БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИНФОРМАТИКИ И РАДИОЭЛЕКТРОНИКИ

Кафедра ЭТТ

РЕФЕРАТ

На тему:

«Медицинская биохимия. Основные принципы измерительных технологий в биологической химии»

МИНСК, 2008

Биологическая химия изучает химию живой природы во всех ее проявлениях от бактерий, включая вирусы до животных. Биохимия в большей степени опирается на органическую химию, а также тесно связана с неорганической, физической и аналитической. Как известно, все живые организмы состоят из химических соединений – органических и неорганических. Такие органические соединения как белки, углеводы, липиды, нуклеиновые кислоты часто называют биомолекулами. Большинство этих биомолекул состоит только из 6 элементов неметаллов: кислорода, углерода, водорода, азота , фосфора и серы. Изучением этих важнейших биомолекул и занимается биохимия.

Все живые организмы содержат такое неорганическое соединение как вода. Вода - важнейшее вещество, которое обеспечивает жизнь. Значение неорганических соединений велико. Они присутствуют в ионной форме, причем либо в виде свободных ионов, либо входят в состав сложных органических групп.

Задачи, стоящие перед биохимией, можно решить путем объединения ее результатов с данными биофизики, морфологии, генетики и других

биологических дисциплин. В последние годы развитие биохимии в большей степени определяется достижениями физики, математики, кибернетики, механики. Естественно изучение состава и структуры биологической природы и особенностей их обмена невозможно без использования сложных физико-химических методов и точных измерительных приборов.

Создание приборов для решения задач, стоящих перед биохимией стало возможным только после разработки таких методов исследования как гидролиз, хроматография, электрофорез, использование меченых атомов, рентгеноструктурный анализ. Применение этих методов потребовало создания аппаратов и приборов, ультрацентрифуг, компьютерных программ для этой техники.

Какие же вопросы решает биохимия:

- Как синтезируются биомолекулы в клетке?

- Как распадаются. Как их распад связан с высвобождением полезной химической энергии внутри клетки. В каком виде эта энергия производится?

- Как взаимопревращаются биомолекулы?

- Как попадают в клетку и выводятся?

- Как их можно выделить, синтезировать?

- Какова их молекулярная структура?

- Какие специальные функции они выполняют?

- Как гены контролируют биохимическую специфичность, т.е. индивидуальность организма?

- В чем причины отклонения от нормы, т.е. причины патологического состояния?

- Как можно улучшить медицинскую диагностику, учитывая биохимические критерии?

- Каким образом гормоны регулируют деятельность организма и каковы другие пути саморегуляции организма?

Следовательно, биохимия выясняет связи функции и структуры, способы действия регуляторных механизмов , лежащих в основе жизнедеятельности.

Биохимия является теоретической основой медицины. Знание биохимических процессов, протекающих в нормальном здоровом организме, позволяет понять природу различных заболеваний, которые в своей основе представляют разнообразные отклонения протекаюших в организме химических реакций, т.е. патогенез заболеваний.

Один из основных принципов клинической медицины состоит в том, что нормальная жизнедеятельность организма требует соблюдения достаточно строгого постоянства внутренней среды организма.

Умеренные отклонения большинства биохимических показателей могут быть выявлены только при знании нормальных величин. Должны учитываться не только границы возможных колебаний каждого из изучаемых показателей, но и их зависимость от пола, возраста, физиологических состояний. Для некоторых заболеваний методы биохимического анализа являются едва ли не единственным средством, дающим возможность постановки правильного диагноза.

Изучение обмена веществ в организме человека происходит на разных уровнях:

- Целого организма

- Органа или ткани

- Клетки

- Молекулы

В этих исследованиях применяются различные методы исследования.

Так обмен веществ на уровне целого организма изучается путем определения количества питательных веществ, получаемых организмом и выделившихся из него (суточные анализы).

Методами экстрактов или гомогенатов исследуют обмен на уровне клетки. Эти методы в основном используются в экспериментальных исследованиях. В эксперименте из органов животных выделяют ткани, из которых готовят экстракты или гомогенаты и в них проводят определение активности ферментов, либо определяют содержание каких-либо веществ. В лабораторной диагностике проводят анализ крови, приготавливают плазму или сыворотку и определяют в ней количество сахара, протромбина, гемоглобина и т.д.

В субклеточных фракциях под электронным микроскопом были открыты различные внутриклеточные органеллы: ядро, лизосомы, митохондрии, микросомы и т.д. Эти элементы также экспериментально выделяют из тканей животных и растений. Разработаны методы выделения этих структур путем дифференциального центрифугирования в центрифугах с большим колическтвом оборотов, доходящим до 10-60 тыс. в мин.

**Седиментационный анализ** – разделение веществ в ультрацентрифуге под действием центробежной силы. В связи с различными величиной и плотностью исследуемых частиц они осаждаются при разных ускорениях.

Изучение состава и структуры вещества биологической природы и особенностей его обмена невозможно без использования сложных физико-химических методов и точных измерительных приборов. Создание этих приборов стало возможным после разработки таких методов исследования как гидролиз, хроматография, электрофорез, рентгеноструктурный анализ. В клинических биохимических лабораториях широко используются различные модели электрофотоколориметров, спектрофотометров, флюориметров, а также аппаратов электрофореза, аминокислотных анализаторов, автоматического коллектора отбора фракций, колоночной хроматографии.

Рассмотрим подробнее эти методы:

**Электрофорез** – этот метод основан на том, что в электрическом поле молекулы вещества, которое обладает электрическим зарядом, будут передвигаться к катоду или аноду. Скорость и направление их передвижения зависят от величины заряда молекулы, ее формы, размера.

Например, если смесь белков поместить в электрическое поле, то белки с положительным зарядом будут перемещаться в сторону отрицательного электрода, а белки с отрицательным зарядом – в сторону положительного электрода, белки же с нулевым зарядом останутся на месте старта. Белки с более высокой плотностью заряда будут двигаться по направлению к соответствующему электроду быстрее, чем белки с более низкой плотностью заряда.

Электрофорез проводят: в растворах, на носителях- полоска бумаги, пленки ацетата или целлюлозы, пластинах гидрофильного геля, трубочках, заполненных гелем.

Пример:

Стеклянные трубочки помещают в прибор для электрофореза. Заполняют их гидрофильным раствором, который полимеризуется и превращается в гель. На поверхность геля наносят смесь белков или аминокислот, затем прибор подключают к источнику тока. Через определенный промежуток времени происходит разделение смеси. Гель извлекают из трубочек и анализируют на денситометре.

**Хроматография** – сущность метода заключается в том, что различные вещества обладают различной способностью адсорбироваться на определенных веществах. Вещества разделяются между двумя фазами: подвижной и неподвижной. При этом весь процесс разделения складывается из многократных актов перехода вещества из одной фазы в другую.

Какие бывают виды хроматографии?

**Распределительная** – процесс разделения происходит вследствие различной растворимости.

**Адсорбционная** – разделение происходит вследствие различной сорбируемости веществ на поверхности твердой фазы (колоночная хроматография, гель-фильтрация, т.е. разделение веществ в зависимости от их молекулярного веса и размера молекул, колонка представляет собой как бы молекулярное сито).

**Ионообменная** – происходит в результате обмена ионов. Метод основан на различных кислотно-основных свойствах разделяемых веществ.

**Химическая** – например, комплексообразование или осадочная хроматография.

В лабораторной диагностике хроматография используется для разделения смесей аминокислот, а также для идентификации и количественного определения разделенных аминокислот. Основан на различиях кислотно-основных свойств аминокислот.

Пример:

Хроматографическая колонка представляет собой длинную стеклянную, заполненную гранулами синтетической смолы трубку, которая содержит прочно связанные с ней заряженные группы:

- смолы со связанными анионными группами - катионообменные

- смолы со связанными катионными группами - анионообменные

В наиболее простом варианте ионообменной хроматографии разделение аминокислот осуществляют на колонке с катионообменной смолой, в которой связанные анионные группы, например, остатки сульфоновой кислоты ( - S03- ) сначала “нагружают” ионами Nа+, затем на поверхность смолы наносят кислый раствор (рН 3,0), содержащий анализируемую смесь аминокислот и медленно пропускают через колонку. По мере прохождения через колонку положительно заряженные аминокислоты вытесняют ионы Nа+, связанные с группами - S03- ,которые прочно присоединены к частичкам смолы. Выходящий из нижнего конца колонки раствор (элюат) собирают в виде небольших порций (фракций) и определяют количество содержащихся в них аминокислот.

Этот процесс может быть автоматизирован. Запись показаний и анализ осуществляется на анализаторе.

Другая разновидность хроматографии - **гель-фильтрация.** В этом случае колонка заполняется очень мелкими пористыми гранулами высокогидратированного полимера. Раствор смеси аминокислот пропускают через колонку. Молекулы белков, имеющие сравнительно небольшие размеры, проникают через поры внутрь этих гранул, в результате чего их прохождение через колонку замедляется, тогда как молекулы крупных белков не могут проникнуть внутрь гранул и проходят через колонку значительно быстрее. Таким образом колонка является молекулярным ситом. Элюат собирают порциями и анализируют.

Для исследования структуры веществ и изучения химических превращений используется **спектроскопия.** При исследовании биологических объектов преимущество спектральных методов состоит в том, что вещество в процессе исследования не разрушается. Эти методы позволяют обнаружить незначительные количества веществ.

**Оптические методы** количественного анализа позволяют регистрировать изменения, происходящие с лучом света при прохождении его через исследуемый раствор, а также измерение излучения молекул исследуемого вещества.

**Спектр** – это зависимость количества поглощенной или излученной системой энергии от длины волны или другого параметра (например, волнового числа).

**Спектр поглощения** является специфической характеристикой различных соединений при прохождении через них световой энергии. Спектр может быть получен в видимой ( 400-800 нм), ультрафиолетовой (200-400 нм) или инфракрасной области (800нм-5 мкм). Отдельные пики в спектре соответствуют длинам световых волн, которые поглощаются этим соединением, причем самый большой пик соответствует длине волны с максимальным поглощением.

Молекулы взаимодействуют с излучением в широком диапазоне длин волн и поэтому их спектры лежат в различных областях. Электронные спектры обусловлены переходом электронов наружных оболочек атомов с одного энергетического уровня на другой.

**Спектроскопия в видимой и ультрафиолетовой областях.** Принцип – энергетический переход внешних электронов в молекулах. Применяется при количественных определениях ферментов и кинетических исследованиях.

**Спектрофлуориметрия**. Принцип – испускание света, длина волны которого больше чем длина волны поглощенного света. . Применение – количественный анализ, кинетика, качественный анализ.

**Инфракрасная** спектроскопия и спектроскопия комбинационного рассеяния. Принцип – колебания атомов в молекуле приводят к изменению дипольного момента и поляризуемости. Применение – качественный анализ.

**Пламенная спектрофотометрия.** Принцип – энергетические переходы внешних электронов атомов после испарения вещества в пламени.

**ЯМР-спектрометрия.** Принцип **-** регистрация магнитных моментов ядер с нечетным числом протонов.

**Масс-спектрометрия**. Принцип – определение количества положительно ионизированных молекул и их фрагментов. Используется для определения аминокислот в белках.

При исследованиях и клинических анализах бывает необходимость определить очень малые количества соединений в сложных смесях. В этих случаях применяют методы **радиоиммунного и ферментиммунного** анализа. Эти методы обеспечивают высокую специфичность и чувствительность.

Для проведения **радиоиммунного** анализа необходимо иметь радиоактивное соединение и смесь γ-глобулинов, содержащую антитела к этому соединению, которые специфически связывают его. Чувствительность метода обеспечивается радиоактивностью, а специфичность – использованием антител.

**Ферментиммунный анализ** основан на конкурентном связывании идентичных лигандов и антитела. В этом методе чувствительность детекции достигается путем использования не радиоактивности, как в радиоиммунном анализе, а ферментов. Специфичность же обусловлена использованием антитела.

Пример - сатурационный анализ. Конкурентное взаимодействие молекул гормона и специфического антитела или другого связывающего белка. Введение меченого лиганда (гормон), маркированного радиоактивным изотопом или коньюгированного (связанного) с каким-либо ферментом, приводит к насыщению (сатурации) связывающего белка. Добавленный к системе немеченный гормон вытесняет часть молекул лиганда из комплекса с белком.

**Метод изотопов** - принцип его заключается в том, что синтезируется вещество, в молекулы которого вводят атомы радиоактивных или тяжелых изотопов и далее используют для проведения клинических анализов.

Радиоактивные изотопы представляют собой нестабильные формы элементов, способные самопроизвольно распадаться, переходя в более устойчивые формы. Распад сопровождается испусканием альфа, бета или гамма излучения или их сочетанием. В биохимии широко применяются следующие радиоизотопы: углерод-14, водород-3 (тритий), сера-35, фосфор-32 и 33. Эти элементы испускают только бета-излучение. Обнаружить и измерять радиоактивность можно разными способами, используя счетчик Гейгера-Мюллера, жидкостной или твердотельный стинтилляционные счетчики и радиоавтографию.

Ко всем методам, используемым в биохимии, предъявляются определенные требования: они должны обладать **точностью, воспроизводимостью, чувствительностью и специфичностью**.

**Точность** отражает степень приближения результата анализа к истинному содержанию определяемого вещества. Представление о точности применяемого метода получают опытным путем. В анализируемый материал (кровь, моча, ткань) вводят известное количество исследуемого препарата и проводят определение.

**Воспроизводимость** результатов достигается проведением повторных анализов одного и того же образца биологического материала или параллельные определения в серии экспериментов (не менее 20 различных образцов). После этого вычисляют величину стандартного отклонения полученных результатов повторных исследований от среднего содержания.

Под **чувствительностью** метода подразумевается наименьшее количество определяемого вещества, которое может быть установлено с достаточной достоверностью. Чувствительность метода можно увеличить изменением условий измерения, например, использованием микрокювет в спектрофотометрах и флюориметрах, а также применением более совершенных измерительных приборов. От чувствительности метода зависит и воспроизводимость результатов.

**Специфичность** – это измерение какого-либо вещества в отличие от других веществ, присутствующих в исследуемом материале. Для обеспечения специфичности химических методов необходимо качественное выделение исследуемого материала, применение характерных для него химических реакций, качество и чистота используемых реактивов, использование совершенных приборов.

Основное требование к методам исследований – это адекватность их к поставленной задаче.

**Для оценки полученных результатов используют биометрию** – совокупность математических методов, применяемых в биологии и заимствованных из области математической статистики и теории вероятностей. Современная биометрия – раздел биологии, который включает планирование наблюдений и статистическую обработку материала (результатов).

В чем заключаются причины варьирования результатов наблюдений? Биологические признаки могут варьировать под влиянием самых различных причин. Варьирование результатов происходит вследствие:

1) естественной изменчивости признаков, 2) ошибки измерений

**Точность измерений:**

Обычно измерения проводят с точностью до десятых, сотых или тысячных долей единицы, затем цифры округляют. Полученные данные группируют - объединяют в относительно однородные группы.

Погрешность или ошибка – это разница между результатами измерений и действительно существующими значениями результата измеряемой величины. Ошибки могут возникать из-за неисправности и неточности измерительных приборов и инструментов (технические ошибки), личных качеств исследователя, его навыков и мастерства в работе (личные) и целого ряда других причин (случайные). Технические и личные ошибки являются систематическими, неслучайными, их можно преодолеть, совершенствуя технические средства, условия работы и личный опыт.

Случайные ошибки – это ошибки одиночного значения. Наличие случайных ошибок выражается в том, что при повторном определении одного и того же материала получают не одинаковые, а различающиеся между собой результаты. Величина случайных ошибок является мерой воспроизводимости лабораторных показателей. Чем меньше случайных ошибок, тем лучше вопроизводимость данных. Полученные данные группируют и объединяют в относительно однородные группы, составляя статистические таблицы, статистические ряды – ряд числовых значений признака, расположенных в определенном порядке. Вариационный ряд или ряд распределения – это двойной ряд чисел, показывающий, каким образом числовые значения признака связаны с их повторяемостью в данной статистической совокупности.

Средние величины в отличие от индивидуальных числовых характеристик обладают большей способностью характеризовать целую группу однородных единиц одним средним числом. Среднее арифметическое – это центр распределения, вокруг которого группируются все варианты статистической совокупности.

**Результаты биохимических исследований выражаются в единицах СИ.** Основные единицы системы СИ – метр, килограмм, секунда, моль. Содержание вещества, молекулярная масса которых известна, выражается величиной молярной концентрации. Молярная концентрация – это количество молей вещества, находящихся в литре раствора. Для выражения активности ферментов применяется размерность моль/секунда/литр.

**Расчет концентрации раствора:**

массовая концентрация, это количество вещества: г/л , мг/л, мкг/л

молярная концентрация, это количество молей вещества в литре раствора: моль = м.в. /1 л , М/л, мМ/л = 0,1 М, мкМ/л =0,001 М.

Пример : Для приготовления раствора какой-либо концентрации необходимо рассчитать по формуле вещества его молекулярный вес (таблица Менделеева) и это количество вещества растворить в 1 раствора. Если необходимо приготовить раствор меньшего или большего объемов составляют пропорцию: молекул. вес вещества - 1000 мл

Х г вещества - 100 мл

**Активность фермента** выражается его молярной концентрацией за определенный промежуток времени (мин, сек). Выражается активность фермента содержанием его в определенном количестве (г или мг) ткани, либо (г или мг) белка, содержащегося в определяемой ткани, сыворотке крови, ликворе. Пример: моль/мин/г ткани, мкмоль/мин/мг белка.

Пример:

Для определения количества вещества строится калибровочная кривая. Для этого готовят растворы вещества, например, белка известной концентрации (15-20 разведений) и измеряют на спектрофотометре при определенной длине волны. По полученным точкам строят калибровочную кривую. Раствор неизвестного вещества также измеряют на спектрофотометре. Полученную цифру сравнивают с калибровочной кривой, определяя по ней количество вещества в растворе.

Имеются приборы с компьютерными программами для определения концентрации растворов. В этих электронных приборах учитывается необходимая длина волны, объем или вес образца, время протекания реакции.

Таким образом, биохимические методы позволяют объективно оценить и охарактеризовать состав сложных биологических систем, какими являются биологические жидкости организма человека. Биохимические анализы широко используются в медицине для дифференциальной диагностики заболеваний, прогноза, мониторинга и скрининга. Биохимические исследования помогают подтвердить или опровергнуть диагноз, выявить болезнь в доклинической стадии, проследить течение болезни и возможные осложнения, оценить эффективность проводимой терапии. Основная задача клинической биохимии - исследование функционирования живых систем с точки зрения процессов, протекающих в клетках и в клеточных структурах. Однако полученные результаты необходимо рассматривать на уровне органов, тканей, всего организма и во взаимосвязи целого организма с окружающей средой.

Для получения результатов биохимического анализа, правильно отражающих происходящие в организме изменения, необходимо обеспечить соблюдение стандартных условий предлабораторного этапа, который включает: соответствующую подготовку пациента к исследованиям, правильное взятие пробы биологического материала, соблюдение условий его хранения и транспортировки в лабораторию.

Какие м**етоды** количественного анализа используют в клинико-диагностических лабораториях - это:

1. **Весовой** (гравиметрический) анализ - основан на выделении вещества в результате определенных реакций, высушивания и точного взвешивания его на аналитических или торсионных весах.

2. **Объемный** (титрометрический) анализ - основан на точном измерении объемов реагирующих между собой веществ в эквивалентных (равных) количествах. Объемный анализ включает метод нейтрализации, метод окислительно-восстановительных реакций, комплексонометрии, метод осаждения и т.д.

3. **Электрообъемные** (электроаналитические) методы - основаны на электрохимических свойствах растворов. В эту группу входят потенциометрия, вольтамперометрия, полярография и т.д. Определение проводят в биологических жидкостях с помощью ионоселективных электродов.

4. **Оптические методы** -поляриметрия, фотометрия.

5. Из **методов разделения биологического материала** наиболее часто используют следующие методы: электрофорез, хроматографию, ультрацентрифугирование Для этой цели разработаны и серийно выпускаются автоматические анализаторы для биохимических, гематологических, микробиологических и других исследований.

Оценка качества выполненных исследований позволяет предупредить и устранить возможные ошибки, повысить точность и диагностическую надежность результатов анализа.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Мецлер Д. Биохимия. Т. 1, 2, 3. “Мир 2000
2. Ленинджер Д. Основы биохимии. Т.1, 2, 3. “Мир” 2002
3. Фримель Г. Иммунологические методы. М. “Медицина 2007
4. Медицинская электронная аппаратура для здравоохранения. М 2001
5. Резников А.Г. Методы определения гормонов. Киев “Наукова думка 2000
6. Бредикис Ю.Ю. Очерки клинической электроники. М. “Медицина 1999