



Биохимические методы исследования

План лекции

- Методы биохимического исследования.
- Аналитические методы и методы разделения.
- Фотометрия, электрофорез, хроматография, автоматизированные методы исследований.
- Основные методы исследования состава биологических жидкостей

Биохимические методы исследования.

Актуальность и виды.

- * Проводятся для получения информации о многочисленных химических и физико-химических процессах, протекающих в клетках и тканях живых организмов в норме и при патологии.
- * Составляют свыше 1/3 всех лабораторных исследований.
- * Чаще всего биохимические лаборатории выполняют «**базовые**» (наиболее часто требуемые врачами) тесты (мочевина, электролиты, тесты функции печени и т.д.).
- * Ряд **специальных** исследований для диагностики редких заболеваний может выполняться только в крупных лабораториях или диагностических центрах.
- * Еще группа биохимических исследований связана с необходимостью срочного принятия решения в экстренных ситуациях – **ургентные тесты**

Объекты биохимических методов исследования.

- * При различных патологических состояниях происходят изменения химического состава в клетках, тканях, биологических жидкостях и выделениях.
- * Наиболее часто биохимическому анализу подвергают кровь, мочу, кал, слюну, ликвор, желчь и желудочный сок.
- * Реже исследуют химический состав красного костного мозга, околоплодной жидкости, пота, рвотных масс, волос, ногтей и спермы.

Качественные и количественные биохимические тесты

- * Химический состав биологического материала может изменяться как количественно (увеличение или понижение содержания каких-либо веществ, нарушение соотношения между ними), так и качественно (выявление отсутствующих или не определяющихся в норме веществ).
- * В связи с этим биохимический анализ в некоторых случаях проводят прицельно, определяя уровень вещества в исследуемом материале или выявляя только его присутствие.
- * Существует группа полуколичественных тестов, которые ориентировочно определяют концентрацию исследуемого вещества в пробе

«Мокрый» анализ и сухая химия

- * Количественное определение исследуемых компонентов проводится обычно «мокрым» анализом, когда и исследуемые вещества и химические реагенты находятся в растворенном состоянии.
- * Для полуколичественных и иногда количественных определений используется также метод «сухого» анализа,
- * Разработанные для этих целей тест-полоски, имеют довольно сложное строение и состоят из нескольких слоев.
- * В наружном слое происходит отделение сыворотки от форменных элементов.
- * Сыворотка затем проникает в нижележащие слои, содержащие химические реагенты, которые отделены друг от друга.
- * Изменение окраски продуктов реакции регистрируется с помощью отражательного фотометра.

Диагностические полоски

- * Для качественной оценки или полуколичественных определений широко используются диагностические полоски, которые позволяют определять в биологических жидкостях различные вещества (белки, углеводы, кетоновые тела, желчные пигменты и др.).
- * Полоску опускают в биологическую жидкость, затем извлекают, подсушивают фильтровальной бумагой и прикладывают к цветной стандартной шкале.
- * Сравнивают окраски и делают вывод о наличии определенных веществ и их примерном содержании

Диагностические полоски. Принцип работы. Иммунохроматографический анализ.

- * Принцип действия состоит в том, что при погружении тест-полоски в биологическую жидкость (или другой жидкий образец), она начинает мигрировать вдоль полоски по принципу тонкослойной хроматографии.
- * Вместе с ней движутся нанесенные на нижнюю часть тест-полоски меченые специфические антитела, которые аффинно связываются с анализируемым веществом

Электрофорез

- * **Электрофорез** – процесс разделения заряженных частиц в электрическом поле.
- * Многие биологически важные молекулы (белки, аминокислоты, нуклеиновые кислоты и др.) имеют в своем составе ионизирующие группы.
- * Поэтому в биологических жидкостях (крови, лимфе и др.) они существуют в виде катионов и анионов.
- * Молекулы имеющие примерно одинаковый заряд могут отличаться молекулярными массами и отношением заряда к массе.
- * На этих различиях и основано разделение ионов при движении их в растворе под действием электрического поля.

Классификация электрофореза в зависимости от целей исследования

- * **Аналитический;**

- * Чаще используют в клинико-биохимических исследованиях
- * Позволяет работать с очень небольшими количествами исследуемого вещества и вести их количественное определение.

- * **Препаративный.**

- * Используется когда требуется получить большое количество изучаемого вещества, необходимого для дальнейших исследований

Хроматография

- * Метод разделения и определения веществ, основанный на распределении компонентов между двумя фазами – подвижной и неподвижной.
- * Неподвижной (стационарной) фазой служит твердое пористое вещество (часто его называют сорбентом) или пленка жидкости, нанесенная на твердое вещество.
- * Подвижная фаза представляет собой жидкость или газ, протекающий через неподвижную фазу, иногда под давлением.

Оптические методы анализа

- * **Фотометрия** – совокупность оптических методов и средств измерения фотометрических величин светового потока. Основным понятием фотометрии является поток излучения, смысл которого в мощности переносимого электромагнитного (оптического) излучения.
- * **Спектрофотометрия** – определение зависимости фотометрических величин от длины волны излучения.
- * **Спектроскопия или эмиссионный спектральный анализ** – определение излучательной способности веществ в зависимости от длины волны излучения.

Определение концентрации веществ фотометрическими методами

- * Методы основаны на переведении определяемых компонентов в поглощающие свет соединения с последующим определением их количеств путем измерения светопоглощения растворов.
- * Измерение проводится при помощи фотоэлектрических приемников оптического излучения – приборов, превращающих световую энергию в электрическую.
- * Если измерение ведется без выделения узкого диапазона длин волн (измеряются характеристики всего светового потока), то такой метод анализа часто называется **колориметрическим**.
- * Если же выделяется характерный для поглощения данным веществом оптический диапазон и измерение проводится на определенной длине волны, тогда говорят о собственно **фотометрическом** методе анализа.
- * Фотометрический метод является более объективным методом, чем колориметрический, поскольку результаты его меньше зависят от поглощения света другими (интерферирующими) окрашенными веществами.

Фотометрические методы определения концентрации вещества в растворе

- * Метод градуировочного графика** (готовят серию из 5–8 стандартных растворов разных концентраций, охватывающих весь диапазон концентраций)
- * Метод сравнения оптических плотностей стандартного и исследуемого растворов** (нужны стандарты/калибраторы).

Приборы для фотометрических измерений

* Фотоколориметры

- * В колориметрах нужные спектральные диапазоны выделяются при помощи светофильтров, ограничивающих участки спектра, в которых могут проводиться измерения.

* Спектрофотометры.

- * В спектрофотометрах участки спектра выделяются при помощи призм или дифракционных решеток, что позволяет устанавливать любую длину волны в заданном диапазоне.

Фотометрические свойства растворенного вещества

- * Фотометрические свойства растворенного вещества характеризуются:
 - * коэффициентом пропускания T (τ),
 - * коэффициентом отражения R (ρ),
 - * коэффициентом поглощения A (α),
- * Они для одного и того же вещества связаны соотношением $T + R + A = 1$.
- * Определение безразмерных величин T , R и A выполняется с помощью фотометров путем регистрации реакций приемника оптического излучения на соответствующие потоки излучения.
- * В рутинной лабораторной практике принято обозначать приборы, регистрирующие поглощение света веществом, **фотометрами**, отражение – отражательными **фотометрами**

Масс-спектрометрия

* Принцип распознавания аналита

- * Воздействие химической ионизации, электронной пушки, тока высокого напряжения, нагревания на молекулы аналита

* Генерация сигнала:

- * Образование ионов с различной молекулярной массой и зарядом, разделение их с помощью электрических и магнитных полей. Величина сигнала зависит от количества ионов в определенной зоне

Плазменная фотометрия

- * **Принцип распознавания аналита**
 - * Воздействие высокотемпературного пламени на молекулу аналита
- * **Генерация сигнала:**
 - * Ионизация молекул. Испускание света специфической длины волны, окрашивание пламени

Электрохимические процессы на границе раздела фаз на электроде, погруженного в раствор, погруженный в аналит

- * **Потенциометрия** - Изменение структуры или концентрации аналита. Изменение электрического потенциала
- * **Кулонометрия** - Изменение количества вещества, выделяющегося на электроде. Изменение количества электричества, проходящего между двумя электродами в электрохимической ячейке
- * **Кондуктометрия** - Изменение электропроводности между двумя электродами

Иммунологические методы в биохимии

- * ИФА, иммунодиффузия, иммуноэлектрофорез, иммунотурбидиметрия
- * Применяются в биохимии все чаще
- * Определяют не активность, а концентрацию веществ

Автоматизация гематологических исследований

- * В современных автоматических устройствах для гематологического анализа используются в основном два технологических принципа – **кондуктометрический и оптический**.
- * Основными параметрами, которые позволяют определять современные гематологические анализаторы, являются: количество лейкоцитов, эритроцитов, тромбоцитов, содержание гемоглобина, показатель гематокрита, объем эритроцита, содержание гемоглобина в эритроците, лейкограмма и др.

Кондуктометрический принцип гематологических исследований

- * Заключается в изменении сопротивления клетки в постоянном электрическом поле.
- * Фиксируется момент прохода через отверстие малого диаметра (апертуру) клеток крови.
- * По обе стороны отверстия располагаются электроды с поданным на них напряжением. При протекании через отверстие чистого раствора электролита сопротивление в цепи мало, но в момент прохождения через апертуру клетки оно резко возрастает, что приводит к увеличению напряжения в цепи.
- * Импульсы скачкообразного изменения напряжения фиксируются и подсчитываются специальным датчиком.
- * Специальный прибор (дискриминатор) пропускает импульсы заранее заданной амплитуды, что позволяет регистрировать клетки в зависимости от их размера.
- * О количестве однотипных частиц судят по числу импульсов, возникающих при прохождении клеток крови через апертуру строго определенного размера.

Оптический принцип определения клеток крови

- * Имеет измерение величины светопоглощения или светорассеивания.
- * В анализаторах этого типа регистрируются электрооптические импульсы, возникающие при прохождении клеток крови в луче светового потока.
- * Интенсивность импульса прямо пропорциональна размеру исследуемых частиц.
- * Световой луч фокусируется на капилляр, через который проходят клетки, в результате чего происходит либо светопоглощение, либо светорассеяние светового потока.
- * Величина светопоглощения или светорассеяния обусловлена размером, формой и структурой клеток крови.

Радиочастотный анализ при исследовании клеток крови

- * Под действием токов высокой частоты, клетки в момент прохождения ими апертуры посылают сигналы, амплитуда которых зависит от размеров ядра, его плотности, характера цитоплазматических включений.
- * Перед подсчетом лейкоцитов вызывают гемолиз эритроцитов гипотоническим раствором, подсчет тромбоцитов проводят после осаждения эритроцитов.

Автоматические и полуавтоматические гематологические анализаторы

- * В зависимости от типа анализаторов они делятся на:
 - * полуавтоматические, где подготовка пробы к исследованию (ее взятие, разбавление соответствующими растворами) производится вручную
 - * полностью автоматические, где все эти процедуры проводятся в автоматическом режиме.

Автоматизация биохимических исследований

- * По аналогии с гематологическими, существуют полуавтоматические и автоматические биохимические анализаторы.
- * При использовании полуавтоматического прибора реагенты и биопроба смешиваются оператором и подаются в пробозаборник, прибор измеряет оптическую плотность смеси и по заданной программе рассчитывает концентрацию аналита.
- * При использовании полностью автоматического анализатора необходимо запрограммировать его на необходимые виды анализа, ввести порядок установки проб пациентов на борту прибора и загрузить эти пробы, а также наборы реагентов на борт анализатора. По прошествии времени, необходимого для анализа, прибор выдает результат в печатном и электронном виде.



Вопросы?