

# БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

## Лекция № 1. Биохимические методы исследования.

На современном этапе развития медицины резко повысилось значение биохимических анализов. Применение новых лекарственных средств и новых методов лечения требует постоянного биохимического контроля. Биохимические анализы применяются для диагностики, контроля за состоянием пациентов (мониторинг), скрининга различных заболеваний и прогнозирования. Таким образом, главная задача биохимической лаборатории состоит в том, чтобы обеспечить врача биохимической информацией, необходимой для лечения больного. Такая информация представляет ценность только если она точна, соответствует клинической ситуации и правильно используется врачом в процессе принятия решений.

Материалом для биохимических исследований в КДЛ могут быть:

- биологические жидкости внутренних сред организма - цельная кровь, сыворотка и плазма крови, спинно-мозговая жидкость, лимфа и др.
- биологические выделения (экстракты) – моча, желчь, слюна, желудочный и кишечный соки, кал, пот и др.

Для того, что бы получить данный биологический материал используют следующие методы забора:

1. Безинструментальный – так собирают мочу, кал, мокроту, слюну и т.д.
2. Пункционный – материал берут с помощью игл из вены, артерий, спинного мозга.
3. Прокол иглой – кровь из пальца.
4. Пункционная биопсия – пункция из внутренних органов.
5. Зондовый метод – берут желудочный сок, мочу и т.д.
6. Промывание легких, мочевого пузыря и т.д.
7. Мазки и соскобы из носовой полости, зева, слизистой матки.
8. Отпечатки с ран, свищей, эрозий.

Биологический материал имеет разный срок и условия хранения, например, моча храниться 4-6 часов при комнатной температуре, а сыворотка несколько дней.

Весь биологический материал является условно патогенными (инфицированными), поэтому при работе с ним следует соблюдать правила ТБ при работе с инфицированным материалом.

В основном в биохимической лаборатории работают с цельной кровью, сывороткой и плазмой крови. Их получение и способы хранения отражены в таблице.

Характеристика биоматериала.	Цельная кровь.	Плазма.	Сыворотка.
1. Подготовка посуды.	Обрабатывают антикоагулянтом.	Должна быть сухой, чистая.	Должна быть сухой, чистая.
2. Использование специальных веществ.	Антикоагулянты.	Физиологический раствор, антикоагулянты.	Нет.
3. Отстаивание.	Нет.	30 минут.	30-60 минут.

4.Центрифугирование.	Не используют.	5 минут при 1200 об/мин.	15 минут при 1200 об/мин.
5.Условия хранения.	Не хранят.	t 0-4°C –3-7 суток; t -20°C –1-3 месяца.	t 0-4°C – 3-7 суток; t -20°C –1-3 месяца.
6. Исследование.	В течение суток.	В зависимости от исследго вещества и условий хранения - до 3 месяцев.	В зависимости от исследуемого вещества и условий хранения - до 3 месяцев.
7.Отличительные особенности.	Можно исследовать все компоненты крови.	Отсутствуют форменные элементы крови.	Отсутствуют форменные элементы и факторы свертывания крови (фибриноген и др.).

В качестве антикоагулянтов могут быть использованы следующие вещества:

1. Этилендиаминтетраацетат (ЭДТА) – связывает и эффективно удаляет ионы кальция, защищает клетки крови от разрушения. Добавляют в кровь для выполнения гематологических исследований.
2. Гепарин (в виде натрий гепарина или калий гепарина) - ингибирует превращение протромбина в тромбин. Используют для получения плазмы крови для биохимических исследований.
3. Цитрат натрия– связывает и эффективно удаляет ионы кальция. Добавляют для получения плазмы необходимой для исследования процессов свертывания крови.
4. Оксалат натрия или оксалат аммония – связывает и эффективно удаляет ионы кальция. Добавляют (вместе с фторидом натрия) для получения крови и исследования в ней уровня глюкозы.
5. Фторид натрия – ферментный яд, который прекращает метаболизацию глюкозы в крови после её сбора, т.е. сохраняет её концентрацию.

Этапы лабораторных исследований.

При лабораторных исследованиях могут возникать случайные или систематические ошибки, которые могут влиять на постановку диагноза, на лечение больного и, в конечном счете, на здоровье человека, поэтому важно соблюдать меры по их предотвращению.

Для этого на всех этапах анализа соблюдают следующие правила контроля качества лабораторных исследований:

1 этап клинико-биохимических исследований - преаналитический.

На данном этапе нужно соблюдать 3 условия:

1. Правильное составление направления на анализ ( см. лекцию).
2. Строго соблюдать условия забора биологического материала (срок сбора, время взятия, подготовка обследуемого, процедура взятия биоматериала, чистота посуды и материалов для забора (одноразовые шприцы), факторы внешней среды (особенно температура, наличие или отсутствие консервантов, антикоагулянтов, первичная обработка биоматериала.)
3. Строго соблюдать условия транспортировки биоматериала (особенно при исследовании активности ферментов).

2 этап клинико-биохимических исследований - аналитический.

На этом этапе важно:

1. Правильно выбрать метод для исследования того или иного вещества. Важно чтобы метод был:
  - чувствительным (способность метода выявлять наименьшие различия между двумя концентрациями веществ);
  - специфичным (способность метода измерять лишь тот компонент, для определения которого он предназначен);
  - точным (степень приближения полученного значения к истинному содержанию вещества в биологической жидкости);
  - обладать воспроизводимостью (разброс показателей, полученных при анализе нескольких проб одного и того же образца биоматериала);
  - обладать диагностической ценностью (изменения данного вещества или ряда веществ в биоматериале, должно говорить о каком то определенном заболевании).
2. Правильно подготовить оборудование, посуду и реактивы в соответствии с методикой.
3. Точно выполнять исследование по методике.
4. Правильно проводить расчеты и интерпретировать полученные результаты.

3 этап клинико-биохимических исследований – постаналитический, на этом этапе необходимо обращать внимание на следующее:

1. Правильность оформления бланков анализа.
2. Лабораторно-клиническую интерпретацию результатов.
3. Доведение полученной информации до сведения лечащего врача.

Принципы биохимических исследований.

1. Исследования могут проводиться *in vitro* в пробирках различные биологические жидкости или *in vivo* с помощью введения в организм датчиков (например, ионоселективных электродов).
2. При интерпретации полученных биохимических показателей нужно помнить, что каждый отдельный определяемый компонент отражает деятельность многих органов и тканей, а также собственную функцию в организме, поэтому при диагностике заболеваний нужно учитывать комплекс различных биохимических показателей.
3. На некоторые биохимические показатели могут влиять внешние (смена времен года, погода, пища и т.д.) или внутренние (прием лекарственных средств, положение тела во время анализа и т.д.) факторы.
4. Некоторые биохимические показатели зависят от пола, возраста, характера питания, труда, образа жизни, генетических особенностей и т.д.
5. При решении вопроса об отклонениях биохимического показателя от нормы правильнее ориентироваться не на средние показатели, а на референтные (справочные) величины.
6. Следует строго соблюдать основные правила проведения биохимических исследований.

7. Трактуя биохимические показатели нужно учитывать условия, в которых находился больной при взятии пробы, в том числе степень физической активности, положение тела (стоя, лежа), другие диагностические обследования (например, проведение нагрузочных проб), лечебные меры (лекарства, физиолечение, хирургическое лечение).
8. Диагностическое значение результата биохимического исследования зависит от степени связи исследуемого параметра с патологическим процессом (нужно помнить, что большинство биохимических параметров отражает влияние не одного, а нескольких факторов заболеваний).
9. При диагностике большинства заболеваний нельзя опираться только на биохимические показатели, нужно учитывать и другие методы исследований. Но биохимические методы позволяют диагностировать ранние и скрытые формы некоторых заболеваний, например сахарного диабета, подагры, инфаркта миокарда, нарушений липидного обмена и др.

Основы тактики биохимических исследований.

При биохимических исследованиях следует соблюдать следующую тактику обследования пациента:

1. Лабораторные тесты, назначаемые пациенту, должны соответствовать основной клинической цели обследования:
  - профилактика – выявление ранее не наблюдавшегося отклонения от нормы.
  - диагностика или дифференциально-диагностическое обследование – установление диагноза.
  - контроль за лечением (мониторинг)– оценка эффективности лечебных мер.
  - прогностическое обследование, диспансерное наблюдение – оценка степени выздоровления и восстановления нарушенных болезнью функций.

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

2. Поиск ранее не наблюдавшейся патологии может проводиться как «вслепую», по широкому кругу тестов, так и направленно, по узкому набору тестов. Иногда в стационарах используют так называемый «вступительный скрининг», т.е. проведение каждому поступающему пациенту еще до осмотра лечащего врача заранее отобранного и установленного стандартного набора биохимических тестов.
3. Целесообразнее назначать биохимические тесты для дифференциальной диагностики заболевания не последовательно (растянуто во времени), а в комплексе тестов, которые выполняются одновременно.
4. Лучше использовать одновременный набор лабораторных тестов не только для диагностики, а для дифференциальной диагностики (набор тестов, которые способны отличить данное заболевание от ряда других похожих).
5. Лабораторные тесты должны назначаться с учетом их диагностической ценности на различных стадиях заболевания (скрытое течение, острая фаза, криз) и возможностей наблюдения за течением болезни.
6. Нагрузочные тесты (функциональные и фармакологические пробы) помогают в большей степени выявлять скрытые и неявные изменения биохимических параметров, резервные возможности систем, чем исследования в состоянии покоя. Назначать нагрузочные тесты нужно учитывая состояние больного и возможные отрицательные эффекты пробы.
7. При биохимическом контроле за результатами действия определенного вида лечения следует учитывать возможные влияния других лечебных воздействий, а также диагностических мероприятий.

Методы биохимических исследований в КДЛ. Основные методы, которые применяются в КДЛ, приведены в таблице.

Метод.	Сущность метода.	Приборы.	Примеры.
Фотоэлектроколориметрический.	Сравнение интенсивности окраски исследуемого раствора с окраской раствора, концентрация которого известна (стандартного раствора).	Фотоэлектроколориметр (ФЭК).	Определение общего белка, глюкозы в сыворотке и плазме крови.
Спектрофотометрический	Определение количества вещества в растворе или твердой среде по измерению светопоглощения волн строго определенной длины.	Спектрофотометр.	Определение количества ионов Na, K и т. д. в сыворотке и плазме крови.
Потенциометрический.	Измерение разности потенциалов между парой подходящих электродов, погруженных в анализируемый раствор.	Потенциометр.	Определение рН крови.
Электрофорез.	Разделение смеси, состоящей из молекул несущих заряд, на составные компоненты.		Определение количества белковых фракций, изоферментов, в сыворотке и плазме крови.
Хроматография.	Разделение смесей на составные части с помощью адсорбентов (твердых, жидких, газов, гелей)	Хроматограф.	Определение количества липопротеидов в сыворотке и плазме крови.

В настоящее время в КДЛ для проведения биохимических анализов используют специальные полуавтоматические или автоматические анализаторы, которые могут определять от одного до нескольких десятков исследований. В научных лабораториях, для изучения работы организма используют и другие, более современные методы исследований, например использование изотопов, электронная микроскопия, ультрацентрифугирование и др.

Международная система единиц измерения в лабораторных исследованиях. Международная система единиц (СИ) как единая система для всех отраслей науки, техники и производства была принята в 1960 г. XI Генеральной конференцией по мерам и весам. XXX сессия Всемирной Ассамблеи здравоохранения, состоявшейся в 1974 г., рекомендовала принять СИ во всех областях медицины, включая практическое здравоохранение.

Существует следующая соразмерность:

Масса. 1 кг = 1 000 г = 1 000 000 мг = 1 000 000 000 мкг.

Объем. 1 л = 10 дл (децилитр) = 100 сл (мантилитр) = 1000 мл = 1 000 000 мкл. Запомните: 1 мл = 1,028 см<sup>3</sup>.

Количество вещества. 1 моль = 1 000 ммоль = 1 000 000 мкмоль.

Время. 1 ч = 60 мин = 1800 с. 1 мин = 60 с.

Результаты биохимических исследований должны выражаться только в основных единицах или их производных:

1. Концентрация вещества с известной молекулярной массой в биологических жидкостях (кроме мочи) следует выражать в молях или его долях на литр (моль/л, ммоль/л, мкмоль/л, нмоль/л и т.д.).
2. В тех случаях, когда молекулярная масса вещества не известна или не может быть определена (в смеси), результат определения нужно выражать в единицах измерения массы на литр (г/л, мг/л и т.д.).
3. Выведение различных веществ с мочой выражается в долях моля за сутки (если относительная молекулярная масса известна) или в единицах массы за сутки (если относительная молекулярная масса неизвестна).
4. Плотность веществ указывается в г/л, клиренс в мл/с.
5. Единицей выражения активности ферментов является «катал» (кат), кат/л = моль/(с\*л), мкат/л = ммоль/(с\*л), мккат/л = мкмоль/(с\*л). В старых методиках еще используют величину измерения активности ферментов МЕ/л = мкмоль/(мин\*л).
6. Для перевода из одних единиц измерения в другие существуют коэффициенты пересчета, например:  
нкат/л = 0,06 \* мкмоль/(мин\*л) или нкат/л = 0,06\*МЕ/л.  
мкмоль/(мин\*л) = 16,67 \* нкат/л.

Ранее принятые единицы количества вещества мг% можно пересчитать: 10\* мг% = г/л, 17,104\*мг% = мкмоль/л, 0,0555\*мг% = ммоль/л.

Техника безопасности при работе в лаборатории. Правила по охране труда и ТБ направлены на предупреждение опасных и вредных производственных факторов, связанных с особенностями работы в лаборатории, основные из них следующие:

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

В лаборатории нужно соблюдать следующие общие требования:

1. Работать только в спецодежде – халате, колпачке и сменной обуви. При угрозе разбрызгивания крови работать в очках, маске, клеенчатом фартуке.
2. Приступать к работе только после вводного инструктажа и первичного инструктажа на рабочем месте. Повторный инструктаж проводится не реже 1 раза в 6 месяцев.

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

**!!! ЗАДАНИЕ – ПОДГОТОВИТЬ ПРЕЗЕНТАЦИЮ НА ТЕМЫ (по выбору):**

1. «Биохимические показатели крови при нарушении белкового обмена»
2. «Биохимические показатели крови при нарушении углеводного обмена»
3. «Биохимические показатели крови при нарушении липидного обмена»
4. «Биохимические показатели крови при нарушении пигментного обмена»

**Требования к оформлению: не менее 10 слайдов и не более 15 слайдов.**

**ПРИСЛАТЬ ДО 16.05.2020г. (присланные позже рассматриваться не будут !!!)  
НА ЭЛ. АДРЕС [mirsaitova73@mail.ru](mailto:mirsaitova73@mail.ru)**