

* Клиническая биохимия

Лекция 1. ВВЕДЕНИЕ. МЕТОДЫ
БИОХИМИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ.

Клиническая биохимия – это

клинико-диагностическая наука, в задачи которой входят разработка и использование стандартных методов диагностики, контроля над течением заболевания с позиции биохимии

Задачей современной клинической биохимии является выявление диагностически и прогностически значимых нарушений протекания биохимических реакций в организме животного.

Методы биохимических исследований

При проведении клинико-биохимических исследований наиболее широко используются 2 группы методов: **оптические** и **иммунохимические**.

Основными **оптическими** методами количественного анализа является:

- * абсорбционная фотометрия (колориметрия, спектрофотометрия, нефелометрия, атомно-абсорбционная фотометрия),
- * эмиссионная фотометрия (пламенная фотометрия, флюориметрия, атомно-эмиссионный спектральный анализ),
- * рефрактометрия,
- * поляриметрия.

К оптическим измерительным приборам, используемым в клинической биохимии относятся:

1. Фотометры (фотоэлектроколориметры)
2. Спектрофотометры
3. Денситометры
4. Нефелометры
5. Флюориметры
6. Пламенные фотометры
7. Атомные абсорбциометры
8. Рефрактометры



Фотоэлектроколориметр КФК-2

Абсорбционная фотометрия

К абсорбционной фотометрии относятся аналитические методы, основанные на определении интенсивности поглощения светового потока, проходящего через исследуемый раствор или поглощении света атомами веществ, испаряемых в пламени.

Абсорбционная спектрофотометрия имеет диапазон измерений в пределах 190-2000 нм.

- Измерения в области 190-400 нм охватывают ультрафиолетовую часть спектра и называются ультрафиолетовой спектрофотометрией.

- Области от 400-700 нм охватывают видимую часть спектра. Измерения в этой области называют обычно колориметрией (или спектрофотометрией в видимой части спектра).

- Измерения в области 760-2000 нм относятся к области инфракрасной спектрофотометрии.

- * Свет является одной из форм электромагнитного излучения характеризующегося определенной частотой (ν) и длиной волны (L).
- * Проходя через прозрачную стеклянную призму свет разлагается по длинам волн, образуя спектр.
- * В фотоэлектроколориметрах и спектрофотометрах монохроматичный луч с определенной интенсивностью (I_0) частично ослабляется и интенсивность выходящего луча (I) будет меньше. Это ослабление происходит вследствие абсорбции части световой энергии луча молекулами определяемого вещества.

Зависимость между величиной светопоглощения монохроматического светового луча и концентрацией раствора выражается законом Ламберта-Бэра:

$$I = I_0 e^{-\epsilon c L}$$

где I_0 - первоначальная интенсивность светового потока; I - интенсивность света прошедшего через раствор; L - толщина слоя раствора; c - концентрация исследуемого вещества в растворе; ϵ - молярное погашение.

После преобразования и логарифмирования оно принимает вид: $\lg I_0/I = \epsilon c L$

Левую часть уравнения обозначают буквой A (иногда D или E) и называют оптической плотностью или экстинкцией ($A = \epsilon c L$)

Экстинкцией или оптической плотностью называют логарифм отношения интенсивности света входящего в раствор к интенсивности выходящего из раствора света

Для того, чтобы перейти от экстинкции к концентрации, необходимо величину экстинкции сопоставить с какой либо единицей концентрации. Для этого пользуются двумя методами:

1. Метод эталонного раствора состоит в том, что определяют оптическую плотность (экстинкцию) исследуемого и эталонного раствора, концентрация которого известна. Экстинкция, как отмечалось, прямо пропорциональна концентрации.

$$C_{\text{иссл.}} = C_{\text{эталон}} \times A_{\text{иссл.}} / A_{\text{эталон}} \times C_{\text{иссл.}} \times A_{\text{иссл}}$$

Где $C_{\text{иссл.}}$ - концентрация веществ в исследуемом растворе; $C_{\text{эталон}}$ - концентрация веществ в эталонном растворе; $A_{\text{иссл.}}$ - экстинкция исследуемого раствора; $A_{\text{эталон}}$ - экстинкция эталонного раствора.

2. Метод калибровочного графика заключается в том, что зависимость между экстинкцией и концентрацией выражают графически.

Для построения калибровочного графика готовят серию эталонных растворов с различной концентрацией и определяют соответствующие им значения экстинкций. Затем на оси абсцисс откладывают значения концентраций, а на оси ординат - значения экстинкций.

При проведении биохимических исследований лучше всего использовать кюветы

с длиной оптического пути 10 мм.

Оптимальными объемами жидкости для фотометрии является 0,5-1 мл.



Оценку результатов проводят двумя способами:

1. По конечной точке (измерение в конечной точке)
2. Кинетическое измерение.

Турбидиметрия

Для анализа взвесей, суспензий, эмульсий и других мутных сред используют турбидиметрический метод анализа, также основанный на величине светопоглощения этими мутными средами. При турбидиметрическом методе анализа, интенсивность светового потока проходящего через раствор уменьшается вследствие поглощения и рассеивания света взвешенными частицами.

Нефелометрия

Для анализа коллоидных растворов используется нефелометрический метод анализа, или нефелометрия, основанный на измерении интенсивности света, рассеянного коллоидными частицами. Если такой раствор осветить сбоку, а при этом смотреть на него сверху, то часть света, рассеиваемая частицами, попадает в глаза наблюдателя. Поэтому при нефелометрических определениях измеряют интенсивность рассеянного света в направлении перпендикулярном к направлению первичного пучка света.

Атомно-абсорбционный спектральный анализ

основан на поглощении монохроматического света атомами вещества, находящегося в раскаленном газе (в пламени газовой горелки).

Эмиссионная фотометрия

Пламенная фотометрия. Основана на излучении света атомами веществ, испаряемых в пламени газовой горелки.

Флюориметрия. Качественное и количественное определение вещества, основанное на учете интенсивности его флюоресценции (самосвечение), называют флюориметрией, а приборы - флюориметрами.

Рефрактометрия.

Под рефракцией понимают изменение направления луча света при переходе из одной среды в другую. Рефрактометрия означает измерение преломления света, она оценивается по величине показателя преломления.

Электрофорез.

Под электрофорезом понимают процесс разделения заряженных частиц в электрическом поле.

Хроматография.

Это метод разделения и анализа многокомпонентных систем, основанный на использовании явлений сорбции и десорбции в динамических условиях.

Потенциометрия (ионометрия)

Он основан на измерении ЭДС цепей составленных из индикаторного электрода, потенциал которого зависит от активности (концентрации) исследуемого иона и электрода сравнения.

Иммунохимические методы

Реакция иммунодиффузии в геле (РИД) В основе этого метода лежит способность антигенов и антител диффундировать с различной скоростью, в результате чего эквивалентные соотношения определенных антигенов и антител достигаются в различных частях геля, где образуются соответствующие им линии преципитации.

Радиоиммунологический анализ (РИА). Впервые этот метод был разработан для количественного определения инсулина с использованием гормона, меченого радиоактивным изотопом иода. В основе метода лежала конкуренция между нативным инсулином плазмы и меченым инсулином за ограниченное число специфических мест связывания на антителах к инсулину.

Иммуноферментный анализ (ИФА). В его основе, также как и метода РИА, лежит закон действия масс, но вместо радиоактивной метки используется ферментативная.