



Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Волгоградский государственный медицинский
университет»

Министерства здравоохранения Российской
Федерации

Кафедра клинической лабораторной диагностики

Биохимические методы исследования

Биохимический анализ

- ▶ Лабораторный метод исследования, использующийся в медицине, по результатам которого можно судить о функциональном состоянии органов и систем организма человека. Биохимический анализ помогает поставить диагноз, назначить и скорректировать лечение, а также определить стадию заболевания.

Биологический материал

Для анализа чаще всего используется сыворотка крови пациента (в редких случаях – плазма)

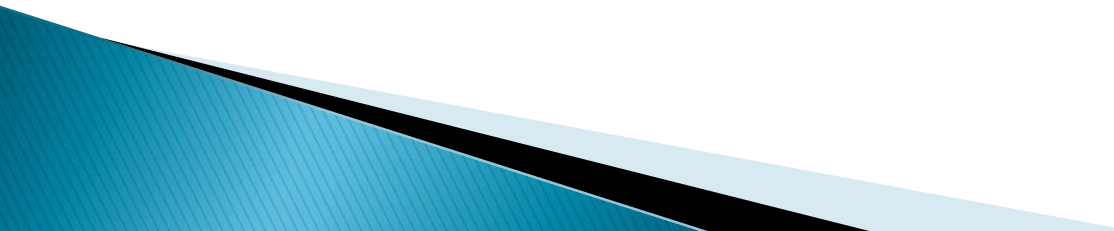
Моча (определение белка, креатинина)

Реже – ликвор, слюна, желчь, желудочный сок и т.д.

Суть метода

- ▶ Основан на цветной реакции между компонентами сыворотки и специфическими реагентами или колорантами.
- ▶ Например, белок крови и двухвалентная медь (CuSO_4) в щелочной среде образуют окрашенный комплекс.
- ▶ Детекция результатов – фотометрия.

Виды исследований

- ▶ Ручной метод
 - ▶ Полуавтоматический метод
 - ▶ Автоматический метод
- 

Ручной метод

- ▶ Вручную смешиваем реагенты, засекаем время инкубации и помещаем кювету с реакционной смесью в фотометр для детекции.
- ▶ На экране прибора получаем оптическую плотность, которую вручную необходимо пересчитать в единицы концентрации.

Колориметр фотоэлектрический КФК-3



Полуавтоматический метод

- ▶ Фотометр с проточной кюветой. В него заложены определенные программы измерения для разных компонентов сыворотки.
- ▶ Выбираем тест на приборе. Вручную смешиваем реагенты, подносим смесь к пробозаборнику, прибор аспирирует и выжидает время инкубации, а после измеряет оптическую плотность и проводит расчет концентрации. Результат в единицах концентрации (активности ферментов) печатает на бланке.

Проточный фотометр



Автоматический метод

- ▶ Автоматический биохимический анализатор представляет собой автономную станцию, подключенную к водоснабжению и канализации, интегрирован с компьютером, где есть все необходимые программы для измерения.
- ▶ Содержит дозирующие устройства, пробозаборники, кюветы для измерения оптической плотности.
- ▶ Оператор вносит данные пациента и требуемый набор исследований в программу и загружает пробирки с сывороткой пациентов на борт в определенном порядке. Результат печатается на принтере вместе с данными пациента и пределами допустимых значений.





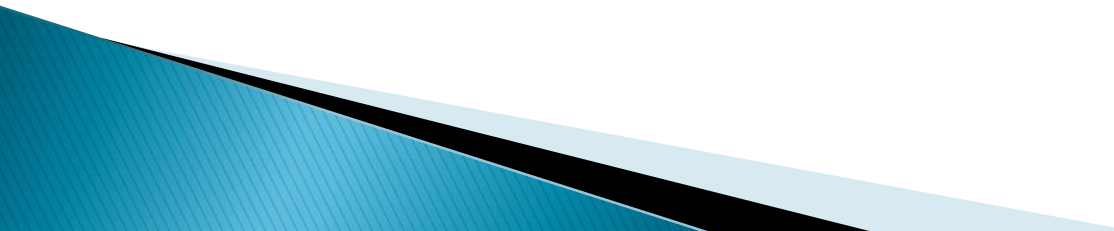




Параметры определения

- ▶ Качественное: определяется наличие или отсутствие искомого вещества (глюкоза в моче)
- ▶ Полуколичественное: много / мало / отсутствует (СРБ латексным методом)
- ▶ Количественное: определение ОП и расчет точной концентрации

Виды биохимических тестов

- ▶ Базовые
 - ▶ Специализированные
 - ▶ Ургентные
- 

Базовые тесты

Требуются основному большинству пациентов и выполняются в рутинной лабораторной практике:

- ▶ Глюкоза сыворотки
- ▶ Общий белок
- ▶ Креатинин
- ▶ Мочевина
- ▶ Билирубин
- ▶ АЛТ, АСТ
- ▶ Электролиты и так далее

Специализированные

- ▶ Для диагностики редких заболеваний (ФКУ, определение сывороточной концентрации лекарств)

Ургентные

- ▶ Определение рН крови, газов крови (O_2 , CO_2), глюкозы крови при сахарном диабете.



Метод сухой химии

- ▶ Используются тест-полоски, пропитанные реагентом. Полоска помещается в биологическую жидкость, и через определенное время (время инкубации) оценивается изменение цвета полоски:
- ▶ Визуально (сравниваем со шкалой на упаковке)
- ▶ Фотометрически (с помощью отражательного фотометра)



И это тоже сухая химия



- ▶ Методом сухой химии больные сахарным диабетом контролируют уровень глюкозы в крови в домашних условиях.
- ▶ Метод распространен в общем анализе мочи
- ▶ Оценка рН других биологических жидкостей (желчь, желудочный сок)

Аналитическая химия

Наука о методах определения химического состава вещества и его структуры.

Выделяют методы:

- ▶ Разделения
- ▶ Обнаружения
- ▶ Гибридные

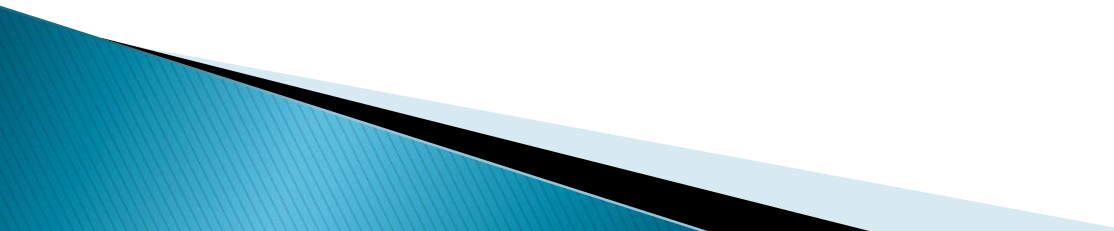
Центрифугирование – метод разделения

- ▶ Под действием центробежной силы клетки крови оседают на дно пробирки, жидкая часть остается в верхней фазе.
- ▶ Кровь с антикоагулянтом после центрифугирования дает плазму (содержит факторы свертывания!)
- ▶ Свернувшаяся кровь после центрифугирования дает сыворотку

Центрифуга



Методы определения

- ▶ Химические (титриметрия – редко используется, гравиметрия – определение фибриногена)
 - ▶ Физико–химические (фотометрия, хроматография)
 - ▶ Физические (спектральные, ядерно–физические)
- 

Гравиметрия

- ▶ Взвешивание сухого продукта реакции (высушиваем до постоянного веса).

Оптические методы

- ▶ Колориметрия – основана на изменении цвета реакционной смеси
- ▶ Спектрофотометрия – определение поглощения света в любой части спектра
- ▶ Фотометрия – определение поглощения света в видимом диапазоне
- ▶ Нефелометрия – определение светорассеяния
- ▶ Флюориметрия – определение интенсивности флюоресценции после связывания с флюорохромом

Физические методы

- ▶ Определение концентрации электролитов с помощью:
 - ▶ Пламенная фотометрия
 - ▶ Ионообменные электроды

Электрофорез

- ▶ Процесс разделения заряженных частиц в электрическом поле.
- ▶ Анализируют заряженные вещества (белки, ДНК и др.) при постоянном рН (для этого используют буферный раствор)

Суть метода

- ▶ Исследуемую сыворотку (плазму) помещают на пористый носитель – ацетатцеллюлозную пленку, агарозный гель и т.д.
- ▶ Пленку помещают в камеру для электрофореза, в которую залит буферный раствор с необходимой рН
- ▶ Помещают в камеру электроды и прикладывают электрическое поле

Электрофорез

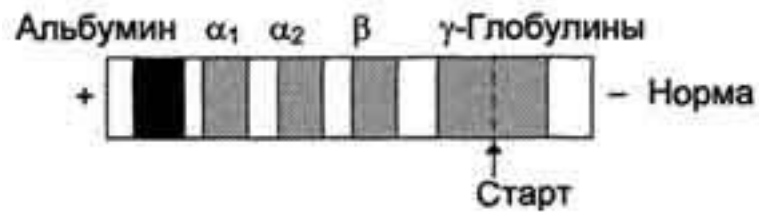


Камера для электрофореза

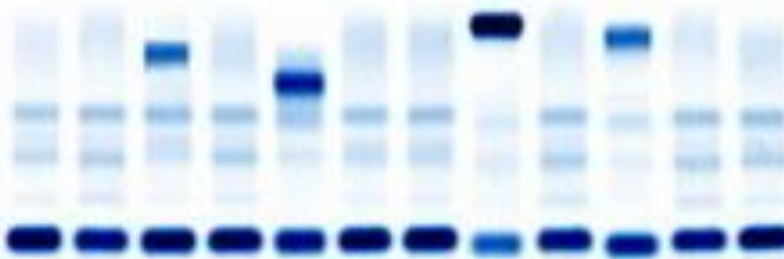
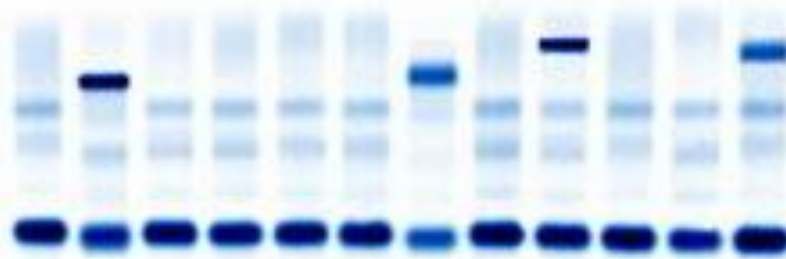


Скорость движения зависит от:

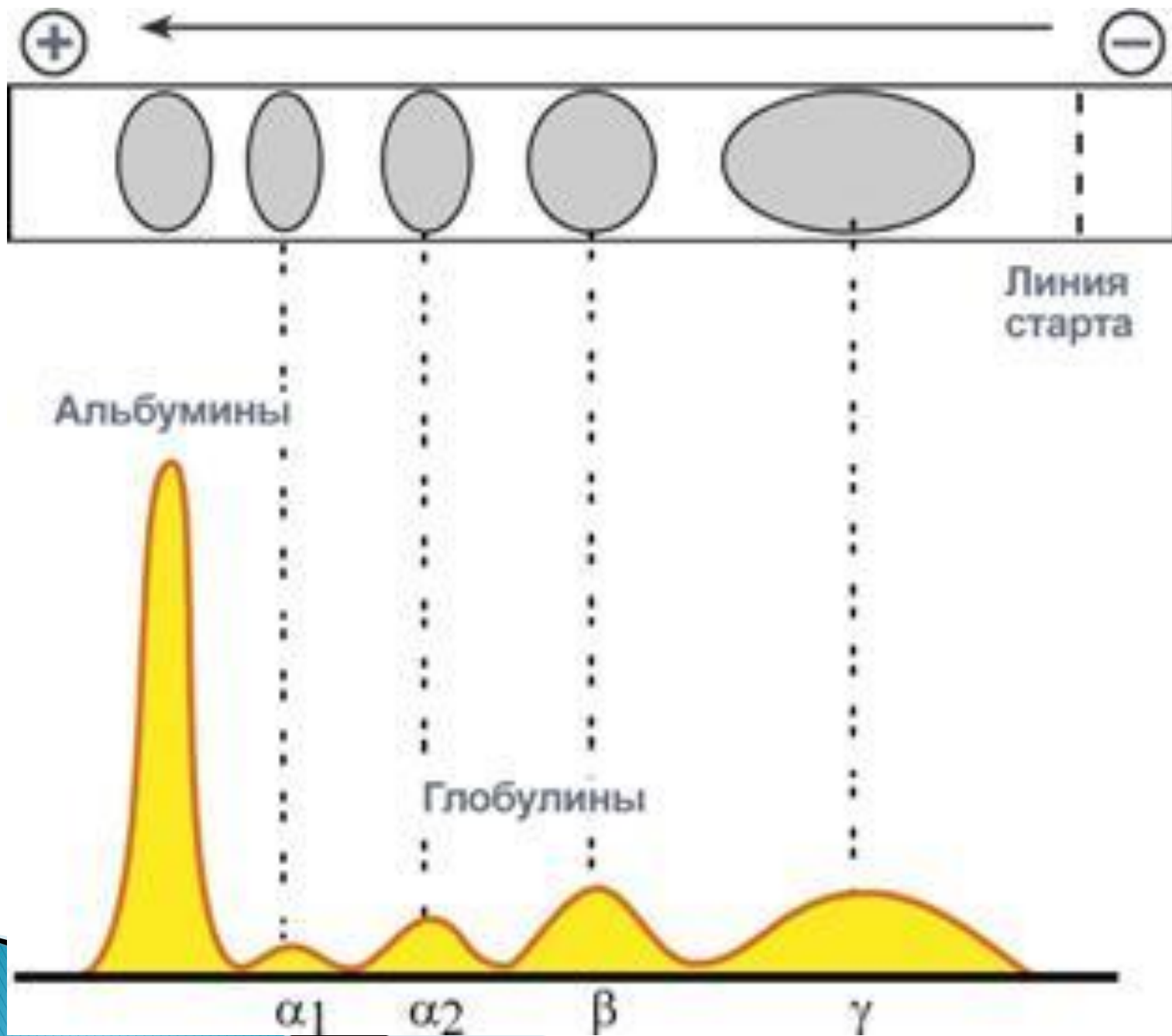
- ▶ Величины заряда
- ▶ Массы молекул
- ▶ Формы молекул



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24



Электрофорез бывает

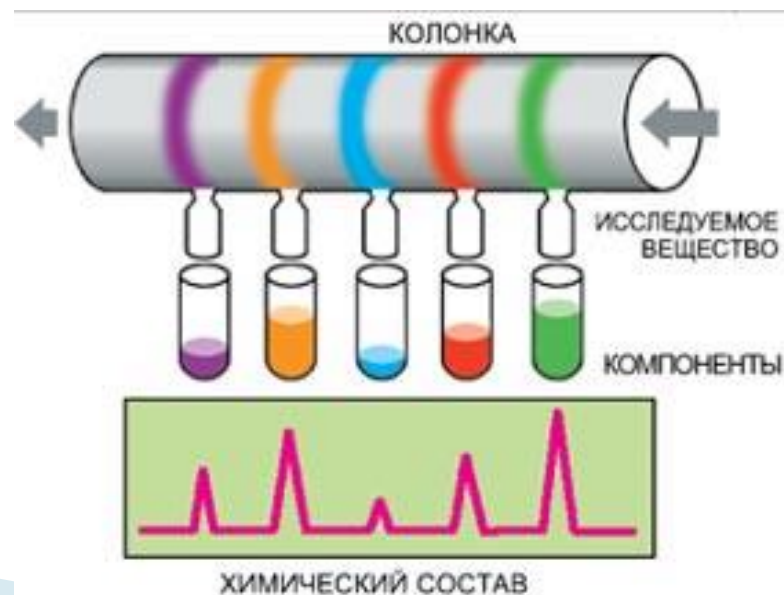
- ▶ Аналитический (после разделения красим и считываем результат)
- ▶ Препаративный (в качестве пробоподготовки)

Капиллярный электрофорез

- ▶ Электрофоретическое разделение проводится в тонких капиллярах диаметром 25–200 мкм и длиной 10–100 см, заполненных буферным раствором. Под действием электрического поля (электрофорез проводится при напряжении 10000–30000 В) в капилляре создается электроосмотический поток, направленный к отрицательному полюсу, вместе с которым перемешаются и компоненты подлежащие разделению. В концевой точке капилляра разделенные компоненты количественно определяют, используя различные оптические детекторы.

Хроматография

- ▶ Метод разделения и определения веществ, основанный на распределении компонентов между двумя фазами – подвижной и неподвижной.



Неподвижная фаза

- ▶ Твердое пористое вещество (часто его называют сорбентом) или пленка жидкости, нанесенная на твердое вещество. Неподвижную фазу обычно помещают в трубку (колонку).

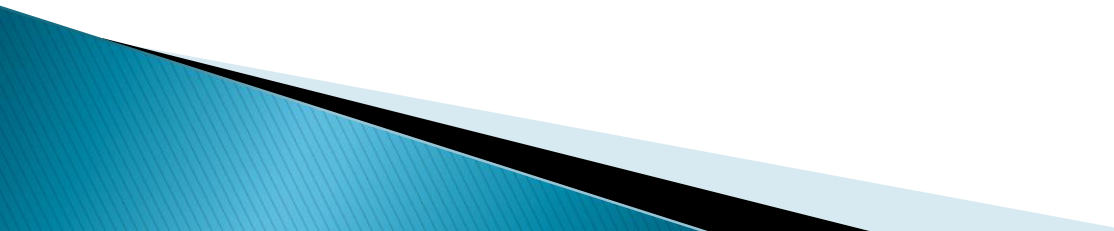
Подвижная фаза

- ▶ Жидкость или газ, протекающий через неподвижную фазу, иногда под давлением.

Суть метода

- ▶ Компоненты анализируемой смеси в зависимости от своих характеристик (размер, заряд и т.д.) с разной силой взаимодействуют с носителем, поэтому перемещаются по колонке с разной скоростью и осядут на разных ее уровнях.
- ▶ «Неудерживаемые» компоненты покидают колонку вместе с подвижной фазой

Виды хроматографии

- ▶ По агрегатному состоянию подвижной фазы: жидкостная и газовая
 - ▶ По механизму разделения: адсорбционная, распределительная, ионообменная и т.д.
- 



Адсорбционная

- ▶ В основе лежит различная сорбируемость разделяемых веществ на твердом сорбенте в соответствии с их сродством к адсорбенту. При этом сорбируемость растворителя должна быть незначительной по сравнению с таковой анализируемой смеси. Процесс адсорбции зависит от свойства адсорбента, адсорбируемых соединений, растворителя.

Ионообменная

- ▶ Основана на способности некоторых твердых веществ (ионитов) обмениваться ионами с подлежащими разделению веществами. Применяемые в ионообменной хроматографии иониты могут быть как органическими, так и неорганическими. Способность к ионному обмену определяется строением ионита, представляющего собой каркас, на котором закреплены активные группы ($-\text{COOH}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{NH}_3\text{Cl}$, $-\text{NH}_2\text{Cl}$ и др.)

Распределительная

- ▶ Основана на распределении компонентов разделяемой смеси между несмешивающимися фазами. Образующая неподвижную фазу жидкость находится на поверхности или в порах твердого носителя, на который наносится смесь веществ, подлежащих разделению. Затем создают ток подвижного растворителя. Чем лучше вещество растворимо в жидкости, играющей роль подвижной фазы, тем дальше оно продвинется по направлению тока растворителя. Вещества, плохо растворимые в подвижной фазе, расположатся ближе к точке нанесения. В зависимости от техники выполнения распределительная хроматография выполняется как колоночная, бумажная или тонкослойная.

Бумажная

- ▶ Разделение проводят на полосах бумаги, где роль неподвижной фазы играет вода, удерживаемая гидрофильными целлюлозными волокнами бумаги, а подвижной фазой является какой-либо органический растворитель.

Тонкослойная

- ▶ Разделение идет в тонком слое носителя. Чаще всего для этих целей используются пластинки из силикагеля.

Гель–хроматография

- ▶ Основана на различии в размерах и молекулярных массах белков и других макромолекул, являющихся важнейшей характеристикой молекулы. В качестве материала–носителя в гель–хроматографии используется сшитый декстран (сефадекс), сшитый полиакриламид (биогель Р) и агароза. Колонка с сефадексом действует по принципу «молекулярного сита». Молекулы большие, чем самые крупные поры разбухшего сефадекса не могут проникать в гранулы и сравнительно быстро проходят в жидкой фазе вне частиц геля, поэтому элюируются первыми.

Аффинная

- ▶ Основана на принципе специфического взаимодействия с особыми веществами (лигандами), закрепленными на носителе. Например, ферменты образуют комплексы с субстратами, антитела взаимодействуют с антигенами, мРНК с комплементарной ДНК и т. д. Все эти взаимодействия строго специфичны и изменяют время прохождения анализа по колонке.

- ▶ В повседневной практике хроматографию используют чаще всего для определения наркотических и лекарственных веществ в биологических жидкостях

Спасибо за внимание

