), ЛДГ-4 (НМММ; Н₁М₃), ЛДГ-5 (ММММ; М₄).

ЛДГ присутствует во всех клетках организма, это цитозольный фермент. В печени, сердце, почках, скелетной мышце и эритроцитах активность ЛДГ более чем в 500 раз выше, чем в сыворотке, поэтому повреждение любого из этих органов сопровождается увеличением ЛДГ в сыворотке. Значительное

увеличение сывороточной активности ЛДГ наблюдается при мегалобластной и пернициозной анемиях, обширном карциноматозе, вирусных гепатитах, шоке, гипоксии. Циррозы, обтурационные желтухи, различные заболевания почек и скелетных мышц, застойная сердечная недостаточность дают средние цифры активности. Незначительное повышение фермента отмечается при любых повреждениях клеток, сопровождающихся увеличением проницаемости мембран, инфаркте миокарда и легкого, лейкозах, гемолитических анемиях, хронических гепатитах, лимфомах. Таким образом, общая активность ЛДГ в сыворотке крови не является специфическим тестом для определенной патологии. Необходимо разделять изоферменты ЛДГ и, затем оценивать вклад каждого в общую активность, т.к. они органоспецифичны.

ЛДГ-1 присутствует в высоких концентрациях в сердце, почках, мозге, много ЛДГ-1 в эритроцитах. Поэтому недопустим гемолиз при определении активности ЛДГ. По разным данным содержание ЛДГ-1 в сыворотке крови в норме составляет 19-25% общей активности ЛДГ.

При диагностике инфаркта миокарда увеличение активности ЛДГ является достоверным тестом в сроки от 12 до 32 часов после болевого приступа. Она остается повышенной в течение 8-14 дней. Однократное исследование ЛДГ-1 обладает клинической специфичностью в отношении инфаркта миокарда в 66% случаев, а определение ее в динамике (через каждые 4-6 часов в течение суток) в 86%. Если в сроки от 8 до 24 часов после приступа ангинозных болей нет нарастания активности ЛДГ (а также, КК-МВ и АСТ), то нет и инфаркта. Наблюдается зависимость между уровнем ЛДГ и обширностью инфаркта. В некоторых случаях дополнительную информацию дает коэффициент *ЛДГ-1/ЛДГ-2*, который в норме составляет 0,6-0,7. При остром инфаркте миокарда он становится выше 1,0 и возвращается к норме через 2-3 недели.

В норме ЛДГ-2 составляет 23-37%, ЛДГ-3 17-25%, ЛДГ-4 8-17% от общей сывороточной активности ЛДГ. Активность этих изоферментов повышается при массивном разрушении тромбоцитов (эмболия легочной артерии, массивные гемотрансфузии) и вовлечении в патологический процесс лимфатической системы. При нелимфоцитарных лейкозах увеличивается активность ЛДГ-3 и ЛДГ-4, причем степень увеличения зависит от количества незрелых клеток. Увеличение ЛДГ-3 иногда наблюдается при острых панкреатитах.

Содержание ЛДГ-5 в сыворотке крови в норме составляет 8-18% от общей активности. Наиболее богаты им скелетные мышцы, печень, кожа, слизистые оболочки, а также клетки некоторых злокачественных опухолей. Значительное увеличение содержания ЛДГ-5 отмечается при травмах, воспалительных и

дегенеративных заболеваниях мышц и многих болезнях печени (гепатиты, циррозы и др.). Онкологические заболевания (лимфолейкозы) могут сопровождаться увеличением ЛДГ-5.

Принцип метода Фермент лактатдегидрогеназа (ЕС 1.1.1.27. L-лактат: НАД⁺ оксидоредуктаза; ЛДГ) катализирует превращение пирувата в лактат в присутствии НАДН, который переходит в НАД⁺. Скорость превращения НАДН в НАД⁺, измеренная при 340 нм, пропорциональна активности ЛДГ.

Нормальные величины активности активности лактатдегидрогеназы в сыворотке крови человека составляют 225 – 450 Ед/л.

Рекомендуется в каждой лаборатории установить свой диапазон нормальных величин.

Анализируемые пробы

Сыворотка крови без гемолиза. Плазма с гепарином или ЭДТА. Сыворотку и плазму следует

отделить от форменных элементов крови не позднее, чем через 1 час после забора крови.

Меры предосторожности при работе с набором

Реагенты R1 и R2 содержат азид натрия. Не допускать попадания на кожу и слизистые. Не пипетировать ртом; при проглатывании следует выпить 0,5 л теплой воды и вызвать рвоту. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

Оборудование, материалы и реагенты:

- спектрофотометр или фотоэлектроколориметр, длина волны 340 нм, кювета с длиной оптического пути 1 см;
- секундомер;
- пипетки, позволяющие отбирать объемы 10 и 1000 мкл;
- коническая колба вместимостью 100 мл;

- вода дистиллированная;
- 0,9% раствор NaCl (физиологический раствор).

Подготовка реагентов для анализа

Приготовление рабочего реагента: смешать в конической колбе, вместимостью 100 мл, 4 объема реагента R1 и 1 объем реагента R2. Тщательно закрыть флаконы с реагентами R1 и R2 непосредственно после каждого использования.

Рабочий реагент стабилен в течение 30 дней при хранении в защищенном от света месте при температуре 2-8 °С.

Проведение анализа

Рабочий реагент: 1000 мкл

Пробирки с рабочим реагентом необходимо предварительно прогреть в течение 5 минут при 37 °С.

Проба 40 мкл

Смешайте и инкубируйте в течение 60 секунд при 37 °С, затем измерьте оптическую плотность 3 раза с интервалом в 1 минуту. Рассчитайте изменение оптической плотности за 1

минуту ($\Delta OP / \text{мин}$)

Расчеты

Активность лактатдегидрогеназы определить по формуле:

$$A = \Delta OP / \text{мин} * 16030, \text{ где}$$

A – активность лактатдегидрогеназы, Ед/л;

$\Delta OP / \text{мин}$ – изменение оптической плотности пробы за одну минуту, ед. оп. пл.;

16030 – фактор пересчета для выражения активности лактатдегидрогеназы в Ед/л (указывается в паспорте на набор)

Примечание: 1Ед/л x 0,0167 = мкКат/л

Выполнить задания в тетрадях для самостоятельной работы

ЛИТЕРАТУРА.

1. Практика лабораторных биохимических исследований: учебное пособие. Пустовалова Л.М. – Ростов н/Д.: Феникс, 2014
2. Теория лабораторных биохимических исследований (основы биохимии): учебное пособие. Пустовалова Л.М. – Ростов н/Д.: Феникс, 2014
3. Теория и практика лабораторных биохимических исследований учебник/Н.В.Любимова,И.В.Бабкина,Ю.С.Тимофеев-М.:ГЭОТАР-Медиа,2020.416с.:ил.

Задания для самоконтроля

Ответить на вопросы:

- Что такое ферменты?
- В чем сходство ферментов и неорганических катализаторов?
- Чем сложный фермент отличается от простого фермента?
- Что такое кофактор фермента?
- Чем коферменты отличаются от простетических групп? Приведите примеры.
- Дайте понятие об активном центре фермента. Строение активного центра простых и сложных ферментов.
- Что такое специфичность ферментов? Какие виды специфичности ферментов Вы знаете? Чем обусловлена специфичность ферментов?
- Какова зависимость активности фермента от температуры?
- Как активность фермента зависит от pH среды?
- Дайте понятие об энергии активации. Как ферменты влияют на нее?

- Какова зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата?
- Что такое максимальная скорость ферментативной реакции?
- Что такое константа Михаэлиса? Что она характеризует?
- Какова зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации фермента?
- Как измерить активность фермента? В каких единицах выражается активность фермента?
- Дайте понятие об изоферментах.
- Назовите основные отличия изоферментов друг от друга.
- Какое значение имеют изоферменты в медицине?
- Дайте понятие об активаторах и ингибиторах ферментов.
- Дайте сравнительную характеристику обратимого и необратимого ингибирования.
- Приведите примеры необратимых ингибиторов. Имеют ли они физиологическое значение?
- Что такое конкурентное ингибирование?
- Дайте понятие о неконкурентных ингибиторах и механизме их действия.
- Приведите примеры конкурентных ингибиторов.
- Что такое аллостерический центр фермента. Механизм аллостерического изменения активности фермента.
- Какие вещества могут выступать в роли аллостерических регуляторов?
- По какому принципу классифицируются ферменты? Дайте характеристику каждому классу.
- Что такое энзимопатии?

Тестовые задания по разделу ферменты:

1. Ферменты-это:

- А. катализаторы
- Б. витамины
- В. регуляторы
- Г. рецепторы

2. Ферменты по химической природе-это:

- А. углеводы
- Б. липиды
- В. белки
- Г. нуклеиновые кислоты

3. Коферменты-это

- А. группа ферментов с одинаковой активностью
- Б. ферменты одного цикла
- В. низкомолекулярные органические вещества (часто производные водорастворимых витаминов), необходимые для работы ферментов
- Г. всё перечисленное

4. Значение ферментов для медицины заключается в:

- А. их участии в патогенезе заболевания
- Б. использовании их в диагностике
- В. возможности применения ферментов и их ингибиторов как лекарств
- Г. всё перечисленное

5. Простой фермент состоит из

- А. аминокислот
- Б. аминокислот и ионов металлов
- В. аминокислот и витаминов
- Г. аминокислот и липидов

6. Сложный фермент состоит из:

- А. аминокислот
- Б. аминокислот и кофакторов
- В. глюкозы и ионов металлов
- Г. нуклеотидов

7. Участок молекулы фермента ,обеспечивающий его взаимодействие с субстратом называется:

- А. кофермент
- Б. протетическая группа
- В. апофермент
- Г. активный центр

8. К оптимальным условиям протекания ферментативной реакции не относится

- а) наличие ингибитора, отсутствие активатора
- б) температура 37°C, насыщенность фермента субстратом
- в) соответствующая рН среды, время

г) наличие активатора и отсутствие ингибитора

9. Активность АЛТ в сыворотке крови увеличивается при желтухе

а) механической

б) паренхиматозной

в) гемолитической

г) всё перечисленное

10. АЛТ и АСТ катализируют реакции

а) гидролиза

б) переноса аминогрупп

в) внутримолекулярных превращений

г) синтеза

11. При холестазах наиболее информативно определение

а) креатинкиназы

б) аминотрансферазы

в) ЩФ

г) ЛДГ

12. Активность ферментов, выраженная в международных единицах – это

а) моль/час/л

б) моль/сек/дл

в) мкмоль/мин/л

г) мкмоль/час/л

Примерные ситуационные задачи

Задача 1

Пациенту назначено исследование ферментов: АлТ, АсТ, ЛДГ, кислой фосфатазы (КФ). Сыворотка оказалась гемолизированной.

Задания:

1. Дайте общую характеристику ферментов.
2. Расскажите особенности подготовки биологического материала для ферментативных исследований.
3. Перечислите источники аналитических ошибок при определении активности ферментов и сделайте вывод о пригодности данной сыворотки для исследований.
4. Расскажите принцип определения АлТ методом Райтмана - Френкеля по конечной точке.

Задача 2

В инструкции к биохимическому набору для определения ЛДГ указано, что линейность метода сохраняется до 1200 У/л. Определяемая вами активность ЛДГ превышает эту величину.

Задания:

1. Дайте характеристику лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и её изоферментов.
2. Расскажите о клинико-диагностическом значении определения ЛДГ и её изоферментов.
3. Дайте понятие термину «линейность».
4. Объясните, что надо предпринять, если активность измеряемого образца превышает параметры линейности.

Задача 3

В инструкции к набору реактивов для определения лактатдегидрогеназы (ЛДГ) кинетическим методом указано, что калибровочный коэффициент для длины волны 340 нм равен 16030. При фотометрировании получены показатели экстинкции:

Е начальная - 0,278

Е на 1-й минуте - 0,253

Е на 2-й минуте - 0,228

Е на 3-й минуте - 0,203

Задания:

1. Расскажите принцип метода определения ЛДГ кинетически.

2. Объясните, какой тест положен в основу определения многих ферментов кинетическим методом.
3. Рассчитайте активность ЛДГ.
4. Оцените результат исследования, применяя терминологию.

Практическое занятие №25-26: Основные понятия свертывающей системы. Компоненты системы гемостаза. Лабораторные тесты для оценки свертывающей системы.

Формируемые профессиональные компетенции 2.1, 2.2, 2.3.

Учебные цели (знать, уметь, иметь практический опыт):

Знать	Уметь	Владеть навыками
1-8,14-18	1-12,15-19	1-9

Воспитательная цель Привитие умений и навыков учебной работы и коллективного труда. Формирование целостного миропонимания и современного научного мировоззрения, основанного на признании приоритетов общечеловеческих ценностей: гуманности, милосердия, сострадания, уважения к жизни и здоровью человека.

Развивающая цель Формирование навыков самообразования, самореализации личности и развитие речи, мышления, памяти .

Межпредметные связи ОПД. 03 Химия, ОПД. 16 Физико-химические методы исследования и техника лабораторных работ, ОПД . 02 Анатомия.

Вопросы для подготовки к занятию

1. Основные правила техники безопасности при работе в лаборатории.

2. Что такое система гемостаза
3. Компоненты системы гемостаза.
4. Сосудисто-тромбоцитарный гемостаз
5. Вторичный плазменный гемостаз
6. Функции эндотелия и тромбоцитов.
7. Плазменные факторы свертывания
8. Основные этапы каскадного гемостаза
9. Методы исследования системы гемостаза

Список понятий для усвоения темы

Гемостаз, простаглицлин, тромбомодулин, каскадный гемостаз, адгезия, агрегация, ати тромбин III, протеины C и S, плазминоген.

1. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ.

Понятие о системе гемостаза

Гемостаз - это система различных компонентов организма, которая

постоянно поддерживает структурную целостность сосуда, сохраняет жидкое состояние крови и ее способность к свертыванию в случае повреждения сосудов.

В норме состояние системы гемостаза зависит от равновесия и взаимодействия ее 3 основных компонентов:

1. Стенка кровеносных сосудов (в первую очередь, эндотелий и коллаген), а также ряд веществ, синтезируемых в интиме (сосудистый компонент).
2. Клетки крови - главным образом, тромбоциты и их факторы, а также лейкоциты и эритроциты (клеточный компонент).
3. Плазменный компонент гемостаза, который в свою очередь включает:

- а) коагуляционное звено (плазменные факторы свертывания)
- б) антикоагулянтное звено (система антитромбина III)
- в) фибринолитическое звено
- г) калликреин-кининовое звено

В целом система гемостаза подчинена сложной нейрогуморальной регуляции с механизмом прямой и обратной связи, вследствие чего постоянно поддерживается клеточный гомеостаз.

В зависимости от компонентов и механизмов, участвующих в остановке кровотечения, система гемостаза делится на 2 :

1. Первичный, или сосудисто-тромбоцитарный гемостаз.
2. Вторичный гемостаз, в котором участвуют плазменные факторы свертывания и тромбоцитарный фактор 3. Длится 5-10 минут и заканчивается образованием фибрина, скрепляющего тромбоцитарный сгусток.

Первичный (сосудисто-тромбоцитарный, микроциркуляторный) гемостаз.

Он начинает все реакции гемостаза в капиллярах, венозных и артериальных сосудах до 100 мкм в диаметре. При травмах и повреждениях в реакцию остановки кровотечения первыми включаются кровеносные сосуды и тромбоциты.

Функция эндотелия. В нормальных условиях эндотелий кровеносных сосудов обладает высокой тромборезистентностью и играет важную роль в поддержании жидкого состояния крови и предупреждении тромбозов. Это свойство эндотелия обеспечивается следующим:

- контактной инертностью внутренней, обращенной в просвет сосуда, поверхности этих клеток, в силу чего она не активирует системы гемостаза;
- синтезом мощного ингибитора агрегации тромбоцитов - простагландина I_2 или простациклина;
- наличием на цитоплазматической мембране эндотелиальных клеток особого гликопротеина - *тромбомодулина*, связывающего тромбин, благодаря чему последний утрачивает способность вызывать свертывание крови, но сохраняет активирующее действие на систему двух важнейших антикоагулянтов - протеинов С и S;

- высоким содержанием на внутренней поверхности кровеносных сосудов мукополисахаридов и фиксацией на эндотелии комплекса "гепарин-антитромбин III";
- способностью стимулировать фибринолиз путем синтеза и секреции тканевого активатора пламиногена (ТПА), а также через систему "протеины C+S";
- элиминацией из крови активированных факторов свертывания крови и их метаболитов.

Вместе с тем, эндотелий обладает уникальной способностью менять свой антитромботический потенциал на тромбогенный. Такая трансформация происходит при застое крови, гипоксии, повреждении стенок сосудов физическими и химическими агентами, под влиянием экзо- и эндотоксинов, среди которых главенствующую роль играют бактериальные эндотоксины, иммунные комплексы, антиэндотелиальные и антифосфолипидные антитела, медиаторы воспаления (интерлейкины, фактор некроза опухоли и др.), а также клеточные и плазменные протеазы (эластаза, трипсин, тромбин и др.). Такая же трансформация наблюдается и при метаболических изменениях сосудистой стенки (атеросклероз, диабетическая ангиопатия).

Свойства субэндотелия. При гибели эндотелиальных клеток обнажается субэндотелий, содержащий большое количество коллагена, в контакте с которым происходят активация, адгезия и распластывание тромбоцитов, а также активация системы свертывания крови. Этот процесс реализуется при участии крупномолекулярных гликопротеинов, в первую очередь, фактора Виллебранда, фибронектина и фибриногена. Важная роль указанного механизма подтверждается тем, что при генетически обусловленных дефектах субэндотелия - истончении и обеднении его коллагеном (болезнь Рендю-Ослера, мезенхимальные дисплазии), как и при дефиците фактора Виллебранда, наблюдаются профузные и длительные кровотечения из поврежденных микрососудов.

Структура и функция тромбоцитов

В состоянии покоя тромбоцит представляет собой дискообразную клетку с гладкой цитоплазматической мембраной, поддерживаемой микротубулиновым кольцом. В цитоплазме неактивированных тромбоцитов можно обнаружить 4 вида гранул: α-гранулы, плотные гранулы, лизосомы и пероксисомы. Наиболее многочисленные α-гранулы содержат тромбоцитоспецифические и тромбоцитонеспецифические пептиды, участвующие в механизмах коагуляции, воспаления, иммунитета и

репарации и модулирующие эти процессы. Плотные гранулы, названные так сообразно их внешнему виду под электронным микроскопом, представляют собой богатое хранилище АДФ и серотонина — веществ, способствующих агрегации тромбоцитов, а также антиагреганта АТФ и основного кофактора коагуляции Са. Лизосомальные гранулы содержат гидролитические ферменты.

Наружная клеточная оболочка и ОКС усеяны гликопротеинами, играющими важную роль в адгезии и агрегации тромбоцитов.



Рис. 5-1. Схематическое изображение тромбоцита человека (справа — поперечный разрез). (Из: Bentfeld-Barker M. E., Bainton D. F. Identification of primary lysosomes in human megakaryocytes and platelets. *Blood*, 59: 472–481, 1982.)

Функции тромбоцитов

Тромбоциты выполняют различные функции *in vivo*:

- 1) адгезия (способность прилипать к поврежденной сосудистой стенке) и агрегация (способность склеиваться между собой) тромбоцитов, что приводит к формированию тромбоцитарной пробки;
- 2) местное выделение вазоконстрикторов для уменьшения кровотока в пораженном участке;
- 3) катализ реакций гуморальной системы свертывания с образованием в конечном счете фибринового сгустка (участие в плазменном гемостазе);
- 4) инициирование репарации тканей;
- 5) регулирование местной воспалительной реакции и иммунитета;
- 6) ангиотрофическая функция.

Нестимулированные тромбоциты циркулируют в виде гладких дискоидных клеток с незначительной метаболической активностью. Такие тромбоциты не вступают в физиологически значимое взаимодействие с другими форменными элементами периферической крови или монослоем эндотелиальных клеток, который выстилает эндovasкулярное пространство.

Механизм первичного гемостаза.

При травме сосудистой стенки оголяется коллаген, имеющий положительный заряд, на границе тромбоцит-сосудистая стенка образуется потенциал, способствующий прилипанию тромбоцитов и эритроцитов к эндотелию и субэндотелиальным структурам (адгезия тромбоцитов). Под влиянием АДФ, который выделяется из поврежденного сосуда, наступает агрегация тромбоцитов по 3 и более клеток как у места поврежденного сосуда, так и в кровотоке. При электронной микроскопии видно, как тромбоциты при этом меняют дискоидную форму на сферическую, одновременно выбрасывая псевдоподии.

Агрегация тромбоцитов сопровождается также процессом агглютинации, т.е. склеиванием тромбоцитов между собой.

Одновременно с прохождением адгезии, агрегации, агглютинации из тромбоцитов высвобождаются тромбоцитарные факторы, поступающие в кровотоки, серотонин, адреналин которые усиливают сокращение сосудистой стенки, и АДФ, усиливающий агрегацию тромбоцитов. Это реакция освобождения первого порядка. В начале агрегация обратима, а затем под влиянием небольших доз тромбина, образующегося в зоне повреждения, она становится необратимой.

Вазоконстрикция сосуда первоначально связана, очевидно, с влиянием нервной симпатической системы, а затем поддерживается, главным образом, серотонином и другими биологически активными веществами.

Спазм сосуда значительно уменьшает объем вытекаемой крови и обычно продолжается 1-3 минуты при повреждении мелких сосудов. За это время образуется белый тромбоцитарный тромб. Необратимая агрегация тромбоцитов сопровождается реакцией освобождения 2-ого порядка: высвобождаются гидролазы, АДФ в высоких концентрациях и вазоактивные вещества, а так же фибринектин и фактор Виллебранда. Под воздействием этих веществ в крови и формируется белый или тромбоцитарный тромб. После образования первичного тромба полностью блокируется кровотоки из сосудов микроциркуляции.

Для нормального функционирования первичного гемостаза необходимо, чтобы сосудистая стенка и тромбоциты были функционально полноценными, устойчивыми к нагрузкам.

Основным субстратом мембраны эндотелия является гиалуроновая кислота, разрушение которой ферментом гиалуронидазой или недостаточный синтез способствует повышению сосудистой проницаемости и выходу эритроцитов за пределы сосудистой стенки. В синтезе гиалуроновой кислоты принимают участие аскорбиновая кислота, рутин, глюконат кальция, глюкокортикоиды. Активность гиалуронидазы частично повышается при СКВ, слеродермии тяжелых заболеваниях почек, ревматизме, дерматомиозите, что приводит к появлению петехиальных кровоизлияний.

При тромбоцитопениях и тромбоцитопатиях нарушается первичный гемостаз, адгезия и агрегация тромбоцитов, проницаемость сосудистой стенки, в результате появляются носовые, десневые, маточные и другие кровотечения, а так же геморрагии на коже и слизистых.

Вторичный гемостаз

(плазменная ферментная система свертывания крови).

Первичный гемостаз не может обеспечить остановку кровотечения из макрососудов и сосудов среднего калибра. Под давлением крови кровотечение будет продолжаться. Первичный тромб рыхлый и не в состоянии закрыть просвет крупных сосудов. На базе тромбоцитарного тромба в результате взаимодействия плазменных факторов формируется окончательный кровяной тромб или фибриновый сгусток, способствующий остановке кровотечения. Образование фибринового сгустка является результатом каскада ферментативных реакций, которые приводят к образованию фибрина из фибриногена (фибрин не растворим в плазме).

Наука, изучающая процесс свертывания крови, называется коагулологией, а при изучении и первичного гемостаза – гемостазиологией.

Характеристика плазменных факторов (прокоагулянтов).

Все плазменные факторы свертывания находятся в крови в неактивном состоянии и обозначаются римскими цифрами в порядке их открытия. За исключением фибриногена и протромбина практически все факторы были открыты при сравнении плазмы больных людей, имеющих различные наследственные нарушения свертывания крови, с плазмой здорового

человека; и чаще все они названы по фамилии больного, у которого обнаруживали дефицит этого фактора, или реже по фамилии исследователя.

В свертывающую систему входят около 15 веществ (факторов) свертывания, содержащихся в плазме. По своей природе они относятся к белкам. Неотъемлемыми факторами свертывания являются ионы кальция и 3-й тромбоцитарный фактор.

Международный комитет по гемостазу и тромбозу присвоил арабскую нумерацию тромбоцитарным и римскую - плазменным факторам.

Факторы свертывания крови вырабатываются организмом в неактивном состоянии. Если факторы из неактивных (проферментов) становятся активными ферментами, к их обозначению добавляется буква «а» (например, X — неактивная форма фактора свертывания X, Xа - его активная форма). Если активным действием начинает обладать один из фрагментов фактора, к нему тоже добавляется буква «а». Некоторые факторы свертывания называют по выполняемой ими функции (например, факторы VIII и IX — антигемофильными глобулинами А и В), по фамилиям больных с впервые обнаруженным у них дефицитом соответствующего фактора, например, X — фактор Стюарта — Прауэр, фактор XII — фактор Хагемана и др.), реже по фамилиям исследователей (фактор XI — фактор Розенталя и др.).

Факторы пронумерованы в порядке их открытия и доказательства роли фактора в гемокоагуляции.

За последнее десятилетие доказана существенная роль в свертывании крови факторов Виллебранда, Флетчера и Фитцджеральда.

Фактор I - фибриноген — гликопротеин с молекулярной массой около 340 000 дальтон, состоящий из 2946 последовательных аминокислот. Молекула фибриногена представляет димер, в каждой единице которого содержатся три полипептидные цепи (M. Blomback, 1973; P. Gaffney, 1978) — A α , B β и γ с молекулярной массой соответственно 67 000, 58 000 и 47 000 дальтон, соединенные дисульфидными мостиками. Общая формула молекулы фибриногена: (A α , B β и γ). Целостность этой молекулы во многом определяется оставшимися дисульфидными связями.

Фактор I в том виде, в каком он вырабатывается паренхиматозными клетками печени и поступает в кровь, называется фибриногеном А, в отличие от фибриногена В, который осаждается из плазмы витамином К (производным β -нафтохинона). Под действием тромбина фибриноген превращается в

нерастворимый в крови фибриллярный белок — фибрин, основное вещество (субстрат) тромба (сгустка).

При различных воспалительных процессах уровень фибриногена А в крови повышается. Поэтому фибриноген А иногда называют фибриногеном воспаления. Быстрое увеличение концентрации фибриногена в крови во время воспалительных процессов преимущественно обусловлено ускорением его биосинтеза, а не замедлением скорости распада.

В клинической практике по уровню фибриногена оценивается острота воспалительного процесса (ревмокардита, пневмонии, гепатита, нефрита, лимфогранулематоза и др.).

В результате увеличения концентрации фибриногена в крови резко повышаются СОЭ, вязкость крови, но не усиливается гемокоагуляция. Однако тромбы, образуемые в крови с высоким содержанием фибриногена, значительно плотнее, чем появляющиеся в крови здорового человека. Поэтому они медленнее лизируются фибринолизинем. Уменьшением количества фибриногена А ниже 1 г/л иногда обусловлены кровотечения только из-за недостатка фибриногена (гипофибриногенемия).

Гипо- и афибриногенемия (полное отсутствие фибриногена в крови) бывают врожденными и приобретенными. Встречается и дисфибриногенемия — состояние, когда под действием тромбина фибриноген крови не превращается в фибрин вследствие функциональной неполноценности молекулы фибриногена. Тем самым нарушается образование кровяного сгустка и создаются условия для кровоточивости. Приобретенные гипо- и афибриногенемии особенно часто выявляют акушеры и хирурги у больных с развивающимся острым ДВС-синдромом, реже возникновение фибриногенопении связано с тяжелым нарушением функции печени. Фибриноген А не осаждается β-нафтолом, 50 % раствором этанола и протамином в небольших концентрациях.

Фибриноген под влиянием тромбина превращается в фибрин по типу протеолитического дробления молекулы фибриногена. Вначале тромбин отщепляет от молекулы фибриногена пептиды А, образуя дес-А-мономеры фибрина (неполноценные мономеры фибрина). Затем отщепляются пептиды В и возникают дес-АВ-мономеры, или полные мономеры фибрина.

Фибринопептиды А иногда появляются в циркулирующей крови. Их можно определять иммунологически антисыворотками против соответствующего фибринопептида. Отражая наличие в циркулирующей крови тромбина,

фибринопептид А в крови свидетельствует и о ранних этапах развития ДВС-синдрома.

Оставшаяся молекула фибриногена — фибрин-мономер, ее формула: $(\alpha, \beta, \gamma)_2$. Эта молекула приобретает способность соединяться с себе подобными и образовывать фибрин-полимер (α, β, γ) , который представляет гель (или сгусток). Сборка мономеров фибрина проходит этапы формирования димеров, из которых при продольном и поперечном сшивании образуются полимеры фибрина — протофибриллы, а затем нити фибрина. Этот фибрин растворим в 5—7 М раствора мочевины или в 2 % растворе монохлоруксусной кислоты. Тромб из такого фибрина легко растворяется фибринолизинем и потому не может обеспечить полноценный гемостаз. Это нередко бывает причиной кровоточивости и плохого заживления ран. Подобный фибрин называется растворимым (фибрин S, soluble). Полноценным, то есть устойчивым к фибринолизину, он может стать под действием фибриназы (фактора XIIIa). Фактор XIIIa катализирует формирование γ -глутамил-Е-лизиновых мостиков между остатками лизина одного полимера и остатками глютаминовой кислоты другого полимера. Таким путем обеспечиваются ковалентные связи между α - и γ -цепями фибрина, придавая структуре фибринового каркаса антипротеазную устойчивость. Образовавшийся фибрин называется нерастворимым фибрином (фибрин I, insoluble). Полимеризация мономеров фибрина до их волокнисто-нитчатой стадии происходит при высокой концентрации этих веществ, как правило, вследствие появления тромбина в большом количестве. Однако уровень тромбина в связи с его нейтрализацией антитромбинами нарастает медленно, и при образовании мономеров фибрина не сразу возникает фибрин-полимер. Поэтому мономеры фибрина формируют короткоцепочечные полимеры мономеров фибрина, не выпадающие в виде нитей, а циркулирующие в крови как растворимые комплексы мономеров фибрина (РКМФ). Мономеры фибрина могут создавать РКМФ и другого рода. Так, мономеры фибрина комплексируются с фибриногеном, фибринопептидами А и В и также образуют циркулирующие РКМФ. Кроме того, мономеры фибрина нередко комплексируются с продуктами деградации фибрина и фибриногена (ПДФ), образуя РКМФ.

Факт обнаружения РКМФ имеет диагностическое значение, так как их наличие свидетельствует об активации свертывания вплоть до появления тромбина и о развитии гиперкоагуляции или ДВС-синдрома. РКМФ [$(\text{фибрин-мономер} + \text{фибрин-мономер}) \cdot (n - 1)$, фибрин-мономер + фибриноген, фибрин-мономер + фибринопептид А или фибринопептид В, их более комплексные формы] под действием тромбина сворачиваются, и

находящийся в них фибриноген включается в структуру фибринового сгустка (В. Е. Иванов, 1986, 1987).

РКМФ, состоящие из мономеров фибрина с продуктами деградации фибрина и фибриногена — X, Y и, особенно, с фрагментами E и D, плохо включаются в фибрин. Они представляют заблокированный фибрин-мономер, который выключается из гемостатического процесса. Создается ситуация «заблокированной» гипо- или даже афибриногемии, нередко сопровождающей ДВС крови. По мнению С. Баркагана (1986), биологический смысл и санационное значение образования РКМФ заключаются в том, что они способствуют поддержанию крови при тромбинемии в жидком состоянии, препятствуют отложению больших масс фибрина в сосудах и уменьшают блокаду микроциркуляции. По данным Р. Gaffney (1982), РКМФ быстрее, чем фибрин-полимер, лизируются плазмином, РКМФ легко взаимодействуют с β -нафтолом, этанолом и протамином и выпадают в осадок. Вот почему результаты определения этого преобразованного под действием тромбина фибриногена и его комплексов используют для диагностики тромбинемии по β -нафтоловой, этаноловой и протаминовой пробам (паракоагуляционным тестам). При этом β -нафтоловая и этаноловая пробы больше специфичны для РКМФ, а протаминовая — для РКМФ, представляющих растворимые комплексы мономеров фибрина с ПДФ (В. Е. Иванов, 1986). Под влиянием фибринолизина молекула фибриногена последовательно расщепляется на фрагменты X, Y (ранние продукты деградации фибриногена, ПДФ), D, E (поздние продукты деградации фибриногена), которые проявляют антикоагулянтные, антиагрегационные и антиполимеризационные свойства.

Такие же продукты деградации образуются и при расщеплении фибрина.

Результаты определения ранних и поздних ПДФ имеют большое значение для оценки фибринолиза и фибриногенолиза, ранней диагностики изменений фибринолитической активности, стадий ДВС-синдромов, дифференциации первичного и вторичного фибринолиза.

Фактор II — протромбин — относится к эуглобулинам. Является гликопротеидом с массой молекулы 72 000—100 000, по другим данным — 65 000.

Под действием протромбиназы образуются α , β , γ -тромбины. α -тромбин (масса молекулы 38 000) обладает сильной свертывающей активностью в отношении фибриногена, но быстро нейтрализуется антитромбином III. β -тромбин (масса молекулы около 26 000) резистентен по отношению к гепарину и АТ III. γ -тромбин не имеет свертывающей активности, но ему

присуще эстеразное и фибринолитическое действие (P. Machowich et al., 1976).

Фактор II адсорбируется на сернокислом барии, гидроокиси алюминия и других адсорбентах. Синтезируется в печени при участии витамина К. Если нарушается функция печени, концентрация протромбина в крови снижается. Резкое снижение протромбина в крови больного инфекционным гепатитом — крайне неблагоприятный признак тяжелого поражения печеночной паренхимы.

Уровень протромбина, или его функция, снижается при эндо- или экзогенной недостаточности витамина К, когда синтезируется неполноценный протромбин (белки PIVKA).

Скорость свертывания крови нарушается лишь при уменьшении концентрации протромбина ниже 40 %.

Повышенный уровень фактора II способствует развитию тромбозов. Как правило, гиперпротромбинемия остается фактором риска, если появляется активная протромбиназа, снижаются активность антитромбина III и гепарина, а также угнетен фибринолиз.

Фактор III — тканевый тромбопластин (неактивная тканевая протромбиназа, апопротеин С—термостабильный липопротеид). Разрушается лишь при 75 °С. Его много в легких, тканях мозга, сердца, кишечника, матки, в эндотелии. У здоровых людей, как правило, тканевый тромбопластин не попадает в циркулирующую кровь в больших количествах. Он, в основном, участвует в локальном гемостазе. При контакте с плазменными факторами (VIIa, IV) способен активировать фактор X (это внешний путь формирования протромбиназы). С тканевым тромбопластином связывают большинство случаев возникновения ДВС-синдромов и послеоперационных тромбозов, тромбоэмболии и тромбоваскулитов. Из форменных элементов тканевый тромбопластин могут синтезировать только моноциты (З.С.Баркаган, 1986). Эритроциты, тромбоциты, лейкоциты содержат лишь липидный фактор (3 тф, эритроцитин, эритрофосфатид). Они, как и мозговой кефалин, способны заменить один 3 тф, но не полный тканевый тромбопластин. Это особенно очевидно, когда выполняется аутокоагуляционный тест у больных гемофилией, у которых нарушен внутренний путь образования протромбиназы, но остается внешний путь и в достаточном количестве липидный фактор тромбоцитов и эритроцитов. Несмотря на это, протромбиназная активность, когда резко снижена активность VIII и IX, достаточна активность VII и 3-го липидного факторов, очень низкая (на 8—10 мин — до 300 с, при норме 10 с). Между тем после

введения в тест тканевого тромбобластина (экстракта серого вещества головного мозга) выход тромбина нормальный.

Фактор IV — ионы кальция — имеет первостепенное значение для активации протромбиназы и превращения протромбина в тромбин. Ускоряет фибриноген-фибриновую реакцию. Ионы кальция необходимы для взаимодействия факторов свертывания с фосфолипидной поверхностью клеток. У здоровых людей фактор IV определяется в концентрации 2—2,75 ммоль/л.

Феномен связывания ионов кальция лимоннокислым натрием или ЭДТА используется для предотвращения коагуляции консервируемой крови и для лабораторного исследования системы свертывания, фибринолиза и тромбоцитов в стабилизированной крови.

В процессе свертывания крови фактор IV не расходуется, поэтому его можно обнаружить в сыворотке крови. Кальций способен связывать гепарин, благодаря чему свертывание крови ускоряется. Без кальция нарушается агрегация тромбоцитов и ретракция кровяного сгустка. Ионы кальция ингибируют фибринолиз.

Фактор V — проакселерин, лабильный фактор, или Ас-глобулин,— образуется в печени, но, в отличие от других печеночных факторов протромбинового комплекса (II, VII, IX и X), не зависит от витамина K. Термолабилен, не адсорбируется сернокислым барием. Относится к глобулинам. В хранящейся цитратной плазме фактор V разрушается при +4°C за 2 нед, при 37 °C — за 48 ч. В оксалатной плазме интенсивность этого процесса удваивается. Проакселерин плохо сохраняется в консервированной крови. Он необходим для образования внутренней (кровяной) протромбиназы, при этом заметно активирует фактор X, и для превращения протромбина в тромбин, когда в комплекс включаются фактор Xa, Ca⁺⁺ и фосфолипид. Во время свертывания крови фактор потребляется, как и фактор II, поэтому в сыворотке не обнаруживается. В случаях дефицита фактора V в различной степени нарушаются внешний и внутренний пути образования протромбиназы. В коагулограмме это, прежде всего, выражается удлинением протромбинового времени (снижением протромбинового индекса), нарушением теста генерации тромбобластина, каолин-кефалинового и аутокоагуляционного тестов. Тромбиновое время остается в пределах нормы. После добавления BaSO₄-плазмы здорового человека, содержащей фактор V, эти изменения корригируются и названные выше тесты нормализуются.

Наследственный дефицит фактора V проявляется парагемофилией. Тип наследования — аутосомно-доминантный с неполной экспрессивностью

патологического гена или аутомно-рецессивный (З. С. Баркаган, 1980). Клинически тип нарушений гемостаза у больных парагемофилией (болезнь Оурена) — петехиально-пятнистый. Подкожные и внутримышечные гематомы, кровоизлияния в суставы и внутренние органы для болезни Оурена не характерны.

Фактор VI — акселерин, или сывороточный Ас-глобулин, — активная форма фактора V. В связи с тем, что отдельным фактором признается только неактивная, профакторная, форма коагулянта, акселерин исключен из употребления и номенклатуры факторов свертывания.

Фактор VII - проконвертин, или конвертин, — синтезируется в печени при участии витамина К. Долго остается в стабилизированной крови, хорошо переносит нагревание, поэтому называется стабильным фактором. Хорошо адсорбируется сернокислым барием, гидроокисью алюминия, задерживается асбестовыми фильтрами Зейца. Факторы XIIa, XIa, калликреин могут превращать фактор VII в VIIa. В основном способствуют образованию тканевой протромбиназы и превращению протромбина в тромбин. Фактор VII в циркулирующей крови активизирует фактор X. Это действие особенно усиливается после активации проконвертина тканевым тромбопластином. У больных с поражением печени и у подвергаемых лечению антикоагулянтами непрямого действия активность фактора VII снижается. Врожденным недостатком фактора VII обусловлено развитие геморрагического диатеза (болезни Александера). Фактор VII, подобно факторам XIIa, XI, X, IX, XIa и калликреину, является сериновой протеазой с аргинин-эстеразной активностью.

Фактор VIII — антигемофильный глобулин А, или плазменный тромбопластический фактор А, — относится к сложным гликопротеидам с молекулярной массой около $1,12—4,5 \times 10^6$. Место его синтеза точно не установлено. Доказан синтез фактора VIII в печени, селезенке, клетках эндотелия, лейкоцитах, почках. Антигемофильный глобулин А быстро инактивируется при 20°C и 37°C. Он стабилен несколько часов при +4°C и несколько недель при — 20°C. Быстро исчезает из консервированной крови. Фактор VIII дольше активен в присутствии цитрата натрия при pH 6,2—6,9, но быстро теряет активность в среде с ЭДТА. Он не адсорбируется на сульфате бария и гидроокиси алюминия. Этим пользуются для отделения фактора VIII от факторов II, VII, IX и X.

В крови этот фактор циркулирует в виде комплекса из трех субъединиц, обозначаемых VIIIк (коагулирующая единица), VIII-АГ (основной антигенный маркер) и VIII-фВ (фактор Виллебранда, связанный с VIII-АГ).

VIII-фВ регулирует синтез коагулянтной части антигемофильного глобулина—VIIIк.

При свертывании крови фактор VIII находится в сыворотке в неактивном состоянии.

Врожденным недостатком фактора VIII обусловлено развитие гемофилии А. В крови больных ею фактора VIII нет (гемофилия А-) или он находится в функционально неполноценной форме, которая не может принимать участие в свертывании (гемофилия А+). Результаты иммунологических исследований доказано, что у 90—92 % больных гемофилией антиген фактора VIIIк не обнаруживается (гемофилия А-) и лишь у 8—10 % больных диагностируется гемофилия А+. У страдающих болезнью Виллебранда снижена активность как VIII-фВ, участвующего в тромбоцитарно-сосудистом гемостазе и являющегося основным маркером комплекса фактора VIII (фактор Виллебранда), так и viiiк. У больных гемофилией резко снижено содержание VIIIк, а количество VIII-фВ находится в пределах нормы. По этой разнице различаются клинические формы геморрагического диатеза:

- гематомная форма возникает у больных гемофилией,
- петехиально-гематомная форма — у страдающих болезнью Виллебранда.

Время кровотечения удлинено у больных болезнью Виллебранда и нормальное у больных гемофилией. Концентрация фактора VIII значительно повышается после спленэктомии и иногда значительно снижается при развитии ДВС-синдрома.

Фактор IX — Кристмас-фактор, антигемофильный глобулин В, плазменный тромбопластиновый компонент (plasma thromboplastin component— РТС) — адсорбируется сульфатом бария и асбестовым фильтром. Хорошо сохраняется в консервированной крови и в замороженной плазме (через 2 мес хранения его остается до 90 %). Относится к β_2 -глобулинам. Выработка фактора IX регулируется геном в X-хромосоме, в локусе, отстоящем от такового фактора VIII. Этот ген мутирует в 7—10 раз реже, чем ген фактора VIII. Вот почему из всех гемофилий гемофилия А обнаруживается у 87— 94 % больных, а гемофилия В (врожденный недостаток фактора IX, болезнь Кристмаса) — у 8—15 % больных.

3. С. Баркаган (1980) в зависимости от уровня антигемофильных факторов А и В в крови разделил клинические формы гемофилии А и В: если концентрация этих факторов от 0 до 1 % — крайне тяжелая форма; если от 1 до 2 % — тяжелая форма; от 2 до 5 % — форма средней тяжести и если выше

5 % — легкая форма. Последняя, легкая форма клинически проявляется после травм и хирургических вмешательств.

Фактор IX образуется в печени, поэтому его содержание в крови больных гепатитами, циррозами печени, а также у принимающих производные дикумарина и индандиона уменьшено.

В процессе свертывания крови фактор IX не потребляется и остается в сыворотке еще в более активном состоянии, чем в плазме. Его гемостатический уровень (25 %) достаточен для выполнения хирургических вмешательств.

В коагулограмме крови больных гемофилией, как правило, значительно изменены показатели активации протромбиназы: удлинено общее время свертывания крови и рекальцификации, увеличено активированное парциальное тромбопластиновое (каолин-кефалиновое) время, снижена активность аутокоагулограммы. Протромбиновое и тромбиновое время, содержание фибриногена, активность фибриназы нормальные.

Гемофилии А и В дифференцируются по данным теста генерации тромбопластина или аутокоагулограммы. Для этого можно использовать и результаты обменных проб: нарушенное время свертывания крови больных гемофилией А и В после смешивания образцов крови от обоих больных становится нормальным.

Фактор X - фактор Стюарта - Прауэр - гликопротеин с массой молекулы 54200-56000. Вырабатывается в печени в неактивном состоянии при участии витамина К. Фактор X состоит из двух полипептидных цепей:

- тяжелой (с молекулярной массой 38000), на которой находится активный центр,
- легкой — с остатком карбоксиглутаминовой кислоты, необходимой для присоединения к фосфолипидам. Быстро денатурирует при 56 °С. В консервированной крови при 4 °С сохраняется 2 мес.

В современной схеме свертывания крови активный фактор X — Xa относится к центральному фактору протромбиназы, преобразующей протромбин в тромбин. В активную форму фактор X превращается под действием факторов VIIa и III (внешний, тканевый путь образования протромбиназы) или под влиянием фактора IXa вместе с фактором VIIIa и фосфолипидом при участии ионов кальция (внутренний, кровяной путь образования протромбиназы). Для обеспечения гемостаза достаточно 10 % фактора X.

Уровень фактора X в крови связан с протромбиновым временем. Так, если в крови фактора X менее 1 %, то протромбиновое время будет более 90 с (при норме 12—14 с), если от 1 до 2 % — около 70—90 с, если же от 2 до 5 % — 40—70 с, а если от 5 до 10 % — 15—40 с (данные С. Rizza - цит. по З.С.Баркагану, 1980).

Фактор X активируется трипсином и ферментом из яда гадюки. Последним — в присутствии ионизированного кальция, который, видимо, необходим для образования комплекса белков и фосфолипидов (Д. М. Зубаиров, 1978). Фактор X трансформируется в Ха под действием солевых растворов с высокой ионной силой.

Для приобретенного или врожденного недостатка фактора X характерно удлинение протромбинового времени, нормализующегося «старой» сывороткой, но не CaSO_4 —плазмой (нарушена «внешняя» система). Кроме того, нарушена и «внутренняя» система: удлинено каолин-кефалиновое время, снижено потребление протромбина, изменены тест генерации тромбопластина (ТГТ) и аутокоагулограмма.

Вследствие врожденного недостатка фактора X, наследуемого по неполному аутосомному типу, возникает болезнь Стюарта — Прауэр, которая встречается как у мужчин, так и у женщин. Наклонность к кровоточивости определяется только у гомозиготных особей.

Содержание фактора X снижено в крови больных системным амилоидозом, миеломной болезнью, туберкулезом, с поражениями печени, недостатком витамина К, получающих непрямые антикоагулянты.

Фактор XI — РТА (plasma thromboplastin anticedent) — плазменный предшественник тромбопластина. Это гликопротеин с массой молекулы 160 000. Термолабилен, разрушается при 56 °С. В крови здоровых людей его содержится 50—185 %. На 2/3 остается в плазме после адсорбции гидроокисью алюминия или серноокислым барием.

В процессе свертывания крови он не потребляется, поэтому обнаруживается в большом количестве в сыворотке. Активная форма этого фактора (XIa) образуется при участии факторов XIIa, Флетчера и Фитцджеральда — Фложе. Форма XIa активирует фактор IX, который превращается в фактор IXa. Эта реакция осуществляется и трипсином в присутствии ионов кальция.

Врожденная недостаточность фактора XI, обнаруженная в 1953 году R. Rosenthal et al., наследуется по аутосомно-рецессивному типу. Эта

недостаточность выявляется у мужчин и женщин. Кровоточивость в основном отмечается после травм и операций.

В случаях недостатка фактора XI в коагулограмме больных удлинено время рекальцификации, изменены ТГТ, каолин-кефалиновое время, аутокоагулограмма. В коррекционных пробах тесты нормализуются как нормальной BaSO_4 -плазмой, так и сывороткой здорового человека.

По такому же типу изменяются коррекционные тесты у людей с недостаточностью фактора XII. Однако у больных с дефицитом фактора Хагемана значительнее, чем у больных с РТА-недостаточностью, изменяются время свертывания крови по Ли-Уайту и каолин-кефалиновое время. Заметно нарушенная свертываемость крови у первых контрастирует с полным отсутствием каких-либо геморрагических явлений.

Фактор XII — фактор контакта Хагемана — соединение с массой молекулы 80 000. Не адсорбируется на сульфате бария, гелях гидроокиси алюминия и фосфата кальция, но хорошо связывается целитом и каолином, сорбируется стеклом. Хорошо сохраняется в консервированной крови. При 4°C половина фактора Хагемана остается в крови более месяца. Много его и в сыворотке.

Фактор XII вырабатывается в неактивном состоянии. Место его синтеза не известно. В лабораторных условиях активируется при соприкосновении с поверхностью кварца и стекла, каолина, целита, асбеста, углекислого бария; а в организме — при контакте с кожей, волокнами коллагена, хондроитинсерной кислотой, мицеллами насыщенных жирных кислот, бактериальными липополисахаридами, содержащими радикалы жирных кислот, эндотоксином, адреналином и норадреналином.

Фактор Хагемана — «инициатор» внутрисосудистой коагуляции. Кроме того, фактор XIIa активирует прекалликреины плазмы, которые превращаются в ферменты калликреины, освобождающие кинины. Активный фактор XII служит активатором фибринолиза. Такие кинины, как брадикинин и каллидин, увеличивают проницаемость сосудов, способствуют сокращению гладких мышц, снижают кровяное давление, возбуждают болевые рецепторы, создают условия для прилипания лейкоцитов к стенке мелких кровеносных сосудов и их миграции в экстраваскулярное пространство. Калликреин активирует фактор XII в 10 раз сильнее, чем плазмин и фактор XIIa. В жидкой среде фактор Флетчера оказывается наиболее важным активатором фактора Хагемана.

В крови есть ингибитор активного фактора Хагемана.

Впервые врожденный дефицит фактора XII был описан в 1955 году R. Ratnoff et al. У больного Джо Хагемана они не выявили признаков кровоточивости, но установили, что время свертывания крови у него значительно удлинено.

Болезнь наследуется по аутосомно-рецессивному типу. Описано около 100 больных с дефицитом фактора Хагемана. У большинства из них не было ни спонтанной, ни спровоцированной травмой кровоточивости. Смерть больного Хагемана от посттравматической легочной эмболии оставила вопрос о роли фактора XII в гемостазе открытым. Возможно, что кроме контактной активации этого фактора существует другой путь включения внутренней системы коагуляции.

У больных с недостатком фактора XII в коагулограмме резко удлиняется время свертывания крови (особенно в силиконированной пробирке), время рекальцификации, каолин-кефалиновое время без клинических признаков кровоточивости. Не сокращается время коагуляции активаторами контактной фазы — каолином, бентонином и другими. Эти показатели коагулограммы нормализуются после добавления BaSO_4 -плазмы, прогретой 15 мин при 56°C , и остаются прежними после добавления плазмы цыплят, у которых практически нет фактора Хагемана.

Фактор XIII — фибринстабилизирующий фактор, фибриназа, фактор Лаки — Лоранда — α_2 -гликопротеид с массой молекулы 300 000 — 340 000. Менее термостабилен, чем фибриноген.

Определяется в сосудистой стенке, тромбоцитах, эритроцитах, почках, легких, мышцах, плаценте. В плазме находится в виде профермента, соединенного с фибриногеном. Фактор XIII под влиянием тромбина превращается в активную форму (XIIIa). В крови здоровых людей его содержится 80—120% (сгусток растворяется за 50—100 с). 10% фибриназы обеспечивают полноценный гемостаз, 2 % этого фактора достаточны для остановки кровотечения.

Фактор XIII является трансамидазой, которая катализирует синтез ковалентных связей между лизилом и глютаминилом фибринмономера (действуя как ϵ -лизил- γ -глутамил-аминоацилтрансфераза) и тем самым соединяет мономерные единицы в фибрин-полимере. Активность фибриназы обусловлена наличием сульфгидрильных групп. Она хорошо сохраняется при -20°C (лиофилизированные препараты теряют около трети активности за 3 нед). При комнатной температуре активность фермента падает в течение 2—3 дней. В результате прогревания плазмы или сыворотки до 60°C фибриназа инактивируется за 10 мин. В инкубируемых растворах фибриногена при 40°C фибриназа разрушается в течение 3 ч.

Тромбы, образовавшиеся в присутствии фибриназы, очень медленно подвергаются лизису. Если активность фактора XIII снижается, свертки очень быстро распадаются, даже когда фибринолитическая активность крови нормальная.

Установлено, что снижение активности фибриназы сопровождается уменьшением адгезивности и агрегации кровяных пластинок, и, наоборот, при повышении активности фибриназы эти свойства тромбоцитов повышаются. Вот почему снижение или повышение активности фибриназы свидетельствуют об опасности развития геморрагии или тромбоза.

У больных с тромбоэмболическими осложнениями, атеросклерозом, у оперированных, родильниц, после введения адреналина, глюкокортикоидов, питуитрина активность фибриназы повышена, а у больных С-авитаминозом, лучевой болезнью, лейкозом, циррозами, лимфомой, с ДВС-синдромами, у перенесших адреналэктомия, после приема непрямым антикоагулянтов ее активность снижена.

Описан врожденный дефицит фибриназы, который наследуется аутосомно-рецессивным способом, преимущественно мужчинами. Первым клиническим признаком дефицита фибриназы у 80% больных бывает длительное (в течение дней, иногда недель) кровотечение из пупочной раны. Кровоточивость проявляется по петехиальному типу. Случаются кровоизлияния в мозг. Отмечается медленное заживление ран, часто образуются послеоперационные грыжи. Плохо также заживают переломы. Все параметры коагулограммы, кроме снижения уровня фактора XIII в плазме, остаются совершенно нормальными.

Фактор Флетчера — плазменный прекалликреин, участвующий в реакциях коагуляции в контактной фазе. Открыт в 1965 году W. Hathaway et al.

Если фактора Флетчера нет в организме, нарушается общее время свертывания, хотя факторы I—XIII содержатся в крови в пределах нормы. При этом замедляется внутренняя система активации протромбина во время контакта плазмы со стеклом, каолином и эллаговой кислотой. Однако после 6—14-минутного контакта плазмы без фактора Флетчера с каолином нормализуется ее свертывание, в отличие от плазмы с недостатком факторов XII и XI. Фактор Флетчера активировывает факторы VII и IX. Тем самым он связывает внутреннюю и внешнюю системы активации фактора X. Прекалликреин трансформируется в калликреин под влиянием фактора XIIa (Т. С. Пасхина, 1976).

Дефицит фактора Флетчера, подобно недостатку фактора Хагемана, клинически ничем не проявляется.

Фактор Фитцджеральда (Фитцджеральда — Фложе) — высокомолекулярный кининоген плазмы (ВМ-кининоген), который переводится калликреином в кинин и участвует в активации фактора XI, ускоряя действие на последний фактора XIIa. Фактор стабилен в цитратной плазме, сохраняет свою активность 4 мес при —40°С. Осаждается с эуглобулиновой фракцией плазмы. Активность фактора снижается наполовину после суточного хранения при 37 °С.

В процессе свертывания крови этот фактор не потребляется. Его активность не снижается под влиянием непрямых антикоагулянтов. После инфузии крови время полужизни фактора у одной больной было около 6,5 сут (Д. М. Зубаиров, 1978).

Если фактора Фитцджеральда нет в организме, нарушается активация внутренней системы каолином.

Недостаток фактора Фитцджеральда обнаруживается у больных случайно, потому что у них не бывает геморрагического диатеза.

Фактор Виллебранда (VIII: FW, или VIII: фВ) — крупномолекулярный компонент фактора VIII с молекулярной массой 1 500 000—2 000 000, вырабатывается в эндотелии, выделяется в кровоток, в котором объединяется с коагуляционной частью фактора VIII (VIII:С, VIII: К), образуя полноценный фактор VIII свертывания, или антигемофильный глобулин А. Часть фактора Виллебранда из эндотелия перемещается в субэндотелий и соединяется там с коллагеновыми волокнами и микрофибриллами, в которых находятся центры для связывания фактора Виллебранда. VIII:фВ несет в себе главный антигенный маркер фактора VIII, обозначаемый как VIII_R:Ag или VIII:АГ. Он также называется ристоцетин-кофактор (RiCoF). VIII:фВ необходим для адгезии тромбоцитов к субэндотелию. Именно через него тромбоциты адгезируются к коллагеновым волокнам и микрофибриллам. Результаты морфологических исследований было показано, что благодаря связыванию VIII_R:Ag —VIII:фВ облегчается распластывание, а не адгезия тромбоцитов. Доказано также, что VIII:фВ стимулирует организм синтезировать коагуляционный компонент фактора VIII (VIII:К).

Кроме перечисленных факторов в процессе свертывания принимает участие калликреин-кининовая система и система комплемента.

Основные этапы каскадного гемостаза

Первая фаза – это образование активной протромбиназы или контактно калликреин-кининовая каскадная активация.

Вторая фаза - образование тромбина.

Третья фаза – образование фибрина.

Первая фаза самая длинная. Она включает взаимодействие целого ряда плазменных факторов, как по внутреннему механизму, так и по внешнему. Внешний механизм намного короче, чем внутренний. На первую фазу из всего времени процесса свертывания крови приходится 95-99% (4 мин 55 с – 9 мин 55 с). После этой фазы консистенция крови не меняется. Кровь сохраняется жидкой.

Вторая фаза – образование тромбина из протромбина под действием активной протромбиназы. На эту фазу уходит 2-5 с. Кровь остается жидкой.

Третья фаза – образование фибрина из фибриногена под действием тромбина. Кровь теряет жидкую консистенцию, образуется сгусток. Продолжительность фазы 2-5 с.

В настоящее время принята каскадная теория Макдирлана – Квика, согласно которой свертывание крови – это аутокаталитический процесс, в котором совершается последовательное взаимодействие всех факторов свертывания, причем активация происходит как сверху вниз, так и по механизму обратной связи.

После образования сгустка наступает четвертая – посткоагуляционная фаза **ретракции** и **фибринолиза** (лизиса сгустка). Ретракция (сжатие и уплотнение сгустка) начинается через 2-3 часа и заканчивается через 20-24 часа. Ретракция осуществляется под влиянием восьмого тромбоцитарного фактора (ретрактозима). Начинается сокращение нитей фибрина. Одновременно с ретракцией начинается лизис или фибринолиз под действием компонентов фибринолитической или плазминовой системы крови.

Антикоагулянтная система.

Роль антикоагулянтов заключается в сохранении жидкого состояния крови, а при повреждении сосудов они препятствуют переходу локального тромбообразования в распространенное свертывание крови.

Антикоагулянты делятся на первичные, которые синтезируются в организме постоянно, выделяются в кровоток, взаимодействуют с активными факторами и не допускают свертывания крови; и вторичные, которые образуются в процессе свертывания крови и постоянно в кровотоке не присутствуют.

Таблица №1	
Основные первичные физиологические антикоагулянты	
Наименование антикоагулянта	Механизмы действия
Антитромбин III (АТ III)	Прогрессивно действующий ингибитор тромбина, фактора Ха и в меньшей степени других ферментных факторов свертывания. Плазменный кофактор гепарина
Гепарин	Сульфатированный полисахарид, образующий комплексы с АТ III, переводящий последний в быстродействующий антикоагулянт
Кофактор гепарина II	Слабый антикоагулянт, действие которого выявляется в присутствии гепарина после удаления из плазмы АТ III
Протеин С	Витамин К-зависимая серин-амидаза, инактивирующая факторы VIIa и Va; эндогенный активатор плазминогена. Активируется тромбином и комплексом "тромбомодулин-тромбин"
Протеин S	Витамин К-зависимый кофактор протеина С
Тромбомодулин	Гликопротеин, фиксированный на цитоплазматической мембране эндотелия. Связывает и инактивирует тромбин, но не ослабляет его активирующего действия на протеин С
Ингибитор тканевого пути свертывания (TFPI)	Ингибитор комплекса "тканевой фактор-фактор VIIa-фактор Ха-Са ²⁺ "
"Контактные ингибиторы" (фосфолипидный, плацентарный)	Нарушают активацию внутреннего механизма свертывания (комплексы факторов XII и XI)

Антитромбопластины α_2 -макроглобулин	Ингибиторы комплекса факторов III - VIIa. Слабый ингибитор тромбина, плазмина, калликреина
α_2 -антитрипсин 1	Ингибитор тромбина, факторов IXa, XIa, XIIa, плазмина
Ингибитор комплемента 1 (Анти-C1)	То же
Ингибиторы полимеризации фибрин-мономеров	Тормозят образование фибрина

Вторичные антикоагулянты:

1. Фибрин (антитромбин I) – после образования фибриногена он сорбирует на себе тромбин, переводя его в неактивное состояние
2. Дериваты протромбина – это фрагменты, образующиеся на этапе превращения протромбина в тромбин.
3. Фибринопептиды – продукты, образующиеся на этапе превращения фибриногена в фибрин, прежде всего, фибринопептиды А и Б.
4. Продукты деградации фибриногена плазмином (ПДФ).

Фибринолитическая система.

Фибринолитическая система плазмы состоит из плазминогена (профермент), плазмина (фермент), активаторов плазминогена и соответствующих ингибиторов. Активация фибринолитической системы приводит к образованию плазмина - мощного протеолитического фермента, обладающего разнообразным действием *in vivo*. Предшественник плазмина — *плазминоген*, представляет собой гликопротеин (92 кД), продуцируемый печенью, эозинофилами и почками. Молекула плазминогена состоит из А-цепи с пятью доменами и В-цепи (каталитический домен) с N-концевой глутаминовой кислотой (Glu-плазминоген). Период полусуществования плазминогена составляет 2,2 сут. Плазминоген имеет сильное сродство к лизиновым остаткам. Особенности структуры придают плазминогену способность связываться со свободными лизиновыми остатками фибрина; α_2 -антиплазмина; гликопротеина, богатого гистидином; поверхностных рецепторов; внеклеточного матрикса; тромбоспондина и иммуноглобулинов.

Активация плазминогена. Превращение плазминогена в плазмин катализируется *активаторами плазминогена* и строго регулируется

различными *ингибиторами*. Последние инактивируют как плазмин, так и активаторы плазминогена.

Активаторы плазминогена образуются или сосудистой стенкой (внутренняя активация), или тканями (внешняя активация). Затем образовавшийся плазмин разлагает фибрин, обнажая новые лизиновые остатки, с которыми связывается другой активатор плазминогена (одноцепочечная урокиназа). Плазмин превращает эту урокиназу в иную форму - активную двухцепочечную, вызывая дальнейшую трансформацию плазминогена в плазмин и растворение фибрина.

Другими активаторами плазминогена (нефизиологическими) являются стрептокиназа (продуцируемая гемолитическим стрептококком), антистреплаза (комплекс человеческого плазминогена и бактериальной стрептокиназы) и стафило-киназа (продуцируемая *Staphylococcus aureus*). Первые два — фармакологические тромболитические средства, применяемые для лечения острого тромбоза.

Основная функция плазмينا — расщеплять фибрин и поддерживать сосуды в открытом состоянии. Расщепление плазмином пептидных связей в фибрине и фибриногене приводит к образованию различных дериватов с меньшей молекулярной массой, а именно **продуктов деградации фибрина** (фибриногена) (ПДФ) или продуктов расщепления фибрина (фибриногена) (ПРФ).

Плазмин в кровотоке (в жидкой фазе) быстро инактивируется естественно образующимися ингибиторами, но плазмин в фибриновом сгустке (гелевая фаза) защищен от действия ингибиторов и лизирует фибрин локально. Таким образом, в физиологических условиях фибринолиз ограничен зоной фибринообразования (гелевая фаза), то есть гемостатической пробкой. Однако при патологических состояниях фибринолиз может стать генерализованным, охватывая обе фазы плазминообразования (жидкую и гелевую), что приводит к литическому состоянию (фибринолитическое состояние, активный фибринолиз). Оно характеризуется образованием избыточного количества продуктов деградации фибрина (фибриногена) в крови, а также проявляющимся клинически кровотечением.

Подобно активным сериновым протеазам системы свертывания крови, функции активаторов плазмينا и плазминогена модулируются ингибиторами.

Ингибиторы плазмينا: α_2 -антиплазмин (α_2 -АП), α_2 -макроглобулин (α_2 -М), α_2 -антитрипсин (α_2 -АТ), антитромбин III (АТ III) и ингибитор эстеразы C1 (C1-И).

Ингибиторы активатора пламиногена 1, 2, 3 (ИАП-1; ИАП-2; ИАП-3). ИАП-1 — основной ингибитор ТАП и двухцепочечной урокиназы, но он ИАП-2 — основной ингибитор двухцепочечной урокиназы.

С 1-ингибитор инактивирует связанный с контактной фазой фибринолиз, в частности трансформацию одноцепочечной урокиназы в двухцепочечную.

Гликопротеин, богатый гистидином (ГБГ), является еще одним конкурентным ингибитором пламиногена. Высокий уровень ИАП-1 и ГБГ в плазме обуславливает повышенную склонность к тромбозу.

Клеточная фибринолитическая система. Клеточный фибринолиз связан с лейкоцитами, макрофагами, ЭК и тромбоцитами. Он поддерживает специфическую активность как местного, так и системного фибринолиза. Лейкоциты привлекаются в зону отложения фибрина хемотатическими веществами, которые освобождают тромбоциты, образованием калликрейна и продуктами деградации фибрина. Наряду с влиянием эстераз и других протеаз на разрушенный фибрин лейкоциты и макрофаги фагоцитируют фибрин и клеточные остатки, скопившиеся в месте повреждения.

2. ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Правила забора крови для коагулологических исследований.

Для коагулологических исследований нужна венозная кровь. Капиллярная кровь имеет ограниченное значение как диагностический материал.

Желательно использовать системы для вакуумного забора крови (пробирка с 3,2-3,8% цитратом натрия - голубая крышка.).

Взятие крови для коагулологических исследований должно быть приурочено ко времени исследования (коагулограмма должна быть произведена в первые 2 часа). Во время венопункции длительность венозного стаза должно быть не более 1 минуты, а сила сдавления – ниже диагностического давления крови.

При прокалывании иглой сосуда тканевой тромбопластин попадает с током крови в пробирку, поэтому первые 1,5-2 мл крови не годятся для проведения коагулологических тестов. Не рекомендуется использовать при заборе крови шприц из-за опасности гемолиза.

В особых случаях можно использовать кровь, полученную из подключичного катетера, но при этом следует удалить первые 10-15 мл крови, а затем забрать кровь на исследование. Такой способ применим только в тех случаях, когда в катетер не вводится гепарин.

Материалом для коагулологических исследований является плазма. Антикоагулянт выбора для ее получения – 3,8% цитрат натрия. Для получения достоверных результатов обязательным является соотношение крови и антикоагулянта 9:1. Для получения богатой тромбоцитами плазмы необходимо отцентрифугировать цитратную кровь 10 мин при 1500 об/мин. Верхняя часть плазмы (75%) отбирается пластиковой пипеткой в закрывающуюся пластиковую пробирку. Затем, для получения бестромбоцитарной плазмы, взятую кровь еще раз необходимо отцентрифугировать 20-30 мин при 1500 об/мин.

Исследования должно быть выполнено тотчас после центрифугирования. Если тотчас невозможно, плазму можно сохранить при $t^0 - +4^0\text{C}$ не более 2 часов.

Для оценки первичного сосудистого – тромбоцитарного гемостаза используются следующие тесты:

1. Подсчет количества тромбоцитов (в норме $150-400 (420)\times 10^9/\text{л}$). Используются любой способ: в камере Горяева, в мазках, на анализаторе.
2. Время капиллярного кровотечения по Дьюке, по Айви, по Сухореву.
3. Определение резистентности микрососудов.
4. Исследование агрегации тромбоцитов.

Определение времени кровотечения.

По **Дьюке** – на ногтевой фаланге безымянного пальца наносится прокол на всю глубину скарификатора, включается секундомер, и через каждые 30 секунд на фильтровальную бумагу снимаются капельки крови до их исчезновения. Норма 2-4 мин. (до 5 мин.). Если это время удлинено, то можно думать о тромбоцитопении или тромбоцитопатии.

По **Айви** – определяется время кровотечения при повышении венозного давления до 45-50 мм рт ст. Одевают манжетку на плечо, нагнетают давление и на ладонной поверхности предплечья делают 3 насечки или прокола. Включают секундомер и выбирают то место, где дольше текла кровь. Норма 1-7 мин. Это время увеличено при тромбоцитопениях (менее $100\times 10^9/\text{л}$), при врожденных и приобретенных тромбоцитопатиях, лейкозах, уремии, опухолях печени, некоторых инфекционных заболеваниях, болезни

Виллебранда, гипофибриногенемии, применении аспирина, С-гиповитаминозе, гипофункции коры надпочечников. Время уменьшено при повышенной спастической способности капилляров.

Метод Сухорева – определяется начало свертывания, конец и диапазон, В норме начало свертывания 30 с - 2 мин., конец – 3-4-5 мин. Если удлинено начало свертывания, то можно думать о нарушении тромбоцитарного звена или дефиците факторов I фазы. Если начало в норме, а конец удлинен, то можно думать о недостатке фибриногена для образования сгустка или передозировке гепарина. Если и начало, и конец удлинены, то это значит, что что-то мешает образованию сгустка – это либо глубокая гипофибриногенемия, либо идет активация фибринолиза. Бывает, что нет начала и конца – при афибриногенемии, ДВС – синдроме.

Определение резистентности (ломкости) микрососудов

Манжеточная проба М.П. Кончаловского, Румпель-Леде

Принцип. Создают венозный стаз путем дозированного сжатия плеча манжетой от аппарата для измерения АД и подсчитывают число образовавшихся петехий в верхней части ладонной поверхности предплечья и локтевого сгиба. Если количество петехий превышает норму, то это говорит о снижении резистентности (повышенной ломкости) микрососудов.

Ход определения. На верхней части ладонной поверхности предплечья очерчивают круг диаметром 5 см. На плечо накладывают манжету от аппарата для измерения АД, соединяют ее с манометром и поддерживают в течение 5 мин давление на уровне 90 мм рт. ст. Затем манжету снимают и в течение 5 мин ждут восстановления кровообращения в конечности. После этого подсчитывают число петехий в очерченном круге. Учитывают и появление геморрагии вдоль нижнего края манжеты, которые в норме отсутствуют.

Чтение результатов. В норме число петехий у женщин не превышает 10, при 11-20 петехиях проба считается слабо положительной, при 20-30 петехиях - положительной, при 30 и более - резко положительной. У мужчин петехий в норме не возникают. Возможные причины положительной пробы: тромбоцитопения, тромбоцитопатии, гиповитаминоз С, болезнь Виллебранда, прием антикоагулянтов, гормональные сдвиги у женщин.

Исследование агрегации тромбоцитов

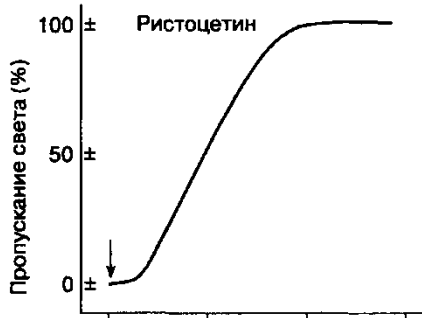
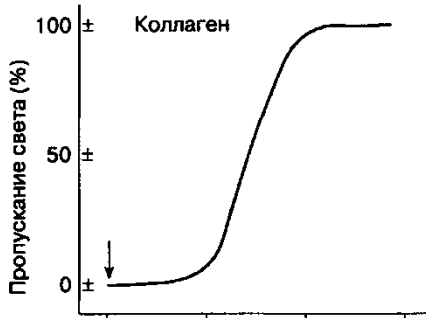
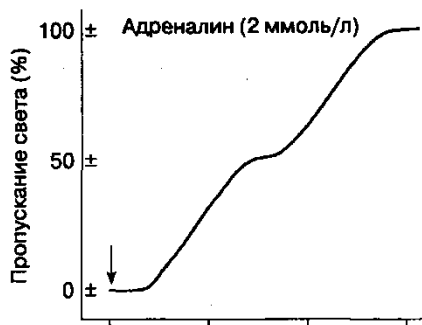
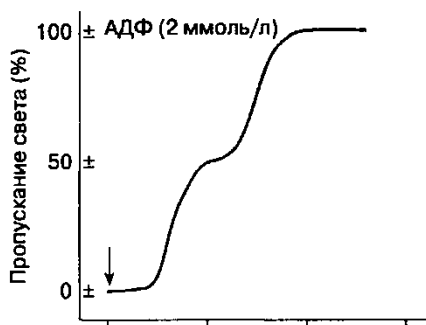
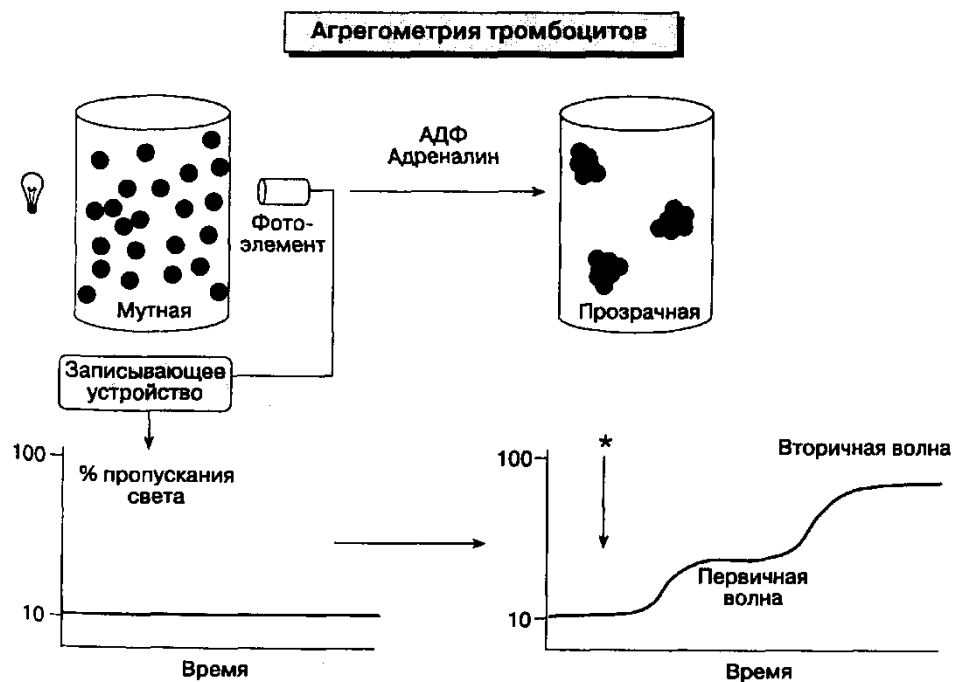
Количественное исследование агрегации тромбоцитов позволяет дифференцировать качественные нарушения тромбоцитов в отдельные группы. Это простой лабораторный тест, в котором конгломерация одиночных тромбоцитов в группы или агрегаты большего размера определяется количественно по степени пропускания света через тромбоцитосодержащую плазму. Тромбоцитарный агрегометр (рис. 5-3) состоит из небольшой прозрачной кюветы, в которую помещают пробу тромбоцитов пациента в стандартной концентрации. Через кювету пропускается свет от калиброванного источника, поступающий на фотоэлемент. Фотоэлемент связан с регистрирующим устройством, измеряющим светопрохождение (или оптическую плотность) с учетом времени. Если тромбоциты представляют собой суспензию одиночных клеток (т. е. до агрегации), то пропускание света минимально. С увеличением агрегации плазма, содержащая тромбоциты, становится все светлее, а пропускание света возрастает. Представить себе это явление можно, сравнивая прозрачность жидких суспензий, содержащих одну и ту же массу глины или в виде большого количества мелких частиц, или сконцентрированную в нескольких кусочках.

Агрегацию тромбоцитов *in vitro* можно инициировать, вводя различные экзогенные вещества (чаще всего АДФ, адреналин, коллаген, тромбин, арахидоновую кислоту и ристоцетин) в агрегометрическую кювету. АДФ, адреналин и тромбин обладают уникальной способностью вызывать агрегацию тромбоцитов самостоятельно, без обязательной дегрануляции клеток и экзоцитоза. Поэтому в низких концентрациях эти вещества будут стимулировать только обратимую первичную волну агрегации. При более высоких концентрациях АДФ, адреналина и тромбина тромбоциты полностью активируются и выделение гранулярного содержимого наряду с синтезом тромбоксана A_2 приводит к несколько отсроченной, но усиленной вторичной волне агрегации тромбоцитов. При еще больших концентрациях первичная волна агрегации погружается во вторичную волну и можно видеть только одну полную волну агрегации.

Хотя коллаген связывается с гликопротеином 1a тромбоцитарной мембраны, он не вызывает немедленной агрегации тромбоцитов. Однако спустя некоторое время коллаген индуцирует полную агрегацию в результате внутренней активации тромбоцитов. Способность арахидоновой кислоты стимулировать агрегацию зависит от функционирования фермента циклооксигеназы в ходе синтеза простагландинов.

Синтез тромбоксана A_2 из арахидоновой кислоты приводит к полной активации тромбоцитов, экзоцитозу и агрегации.

Уникальность ристоцетина состоит в том, что агрегация под его воздействием не опосредуется изменением метаболизма тромбоцитов. Поэтому в присутствии ристоцетина ФВ соединяет тромбоциты в большие агрегаты. Если тромбоциты жизнеспособны, индуцированная ристоцетином агрегация приводит к активации клеток и выделению эндогенных гранул. В отсутствие фактора Виллебранда активации не происходит.



Методы исследования вторичного гемостаза.

Тесты, отражающие активность I фазы свертывания крови.

1. Время свертывания по Ли-Уайту.

Характеризует внутренний процесс свертывания, зависящий от активации фактора XII при его контакте со стеклянной поверхностью пробирки до превращения растворимого фибриногена в нерастворимый фибрин.

Принцип метода: время от момента внесения в стеклянную пробирку 1 мл венозной крови до момента ее свертывания. Норма 5-10 мин при комнатной температуре. К удлинению ВСК приводят заболевания со значительным дефицитом факторов V, VIII, X, IX, XI, XII высокие дозы гепарина, циркулирующие вторичные (ПДФ) и патологические антикоагулянты. При врожденной или приобретенной афибриногенемии кровь вообще не свертывается.

Уменьшение ВСК – при гиперкоагуляции: состояния, сопровождающиеся большим выделением тканевого тромбопластина: обширные травмы и операции, ожоги, сепсис, эмболия околоплодными водами.

Это малочувствительный тест. Его используют в качестве ориентировочного теста у постели больного.

2. Время рекальцификации плазмы. Используется несколько модификаций.

1.Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) (каолин-кефалиновое время) – это основной тест, отражающий внутренний путь свертывания. Зависит от содержания в плазме факторов II, V, VIII, IX, X, XI, XII, фибриногена и не зависит от количества тромбоцитов и факторов III, VII.

Принцип: определяется время образования сгустка после добавления кефалина и каолина. Каолин используется для стандартизации контактной активации фактора XII, кефалин – для стандартизации фосфолипидно – мембранной активации 3-го тромбоцитарного фактора. Используется плазма бедная тромбоцитами. Норма 35-45 сек. Если больше 45 сек – склонность к кровотечениям; если меньше 35 сек – гиперкоагуляция и склонность к тромбозам.

Удлинение АЧТВ:

- Врожденный дефицит факторов II, VIII, V, IX, X, XI, XII.
- Присутствие антикоагулянтов: гепарина, ПДФ в крови.
- Болезнь Виллебранда.
- Нарушение функции печени.
- ДВС – синдром.
- Гипо- афибриногенемия

2.Активированное (каолиновое) время рекальцификации плазмы (авр).

Определяется время свертывания богатой тромбоцитами цитратной плазмы

при добавлении оптимального количества кальция в условиях стандартизации каолином контактной фазы процесса свертывания (активация XII, XI факторов). Норма 50-70 мин.

АВР плазмы характеризует свертываемость крови в целом. Удлинение АВР наблюдается при гемофилии, резко выраженных тромбоцитопениях, а также при увеличении антикоагуляционной активности крови (лечение гепарином).

3.Аутокоагулограмма. (акт). Тесты, отражающие активность II фазы свертывания.

Протромбиновое время

. Исследование таких показателей, как ПТИ (протромбиновый индекс) и МНО (международное нормализованное отношение), позволяет оценить состояние внешнего пути свертывания крови. ПТИ рассчитывается как отношение стандартного протромбинового времени (времени свертывания контрольной плазмы после добавления тканевого тромбопластина) к времени свертывания плазмы, выраженному в процентах. МНО – это стандартизованный в соответствии с международными рекомендациями показатель протромбинового теста. Он вычисляется по формуле: $MHO = \frac{\text{протромбиновое время пациента}}{\text{протромбиновое время контроля}}$ возвести в степень МИЧ, где МИЧ (международный индекс чувствительности) – коэффициент чувствительности тромбопластина относительно международного стандарта. МНО и ПТИ обратно пропорциональные показатели, то есть повышение МНО соответствует снижению ПТИ у пациента и наоборот.

Референсные значения ПТИ зависят от набора и характеристики реактивов и отличаются активностью используемого в тесте тромбопластина. Результаты определения МНО, благодаря стандартизации, позволяют сравнивать результаты разных лабораторий.

Анализы на ПТИ (или близкий ему показатель – протромбин по Квику) и

МНО в коагулограмме помогают выявить нарушения во внешнем и внутреннем путях свертывания крови, связанные с дефицитом или дефектом фибриногена (фактора I), протромбина (фактора II), факторов V (проакцелерина), VII (проконвертина), X (фактора Стюарта – Прауэр). При снижении концентрации данных факторов свертывания в крови протромбиновое время увеличивается по отношению к контрольным лабораторным показателям.

ПТИ (или протромбин по Квику) и МНО в коагулограмме используются для контроля за терапией варфарином у пациентов с факторами, способствующими тромбообразованию (например, при тромбозе глубоких вен, наличии искусственных клапанов, антифосфолипидном синдроме).

В норме коагулограммы у здорового человека МНО находится в пределах 0,8-1,2; у пациентов, находящихся на лечении непрямыми антикоагулянтами в целях профилактики тромбоэмболических осложнений, – 2,0-3,0, у пациентов с протезированными клапанами и антифосфолипидным синдромом – 2,5-3,5.

Активность факторов протромбинового времени(ПВ) выражают в секундах или протромбиновым индексом (ПТИ).

Принцип определения ПВ:к 100мкл бедной тромбоцитами плазмы добавляем 100мкл тромбопластин-кальциевой смеси изасекаем время образования сгустка.

$$\text{ПТИ (\%)} = \frac{\text{протромбиновое время донора}}{\text{протромбиновое время плазмы больного}} \times 100\%$$

ПВ характеризует состояние II фазы – образование тромбина. При нарушении этой фазы свертывания крови наряду с факторами протромбинового комплекса (II, V, VII, X) исследуют также факторы противосвертывающей системы и активность тромбина (толерантность плазмы к гепарину, антитромбин и тромбиновое время). При снижении активности факторов протромбинового комплекса определяют каждый фактор специальными методами.

ПТИ используют для диагностики тромбоцитопенических и геморрагических состояний.

Содержания протромбина в крови связано с функцией печени. При заболеваниях, сопровождающихся пониженным усвоением витамина К из кишечника или нарушении функции клеток паренхимы печени, содержание протромбина снижается (цирроз печени, вирусный гепатит, декомпенсированные пороки сердца с застойными явлениями, метастазы в печень).

Снижение активности факторов протромбинового комплекса наблюдается также у больных с активной фазой ревматизма без выраженной недостаточности кровообращения, при эмфиземе легких, сопровождающейся НК₁, при посттрансфузионном шоке.

Удлинение ПВ при нормальном содержании в плазме фибриногена и нормальном тромбиновом времени свидетельствует о дефиците одного или нескольких факторов протромбинового комплекса. При гипо- и дисфибриногемии, а также при избытке в крови антикоагулянтов удлинение ПВ может сочетаться с удлинением ТВ.

Повышение активности факторов протромбинового комплекса отмечается у больных гипертонической болезнью, при злокачественных опухолях, выраженном атеросклерозе, ИБС, тромбозах, при передозировке витамина К.

Тесты, отражающие активность III фазы свертывания.

1. Тромбиновое время.

Определяется время свертывания плазмы при добавлении тромбина (100 мкл

бедной тромбоцитами плазмы пациента + 100 мкл тромбина), активность которого стандартизирована на плазме доноров. Тромбин готовят

так, чтобы он вызвал свертывание плазмы донора за 14-16 мин. Норма 10-15 мин. В тромбиновом тесте оценивается III фаза процесса свертывания крови по времени коагуляции цитратной плазмы под влиянием стандартного

количества тромбина.

ТВ – это показатель перехода фибриногена в фибрин. Оно не зависит от внешней и внутренней систем активации, но зависит от концентрации фибриногена, активности антитромбина, процессов полимеризации и стабилизации фибрина.

Тромбиновое время удлиняется при:

- гипофибриногенемии,
- ДВС-синдроме,
- гепатитах, циррозе печени,
- афибриногенемии,
- введении гепарина,
- фибринолитической терапии,
- парапротеинемии,
- дефиците XIII фактора свертывания.

Тромбиновое время укорачивается при тромбозах, тромбоэмболиях.

2. Определение содержания фибриногена в плазме.

Фибриноген в плазме крови можно определять гравиметрическим и хронометрическим методом. Гравиметрический метод – количество образовавшегося фибрина пропорционально концентрации фибриногена в плазме; хронометрический – время образования сгустка при добавлении

избытка тромбина имеет линейную зависимость от содержания фибриногена. Норма 2-4 г/л.

Количество фибриногена в плазме физиологически увеличивается во время беременности и менструации.

Уровень фибриногена как белка острой фазы возрастает при острых и затяжных воспалительных, иммунных и деструктивных процессах, обширных оперативных вмешательствах, ожогах, травмах. Снижение фибриногена в таких ситуациях может свидетельствовать об активации фибринолиза или развитии ДВС-синдрома.

К значительному росту фибриногена приводят заболевания почек (пиелонефрит, гломерулонефрит, гемолитико-уремический синдром), коллагенозы, ночная пароксизмальная гемоглобинурия, новообразования.

Снижение концентрации фибриногена в плазме наблюдается при врожденном дефиците фибриногена, печеночно-клеточной недостаточности, ДВС-синдроме, инфекционном мононуклеозе, применении стрепто- и урокиназы.

Тесты паракоагуляции

Эти тесты служат для обнаружения РКМФ.

Этаноловый и протаминсульфатный тесты. Принцип: при наличии в плазме РКМФ добавление к плазме этанола или протамина сульфата ведет к образованию геля. В норме эти тесты отрицательны.

Положительный этаноловый тест указывает на наличие РКМФ с фибриногеном, а положительный протаминсульфатный тест – на наличие РКМФ с ранними ПДФ, что отмечается при массивном тромбозе, гиперкоагуляционной стадии ДВС-синдрома. Положительный протаминсульфатный тест на фоне отрицательного этанолового теста указывает на активацию фибринолиза и прогрессирование ДВС-синдрома.

Оценка состояния фибринолитической системы.

Большинство методов основано на определении лизиса фибрина. Наибольшее значение в физиологическом фибринолизе имеет лабильное, быстро действующее звено фибринолитической системы, под влиянием которого лизис фибрина наступает в первые часы инкубации.

Принцип: при растворении фибринового сгустка форменные элементы крови выпадают в осадок. Зная гематокрит исследуемой крови и количество форменных элементов, оставшихся в сгустке, рассчитывают ФАК в %, в норме 10-25%.

Активация плазминогена в организме происходит у больных в послеоперационном периоде, особенно после операций на матке, легких, поджелудочной железе, простате, при шоковых состояниях, электротравме, ожогах, во время приступов эпилепсии.

Циррозы печени, злокачественные опухоли, лейкозы, ревматизм, лучевая болезнь, анемии, травмы сопровождаются увеличением ФАК.

Снижение ФАК является одним из показателей предтромботического состояния и тромбообразования. Это плохой прогностический признак у больных инфарктом миокарда. Фибринолиз снижен у больных атеросклерозом, ГБ, туберкулезом, эндокардитом.

Лабораторный контроль назначения гепарина.

В клинической практике применяются:

1. Нефракционированный (стандартный) гепарин – антикоагулянтное действие связано со способностью катализировать антитромбин III, ингибировать тромбин и Ха фактор в равной степени и в меньшей степени факторы IX, XI, XII.
2. Низкомолекулярный (фракционированный) гепарин – более выражена активность в отношении X фактора.
3. Гепариноиды:
 - сулодексид – для перорального приема, антикоагулянтное действие связано с усилением активации как антитромбина III, так и гепаринового кофактора II.
 - дапапароид – его активность превышает антитромбиновую более чем в 20 раз.
4. Непосредственные (прямые) ингибиторы тромбина: гирудин, гирулог и др.

Применение нефракционированного гепарина и контроль за лечением.

При применении гепарина в низких дозах (менее 20000 Ед/сут) мониторинг терапии не требуется.

При использовании гепарина в средних дозах (20-30 тыс. Ед/сут) для мониторинга терапии используется определение АЧТВ перед очередным введением и спустя 4-6 часов; результаты теста должны находиться в пределах 1,2-1,5 кратного увеличения референтных величин.

В терапевтических дозах (более 30000 Ед/сут) гепарин используется внутривенно для лечения артериальных и венозных тромбозов и тромбоэмболий в виде:

- непрерывной инфузии – вначале 5000 Ед вводят болюсом, затем начинают введение 1000 Ед/ч с помощью автоматического дозатора. АЧТВ определяют через 6 часов после введения болюса;
- прерывистого введения – по 5-7,5 тыс. Ед каждые 4 часа или по 7,5-10 тыс. Ед каждые 6 часов, мониторинг терапии по АЧТВ-тесту проводится перед очередным введением. Подбор дозы осуществляется так, чтобы АЧТВ не снижалось менее 1,5 раз и не превышало более чем в 4 раза референтных величин.

В качестве антикоагулянта для поддержания жидкого состояния крови, гепарин применяется при экстракорпоральном кровообращении, гемодиализе, гемофильтрации по 5-10 тыс. Ед внутривенно, если

длительность процедуры 3-4 часа и 500-1000 Ед/ч при более продолжительной процедуре. АЧТВ следует поддерживать на уровне 2-2,5 кратного увеличения от референтных величин.

Для мониторинга гепаринотерапии также могут быть использованы:

- время свертывания крови по Ли-Уайту – тест не чувствительный к низким концентрациям гепарина, при достижении антикоагулянтного эффекта увеличивается в 1,5-3 раза от нормы.
- тромбиновое время – очень чувствительный тест к назначению малых и средних доз, не эффективный при высоких концентрациях гепарина.

Мониторинг терапии непрямыми антикоагулянтами.

Непрямые антикоагулянты являются конкурентными антагонистами витамина К и нарушают образование в печени γ -карбоксихлоридов, который входит в состав II, VII, IX, X факторов. Скорость снижения концентрации этих факторов в крови зависит от периода их циркуляции в организме: сначала уменьшается содержание фактора VII, затем IX, X и протромбина – через 4-7 дней их концентрация достигает одинакового уровня.

Из препаратов предпочтение отдают производным кумарина, в частности, варфарину, реже используются препараты пирандионовой группы. Обычно, лечение начинают со средней поддерживающей дозы, которая обеспечивает достижение необходимой гипокоагуляции в течение недели. Для мониторинга терапии используется определение протромбинового времени, результат которого выражается в виде протромбинового индекса. ПТВ следует определять ежедневно (в крайнем случае, через день), пока не будет подобрана индивидуальная поддерживающая доза и не станут стабильными показатели теста, затем 1 раз в неделю в течение первого месяца лечения, и в дальнейшем 1-2 раза в месяц.

Во время подбора дозы периодически следует определять АЧТВ, его значения должны в 1,5-2 раза превышать референтные величины. Меньшие результаты свидетельствуют о недостаточном уровне гипокоагуляции, что может наблюдаться при гиперактивации факторов внутреннего пути, чаще VIII. В этом случае следует несколько увеличить дозу препарата или временно усилить лечение назначением гепарина. Увеличение АЧТВ более, чем в 2 раза резко усиливает риск кровотечения, что требует снижения дозы препарата или прекращения терапии непрямыми антикоагулянтами.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Практика лабораторных биохимических исследований: учебное пособие. Пустовалова Л.М. – Ростов н/Д.: Феникс, 2014
2. Теория лабораторных биохимических исследований (основы биохимии): учебное пособие. Пустовалова Л.М. – Ростов н/Д.: Феникс, 2014
3. Теория и практика лабораторных биохимических исследований учебник/Н.В.Любимова, И.В.Бабкина, Ю.С.Тимофеев-М.: ГЭОТАР-Медиа, 2020. 416 с.: ил.
4. Лабораторная диагностика нарушений гемостаза. Учебное пособие/И.В.Тарасюк, Е.Г.Жукова: Гомель ГоГМИ 2003. 46 с.

Задания для самоконтроля

Тестовые задания по разделу липидный обмен:

1. Система гемостаза включает:

- А. Факторы фибринолиза
- Б. Плазменные факторы
- В. Антикоагулянты
- Г. Тромбоциты
- Д. Все перечисленное**

2. Гемостатическим потенциалом обладают:

- А. Плазма
- Б. Эритроциты
- В. Тромбоциты
- Г. Эндотелий сосудов
- Д. Все перечисленное**

3. Инициатором начала свертывания крови является:

- А. Фактор I
- Б. Фактор X
- В. Фактор XII**
- Г. Прекалликреин
- Д. Протромбин

4. В протромбиназообразовании принимает участие освобождающийся из тромбоцитов:

А. Фактор 3

Б. Фактор4

В. Актомиозин

Г. Тромбоксан

Д. Все перечисленное верно

5. Индуктором агрегации тромбоцитов является:

А. Аспирин

Б. АМФ

В. АДФ

Г. Мочевина

Д. Протромбин

6. Активатором тромбоцитов не является:

А. Тромбин

Б. АДФ

В. Коллаген

Г. АТФ

Д. Тромбоксан

7. Печень не принимает участие в синтезе:

А. Фактора III

Б. Фактора VII

В. Фибриногена

Г. Протромбина

Д. Фактора IX

8. Витамин “К” влияет на синтез:

А. Протромбина

Б. Фибриногена

В. Фактора III

Г. Фактора XII

Д. Прекалликреина

9. Внешний механизм гемостаза включает активацию:

А. Фактора VII

Б. Фактора VIII

В. Фактора IX

Г. Фактора XII

Д. Высокмолекулярного кининогена

10. Тромбоцитарно-сосудистому гемостазу принадлежит функция:

А. Протеолиза

Б. Адгезивно-агрегационная

В. Гидролиза

Г. Лизиса эуглобулинов

Д. Фибринолиза

11. Кефалин в методике АЧТВ выполняет роль:

А. Фибриногена

Б. Тромбина

В. Фактора 3

Г. Фактора XII

Д. Калликреина

12. В тромбоцитах синтезируется:

А. Простаглицлин

Б. Тромбоксан

В. Протеин "С"

Г. Фактор VII

Д. Протромбин

13. Антикоагулянтом является:

А. Плазминоген

Б. Фактор III

В. Антитромбин III

Г. Стрептокиназа

Д. АДФ

14. Ретракция кровяного сгустка определяется функцией:

А. Плазменных факторов

Б. Тромбоцитов

В. Кининовой системы

Г. Системы комплемента

Д. Протеолитической системы

15. Тромбинообразованию препятствуют:

А. Ионы кальция

Б. Кининоген высокой молекулярной массы

В. Фактор Виллибранда

Г. Антикоагулянты

Д. Фибриноген

16. Протромбинаобразование по внешнему пути следует контролировать:

- А. Агрегацией тромбоцитов
- Б. Определением фибриногена
- В. Активированным частичным тромбопластиновым временем
- Г. Протромбиновым временем**
- Д. Временем кровотечения

17. Определение антитромбина III в плазме используется для:

- А. Диагностики коагулопатии потребления при ДВС-синдроме
- Б. Выявления резистентности к гепарину
- В. Выявления наследственной тромбофилии
- Г. Диагностики гиперкоагуляции при приеме оральных контрацептивов
- Д. Всего перечисленного**

18. Этапом формирования фибрина из фибриногена не является:

- А. Образование протромбиназы**
- Б. Отщепление фибринопептидов "А" и "В"
- В. Образование фибрин-мономеров
- Г. Полимеризация фибрин-мономеров до фибрин-полимера
- Д. Стабилизация фибрина фибриназой

19. К патологическому состоянию, протекающему преимущественно с гипокоагуляцией, относится:

- А. Атеросклероз
- Б. Болезнь Виллебранда**
- В. Облитерирующий эндартериит
- Г. Злокачественные новообразования
- Д. Тромбофлебит

20. Причинами снижения антитромбина III в плазме являются:

- А. Уменьшение синтетической активности печени с возрастом и при циррозе печени
- Б. Потребление при ДВС-синдроме
- В. Избыток введения гепарина
- Д. Врожденная недостаточность синтеза
- Д. Все перечисленное верно**

21. Снижение фибриногена в плазме не наблюдается при:

- А. Наследственном дефиците функции фибриногена
- Б. Циррозе печени
- В. ДВС-синдроме
- Г. Острой фазе воспаления**
- Д. Повышении неинaktivированного плазмينا

22. Определение продуктов деградации фибрина (ПДФ) в плазме показано для:

- А. Контроля за лечением фибринолитиками
- Б, мониторинга использования активаторов плазминогена при лечении тромбозов
- В. Диагностики ДВС-синдрома
- Г. Все перечисленное верно**
- Д. Все перечисленное неверно

23. Причиной снижения плазминогена в плазме могут быть следующие факторы:

- А. Наследственные дефекты синтеза
- Б. Цирроз печени
- В. Первичный фибринолиз
- Г. Потребление при ДВС-синдроме
- Д. Все перечисленное**

24. Внешний путь протромбинаобразования следует контролировать:

- А. Тромбиновым временем
- Б. Фактором XIII
- В. Толерантностью плазмы к гепарину
- Г. Протромбиновым временем**
- Д. Анитромбином III

25. Фибринообразование следует контролировать:

- А. Фибриногеном**
- Б. Протромбиновым временем
- В. Активированным частичным тромбопластиновым временем
- Г. Антитромбином III
- Д. Определением протеина С

26. Активность фибринолитической системы следует контролировать:

- А. Антитромбином III
- Б. Тромбиновым временем

- В. Протромбиновым временем
- Г. Лизисом эуглобулинов**
- Д. Агрегацией тромбоцитов

27. Активатором фибринолиза является:

- А. Коллаген
- Б. Антитромбин III
- В. Липопротеиды
- Г. Стрептокиназа**
- Д. Кининоген

28. Гепаринотерапию можно контролировать:

- А. Активированным частичным тромбопластиновым временем**
- Б. Лизисом эуглобулинов
- В. Ретракцией кровяного сгустка
- Г. Концентрацией фибриногена
- Д. Агрегацией тромбоцитов

29. Контроль за антикоагулянтами непрямого действия можно осуществлять определением:

- А. Протромбина по Квику (% от нормы)
- Б. Международного нормализованного отношения
- В. Протромбинового индекса
- Г. Протромбинового времени
- Д. Все перечисленное верно**

30. Для выявления тромбоцитов необходимо исследовать:

- А. Адгезивно-агрегационную функцию тромбоцитов
- Б. Количество тромбоцитов**
- В. Фибриноген
- Г. Тромбиновое время
- Д. Бета-тромбоглобулин

31. Для выявления тромбоцитопатии необходимо исследовать:

- А. Агрегационную функцию тромбоцитов
- Б. Адгезивную функцию тромбоцитов
- В. Фактор 3 тромбоцитов
- Г. Время кровотечения
- Д. Все перечисленное**

32. Коагулопатия потребления развивается при:

- А. Гемофилии

- Б. ДВС-синдроме**
- В. Болезни Виллебранда
- Г. Тромбастении Гланцмана
- Д. Болезни Хагемана

33. Для гемофилии характерно:

- А. Удлинение АЧТВ**
- Б. Укорочение АЧТВ
- В. Удлинение протромбинового времени
- Г. Снижение фибриногена
- Д. Положительный этаноловый тест

34. Для поражения гепатоцитов наиболее типично:

- А. Повышение фибриногена
- Б. Снижение активности факторов II, VII, IX, X**
- В. Снижение активности фактора VIII
- Г. Повышение антитромбина III
- Д. Тромбоцитопения

35. Обмен витамина К нарушается при:

- А. Меноррагиях
- Б. Заболеваниях почек
- В. Носовых кровотечениях
- Г. Инфаркте миокарда
- Д. Паренхиматозном гепатите**

36. Удлинение протромбинового времени не наблюдается при:

- А. Авитаминозе "К"
- Б. Паренхиматозном гепатите
- В. Лечении непрямыми антикоагулянтами
- Г. Гемофилии А**
- Д. Гипофибриногенемиях

37. При гемофилии имеется дефицит факторов:

- А. Плазмы**
- Б. Тромбоцитов
- В. Лейкоцитов
- Г. Эндотелия сосудов

Д. Фибринолиза

38. В эндотелии сосудов синтезируется:

А. Протромбин

Б. Простациклин

В. Тромбоксан

Г. Фактор IX

Д. Витамин К

39. Диагностическое значение определения фибриногена:

А. Фактор коагуляции, вязкости крови

Б. Независимый риск-фактор инфаркта миокарда и инсульта

В. Острофазный белок

Г. Кофактор агрегации тромбоцитов

Д. Все перечисленное верно

40. АЧТВ удлиняется в следующих случаях, кроме:

А. Гемофилии А, В, С

Б. Передозировки антикоагулянтов непрямого действия

В. Дефицита VII фактора

Г. Наличии ингибиторов свертывания крови (гепарин, продукты деградации фибриногена)

Д. Снижении концентрации фибриногена

41. Протромбиновое время удлиняется в следующих случаях:

А. Врожденный дефицит факторов II, V, VII, X

Б. Хроническое заболевание печени

В. Дефицит витамина К

Г. Гипофибриногенемия

Д. Все перечисленное верно

42. Активация фибринолиза (время лизиса эуглобулинов сокращено) наблюдается в следующих случаях:

А. ДВС-синдром

Б. Массовых тромбозах

В. Оперативное вмешательство на простате, ткани легких

Г. Шок

Д. Всех перечисленных случаев

43. Проба на продукты деградации фибрина (ПДФ) положительная при:

- А. ДВС-синдроме
- Б. Массивном тромбозе
- В. Лечении фибринолитическими средствами
- Г. Все перечисленное верно**
- Д. Все перечисленное неверно

44. Коагулограммой называется:

- А. Направление на исследование системы гемостаза
- Б. Определение протромбинового времени
- В. Исследование агрегационных свойств тромбоцитов
- Г. Набор гемокоагулологических тестов, отвечающих на поставленную клиницистом задачу**
- Д. Проведение исследований гемостаза на коагулометре

45. Комплексная оценка гемостаза должна включать:

- А. Исследование тромбоцитарно-сосудистого звена
- Б. Исследование плазменного звена
- В. Исследование фибринолитической системы
- Г. Исследование антикоагулянтного потенциала
- Д. Все перечисленное верно**

46. АЧТВ отражает:

- А. Состояние тромбоцитарного звена гемостаза
- Б. Состояние фибринолитической системы
- В. Внутренний путь активации протромбиназы**
- Г. Состояние антикоагулянтного звена
- Д. Реологические свойства крови

47. Международным требованиям контроля антикоагулянтов непрямого действия является определение:

- А. Протромбинового отношения
- Б. Протромбинового времени
- В. Протромбинового индекса
- Г. Протромбина по Квику
- Д. Международного нормализованного отношения**

48. Геморрагическими заболеваниями (синдромами) считаются:

- А. Заболевания, сопровождающиеся кровоточивостью**

- Б. Заболевания, сопровождающиеся усилением агрегационных свойств тромбоцитов
- В. Снижение фибринолитической активности
- Г. Снижение антикоагулянтного потенциала
- Д. Повышение продукции фактора фон Виллебранда

49. В направлении на коагулологическое исследование необходимо указать:

- А. ФИО, возраст больного
- Б. Клинический диагноз
- В. Наличие геморрагических или тромботических проявлений
- Г. Проводимое лечение
- Д. **Все перечисленное верно**

50. Ошибка при исследовании гемостаза может возникнуть из-за:

- А. Гемолиза
- Б. Присутствия гепарина
- В. Неправильного соотношения антикоагулянта и крови
- Г. Нестабильной температуры
- Д. **Все перечисленное верно**

Задачи по теме :

1. Рассчитать протромбиновый индекс, если известно ПВ пациента и ПВ контрольной плазмы.

2. Рассчитать МНО, если известно ПВ пациента и ПВ контрольной плазмы, МИЧ.