

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ Е. И. Шишацкая
ициалы, фамилия
« ____ » _____ 2019 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология
Физиологические связи острофазного ответа в условиях патологии

Научный руководитель

_____ доцент, к.б.н.
подпись, дата

Ф.А. Гершкорон

ициалы, фамилия

Выпускник

_____ подпись, дата

П.В. Курякова

ициалы, фамилия

Красноярск 2019

СОДЕРЖАНИЕ

1.1	Белки острой фазы.....	4
1.2	Эстрadiол	14
1.3	Тироксин.....	15
1.4	Гипоталамо-гипофизарная система	17
1.5	Диффузно-токсический зоб	20
1.6	Ишемическая болезнь сердца.....	25
2	Методы и материалы исследования белков острой фазы.....	27
2.1	Метод определения церулоплазмина по методу Равина	27
2.2	Определение содержания С-реактивного белка методом латекс-агглютинации	28
2.3	Иммуноферментный анализ.....	33
3	Результаты и их обсуждение	42
3.1	Результаты исследования.....	Ошибка! Закладка не определена.
	Заключение	Ошибка! Закладка не определена.
	Список использованных источников	43

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность рассматриваемой темы в том, что воспаление, как и каждый патологический процесс имеет для организма не только разрушительное, но и защитное значение. Вредоносное действие воспалительного процесса заключается в повреждении клеток и тканей того органа, где развивается воспаление. Это повреждение обычно приводит к большему или меньшему изменению функций воспаленного органа или тканей. В то же время воспалительная реакция имеет приспособительное значение для организма. Указывают на роль воспалительного отека (скопление экссудата в воспаленной ткани) как фактора способного связывать бактериальные токсины в очаге воспаления и не допускать их всасывания и распространения в организме. Особенно большое приспособительное значение имеет фагоцитарная и пролиферативная функции соединительнотканых клеток – гистиоцитов, макрофагов. Защитное значение воспаления особенно настойчиво подчёркивал И.М.Мечников.

Целью работы стало исследование физиологических связей острофазного ответа в условиях патологии.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

- исследовать содержание С-реактивного белка с помощью метода латтекс-агглютинации у людей с ИБС(不稳定ная стенокардия) и ДТЗ;
- исследовать содержание церулоплазмина с помощью метода Равина людей с ИБС(不稳定ная стенокардия) и ДТЗ;
- исследовать содержание гормонов эстрадиола и тироксина в сыворотке крови методом ИФА у людей с ИБС(不稳定ная стенокардия) и ДТЗ;
- исследовать корреляционную зависимость между содержанием гормонов эстрадиола и тироксина и содержанием белков острой фазы.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Белки острой фазы

Белки острой фазы – это эволюционно консервативное семейство белков, вырабатываемых в основном в печени в ответ на травму и инфекции. Концентрации БОФ изменяется со временем в плазме крови после повреждения (травмы, ожога, хирургического вмешательства) в процентах от исходного уровня):

- 1 – С-реактивный белок, амилоидный А-белок сыворотки;
- 2 – а1-антитрипсин, а1-кислый гликопротеин, гаптоглобин, фибриноген;
- 3 – С3- и С4-компоненты комплемента, С1-ингибитор, церулоплазмин;
- 4 – альбумин, преальбумин, трансферрин, фибронектин, апоА-липопротеин [1].

БОФ объединяют до тридцати белков плазмы крови участвующих в воспалительном ответе на повреждение. Эти белки относятся к классу глобулинов, продуцируются гепатоцитами и макрофагами [2]. Концентрация этих белков может изменяться при различных стадиях патологических состояний. Массивность повреждения тканей существенно влияет на концентрацию белков острой фазы. Наименьшей по содержанию является фракция а1-глобулинов, к представителям которых относится а1-антитрипсин (α_1 -АТ) – самый мощный ингибитор протеолитических ферментов сыворотки крови, активность которого составляет до 90% общей антипротеолитической активности крови, а так же ингибитор бактериальных и гранулоцитарных протеиназ, высвобождающихся в зоне воспаления [3].

Интерлейкины-представители универсальных цитокинов, обнаруженные в лейкоцитах, производимые моноцитами, макрофагами, нейтрофилами,

фиброластами, клетками глии, клетками нейроглии, а так же клетками злокачественных опухолей [4]. Синтез интерлейкинов может быть продуцирован продуктами жизнедеятельности микроорганизмов, солями кремния, желчных кислот, мочевой кислоты, гликопротеинами табака, гипоксией, гиперкисью, гипертермией и др.

Острая фазовая реакция представляет собой суммарную реакцию организма на многочисленные нарушения его физиологического гомеостаза. Воспалительные процессы являются основными причинами возникновения этих защитных механизмов. Интерлейкины зависимые процессы в основном предназначены для защиты. Главным стимулятором синтеза ИЛ-6 являются вирусы, бактерии, эндотоксины, липополисахариды, грибы, противовоспалительные цитокины ИЛ-1 и ФНОа. Интерлейкин 1 секретируют производство опухолевых клеток. В отличие от нормальных клеток, опухолевые ткани производят ИЛ-6 постоянно и в отсутствии всякой внешней активации [5].

Осуществление действия ИЛ-6 осуществляется через специфические рецепторы для ИЛ-6, наибольшее количество которых обнаруживается на клетках печени. Фактор некроза опухолей (ФНО) – третий важнейший гормон БОФ. Он впервые был обнаружен как агент, появляющийся в сыворотке крови животных и человека во время бактериальных инфекций, способный убивать опухолевые клетки *in vitro* и вызывать геморрагический некроз опухолевого трансплантата *in vivo* [6]. Он же оказался решающим за развитие кахексии при тяжелых хронических болезнях, что дало ему второе название – кахектин.

Синтез ФНО вызывается бактериальными, токсинами, вирусами, микобактериями, грибами, паразитами, активированными компонентами комплемента, комплексами антиген-антитело, цитокинами.

Белки острой фазы осуществляют различные функции, способствующие сохранению гомеостаза:

1. Обеспечивают развитие воспаления;
2. Стимулируют фагоцитоз чужеродных тел;
3. Нейтрализуют свободные радикалы [7];
4. Разрушают потенциально опасные для тканей белки и т.д.

Белки острой фазы синтезируются в печени. Этот процесс интенсифицируется катехоламинами. А также выходом из лейкоцитов в процессе фагоцитоза различных пептидных факторов, способствующих биосинтезу белка. Повышение уровня белков острой фазы воспаления является компенсаторной реакцией, связанной со свойствами ингибировать деструктивные клетки, способные вызывать вторичное повреждение тканей [8]. Благодаря этому в организме ограничивается воспалительный процесс и подавляется аутоагgressия [9].

Увеличение содержания БОФ в плазме крови отмечается спустя пять часов после повреждения тканей. Максимальные сдвиги обнаружены между 12 и 48 часами при острой воспалительной реакции [10]. Интерпретируя количественное содержание БОФ следует учитывать функциональное состояние печени и почек, так как в период воспалительной реакции в гепатоцитах уменьшается образование альбуминов.

Выделяют две группы БОФ:

- 1) негативная группа – концентрация БОФ снижается (альбумин, трансферрин);
- 2) позитивная группа – концентрация БОФ повышается в 2–10 раз (альфа-1– антитрипсин, альфа-1– антихимотрипсин, фибриноген, гаптаглобин); менее чем в 2 раза (церулоплазмин, С3 компонент комплемента, инактиватор С1 компонента комплемента) и более, чем в тысячу раз (С – реактивный белок (СРБ), сывороточный амилоидный протеин А(САП-А)).

Церулоплазмин – протектор клеточных мембран, нейтрализующих активность супероксидного и других радикалов. Относится к главным медьсодержащим белкам плазмы крови. Общее содержание меди в организме человека – 3% [11]. Церулоплазмин инактивирует активные формы кислорода, предотвращая перекисное окисление липидов.

Церулоплазмин представляет собой белок с молекулярной массой около 150000 дальтон, содержит 8 ионов Cu⁺ и 8 ионов Cu²⁺. Церулоплазмин обладает выраженной оксидазной активностью; в плазме он также лимитирует освобождение запасов железа, активирует окисление норадреналина, серотонина и сульфгидрильных соединений, а также инактивирует активные формы кислорода, предотвращая перекисное окисление липидов [12].

Снижение содержания церулоплазмина в крови в связи с нарушением синтеза этого белка в печени вызывает болезнь Вильсона-Коновалова. Болезнь можно охарактеризовать как гепатоцеребральная дегенерацию [13].

Выход ионов меди в внесосудистое пространство сопровождается их прохождением через базальные мембранные в гломерулярный фильтрат и выведение с мочой или накоплением в роговице, как представителя органа соединительной ткани.

Уровень содержания меди в центральной нервной системе является маркёром заболевания. Дефицит церулоплазмина вызывает недостаток ионов меди в крови что приводит к повышению их абсорбции в кишечнике, что в дальнейшем повлияет на накопление церулоплазмина в жизненно важных органах [14]. Недостаток церулоплазмина также сопутствует заболеваниям пищеварительной, выделительной системы, заболеваниям печени в следствие нарушения синтезирования.

Медь, являясь необходимым элементом биологических процессов, участвует в гемопоэзе, функционировании иммунной системы, построении

специфических медью зависимых ферментов, метаболизме глюкозы, холестерина, работе миокарда, мозговой ткани [15].

Недостаток меди может быть наследственно обусловленным и приобретенным. Чаще всего дефицит диагностируется у детей. К основным клиническим симптомам недостатка меди относятся нейтропения, анемия, гипотония, нарушение метаболизма глюкозы, аномалии костей, недостаток пигмента в волосах, задержка роста [16].

Дефицит меди может проявляться как измененный ответ нейтрофилов на инфекцию вызванную вирусами, в следствие чего нарушается активность макрофагов.

Доказанным фактом является значение меди в процессе эмбриогенеза. Дефицит меди приводит к нейрохимическим изменениям, к снижению активности медью зависимых ферментов, к снижению липидного обмена, генетического аппарата клетки, что в будущем приводит к нарушениям этиологических реакций.

Предполагается, что количество меди, участвующее в метаболических процессах, также как и количество железа, марганца, цинка и селена во взрослом организме соответствует интенсивности обмена веществ. Металлоэлементы усваиваются в связанном форме, после чего происходит их преобразование, однако этот процесс характерен не всем элементам [17].

Люди, имеющие ограниченные запас таких микроэлементов как медь, железо, цинк, марганец, селен в связи с низким уровнем пищевого потребления этих металлов переносят заболевания в более тяжелой форме [18].

Л. Броман в 1967 году определил и обосновал медью транспортную функцию церулоплазмина на основе знаний о том, что церулоплазмин содержит 95% меди содержащейся в плазме крови. Дальнейшие исследования подтвердили это. Церулоплазмин вырабатывается не только в печени, но в

других тканях и органах, распространяясь по тканям организма и поставляя медьсодержащие ионы [19].

Церулоплазмин, который накануне был экскретирован другими тканями организма избирательно связывается с гепатоцитами в отличие от фибробластов, которые связывают только нативный церулоплазмин. Далее рецепторопосредованный эндоцитоз интернализирует клетки частей ионов меди после связывания со специфическими рецепторами на поверхности клеток [20].

В кровеносное русло выделяется белковая часть молекулы связанная с двухвалентным ионом меди, который потерял остатки сиаловой кислоты. Далее гепатарные рецепторы, расположенные на плазматической мемbrane узнают десиализированный церулоплазмин [21]. Поглощенная клетками печени форма церулоплазмина со связанный медью выделяется в желчь, высвобождая гидрофобные участки.

На основе исследований учеными НИИ экспериментальной медицины РАМН была предложена схема круговорота меди в организме и была выявлена роль различных изоформ церулоплазмина в процессе переноса меди [22].

Церулоплазмин участвует в гибкой системе регуляции уровня меди в плазме крови, позволяя вводить медь в составе желчи уже через полчаса после образования ее избытка, так как желчь является основным выводящим путем меди в организме [23]. Метаболические нарушения в системе оборота меди являются основной причиной токсических патологических процессов под влиянием меди [24].

Феррооксидазное действие церулоплазмина

В ходе изучения нарушений наследственных метаболических процессов в обмене железа было выявлено участие мутированного гена церулоплазмина. Состояние, при котором в крови отсутствует церулоплазмин, а в тканях мозга и в других жизненно важных органах накапливается железо, называется ацерулоплазминия. Клинические симптомы этого состояния проявляются в

неврологических диабетических симптомах, а также в дегенеративных изменениях сетчатки. Церулоплазмин окисляет двухвалентное железо до трехвалентного, который в свою очередь встраивается в молекулу апотрансферрина [25]. Насыщенный железом трансферрин, в свою очередь, переносит железо в костный мозг, где происходит синтез гема [26].

Антиоксидантное действие

Активные формы кислорода играют важнейшую роль в перекисном окислении липидов, которые в нашем организме происходят непрерывно. Субстратом перекисного окисления липидов являются соединения с легко разрывающимися двойными связями при перекисном окислении такие как ненасыщенные и полинасыщенные кислоты фосфолипидов и эфиры холестирина [27].

Химическая реакция окисления имеет каскадный характер. Начало реакции происходит под воздействием радиации ионов, ультрафиолетового излучения, под действием такой формы кислорода как озон, и под действием веществ, поступающих с пищей и воздухом [28]. Новые радикалы получаются благодаря цепной реакции. Ферментативные оксиданты занимают главенствующую роль в широком спектре химических веществ. Основным представителем антиоксидантного фермента является супероксиддисмутаза.

Электроноакцепторные свойства обуславливающие антиоксидантные функции церулоплазмина предупреждают неферментативные реакции также как и феррооксидазные свойства, благодаря чему в организме не образуются свободные радикалы, участвующие перекисном окислении липидов.

Механизм патологии, зависящий от перекисного окисления липидов, коррелирует с такими факторами как: поступление медьсодержащей пищи, медь потребляется в месте заболевания из-за ее мобилизации. При таких заболеваниях как онлогические и атерослероз возрастает перекисное окисление липидов.

Усиление перекисного окисления липидов может происходить из-за прерывания синтеза медьзависимой супероксиддисмутазы, появление которой связано со снижением меди в тканях, так меди не депонируется, а ее единственным источником становятся собственные ткани [29].

Очень важно восстановить уровень меди в тканях и снизить процессы окислени при перекисном окислении липидов у такой категории больных как, больные онкологическими заболеваниями, так как эта группа больных наиболее подвержена полиорганной недостаточности. Испытание препарата церулоплазмина показало, что он предотвращает появление этого осложнения [30].

Основным механизмом патогенного действия при ионизирующем облучении является образование активных форм кислорода [31], при введении церулоплазмина происходит антиоксидантное воздействие, что положительно оказывается на организме и подтверждает антиокислительную активность церулоплазмина и его радиозащитный эффект [32].

Церулоплазмин удаляет радиотоксины, при этом сохраняя кроветворную и другие системы. Исходя из этого, можно говорить о том, что церулоплазмин повышает радиорезистенность. Экспериментальные исследования показали, что введение церулоплазмина лабораторным животным до и после облучения увеличивает их выживаемость, способствует нормализации отдельных показателей гемограмм и миелограмм [33].

Было показано, что радиозащитным эффектом обладают и препараты меди. Поскольку ЦП — основной переносчик меди в организме, можно предположить, что транспорт меди — один из механизмов его радиозащитного действия. Из-за распада макромолекул белков, нуклеиновых кислот и других соединений лучевое поражение нарушает регуляцию кроветворения, митоза, тканевого дыхания и других жизненно важных для организма процессов.

Несмотря на то что, церулоплазмин влияет на фагоцитарную активность, его модуляция зависит от уровня иммунологических параметров, поэтому при супрессивном действии злокачественных опухолей взаимодействие церулоплазмина с иммунной системой носит сложный характер взаимодействия.

Название С-реактивного белка происходит от его способности связывать С-полисахарид пневмококка. Сначала он был охарактеризован как сывороточный белок инфекционных больных.

В начале воспаления уровень С-реактивного белка значительно (до 1000 раз [34]) повышается в течение 14-24 часов и появляется до выявления антител, в то же время как в норме содержание С-реактивного обнаруживается в минимальных количествах [35]. С-реактивный белок неспецифичен, так как включается в метаболизм липопротеидов, является посредником в агглютинации и активации системы комплемента.

С-реактивный белок усиливает действие макрофагов на злокачественные образования, так как является иммунодулятором; нейтрализует патогенные микроорганизмы, распознает микробные агенты, связывая и удаляя их, элиминирует патогенные микроорганизмы. СРБ является маркером, так как хорошо количественно отображается на ранних стадиях инфекции, отображая интенсивность воспалительных процессов, за счет чего его можно отслеживать. Ответ СРБ на инфекцию связан с тем, что этот белок продуцируются клетками печени под действие противовоспалительных цитокинов. Так же СРБ влияет на апоптоз, некроз и является протектором у животных [36]. С-реактивный белок повышается при ревматоидных процессах, туберкулезе, перитоните, после перенесения хирургических вмешательств, при злокачественных образованиях, при очаговых инфекциях, таких как хронический тонзиллит [37]; при инфаркте миокарда СРБ повышается в течение 18-36 часов, снижаясь к 19 дню, и приходит в норму к 40 дню [38]. При рецидивах инфаркта СРБ вновь повышается. При стенокардии он остается в пределах нормы. Уровень СРБ в

сыворотке и других жидкостях увеличивается при остром воспалении и не зависит от наличия гемолиза [39]:

- СРБ до 50 мг/л – при вирусных инфекциях, при хронических инфекциях (туберкулез, сифилис, дерматомиозит, ревматоидный артрит, язвенный колит);
- СРБ более 50 мг/л – тяжелые и обширные бактериологические инфекции (сепсис, острые пневмонии, при системных васкулитах, тромбозе вен, некрозе опухолей, обширные травмы [40].

Несмотря на то, что СРБ наиболее чувствительный маркер, не изучена полностью его физиологическая роль и процессы, связанные с недостатком этого белка. Более того, в последнее время получены экспериментальные и клинические подтверждения существования *in vivo* по крайней мере двух конформационно различных изоформ белка – пентамерной (pCRP) и мономерной (mCRP), несущих, как оказалось, различную функциональную нагрузку [41].

Первая эпидемиологическая работа, изучавшая корреляцию концентрации CRP у людей и частоту возникновения у них сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) появилась лишь в 1996 году [42]. Показана зависимость концентрации CRP в крови и формирования многих патологий, включая диабет II типа, ишемический инсульт, острые воспалительные заболевания (острый аппендицит, пневмонии), хронические заболевания лёгких, некоторые виды опухолей.

С-реактивный белок синтезируется в основном в печени, хотя установлено, что белок могут синтезировать нейроны, клетки почек, моноциты, лимфоциты и макрофаги альвеол [43].

1.2 Эстрадиол

Главный женский гормон, эстрадиол, молекула которого состоит из 18 атомов углерода, образуется из мужского полового гормона тестостерона с 19 атомами углерода. Вызывает развитие характерных женских половых признаков и участвует в регуляции изменений, связанных с эстральным или менструальным циклом. В период полового созревания эстрадиол стимулирует рост матки за счет увеличения их числа, так и размеров образующих ее мышечных клеток [44]. Рост влагалища, развитие срамных губ, клитора и наружных половых частей; рост волос на лобке, расширение таза и развитие его костей по женскому типу ; рост грудных желез, размножение железистых клеток в них и , наконец, отложения жира на бедрах – все эти признаки, характеризующие созревание женского организма обусловлены действием эстрадиола [45]. Рост слизистой оболочки матки (эндометрия) в начале пролиферативной фазы каждого менструального цикла так же контролируется эстрадиолом. Эстрадиол и прогестерон, оказывая сильное влияние на развитие молочных желез, тем не менее тормозят фактическое выделение выделение ими молока.

Гипофункция эстрадиола проявляется в замедлении резорбции костей, остеопорозе [46]. Патогенез этого процесса не вполне изучен.

Гиперфункция проявляется маточными кровотечениями и нарушением менструального цикла.

У мужчин высокие концентрации эстрогенов ведут к недоразвитию половых органов (гипогонадизму), к атрофии простаты и сперматогенного эпителия яичек, ожирению по женскому типу и росту грудных желез.

1.3 Тироксин

Тироксин – это тиреоидный гормон с молекулярной массой, равной 776,9 дальтон. Молекула Т4 содержит 4 атома йода. В тироксине содержится основное количество органического йода человеческого организма. Более 99% гормона при этом находится в связанном с белками плазмы состояния [47].

Окисление тесно связано с фосфорилированием и в непропущенной клетке. Однако некоторые вещества, в частности гормон тироксин могут разобщать эти два процесса (фосфорилирование и окисление) и тогда энергия потока электронов не накапливается в форме макроэргических связей [48].

Уровень тиреотропного гормона (ТТГ) является наиболее чувствительным маркером уровня продукции тиреоидных гормонов и в комплексе с другими клинико-лабораторными показателями определяет лечебно-диагностическую тактику при заболеваниях щитовидной железы (ЩЖ). В общей популяции уровень ТТГ у 97% лиц составляет менее 5 мЕд/л. При исключении из выборки носителей антител к ЩЖ и лиц, имеющих зоб или ближайших родственников с тиреоидной патологией, лишь в 8% случаев уровень ТТГ превышает 2,5–3 мЕд/л.

Национальная академия клинической биохимии (НАКБ) США в 2003 г., при участии всех тиреоидных ассоциаций мира, опубликовала данные о том, что уровень ТТГ, превышающий 2,5 мЕд/л, может являться предиктором развития гипотиреоза [47]. При этом были даны рекомендации по более активному наблюдению лиц с “высоконormalным” уровнем ТТГ. В то же время в литературе появились данные о целесообразности снижения верхней границы референсных значений ТТГ. Интервал 0,4–2,5 мЕд/л рядом авторов стал рассматриваться как целевой при заместительной терапии тироксином (Л-T4) [48]. Однако эти положения пока еще не подкреплены результатами исследований и потенциально могут привести к неоправданным финансовым

затратам (за счет значительного увеличения числа пациентов с гипотиреозом) и клиническим решениям, а также к сложностям при проведении заместительной терапии гипотиреоза. Одним из факторов, который необходимо принимать во внимание при обсуждении этой проблемы являются физиологические колебания уровней ТТГ и тиреоидных гормонов. Помимо циркадианных ритмов секреции, определенное клиническое значение может иметь индивидуальная вариабельность лабораторных показателей, которая отчасти может быть обусловлена использованием различных тест систем, приемом лекарственных препаратов и сопутствующими заболеваниями [49].

T4 считается главной формой тиреоидных гормонов в крови. При этом активность последнего в десять раз превышает активность первого. Высвободившиеся в кровь молекулы гормонов T4 и T3 связываются с белками-переносчиками и с их помощью переносятся к органам-мишеням, которыми являются все ткани за исключением селезенки и семенников. Поступив в ткани-мишени, указанные гормоны освобождаются от белка и поступают непосредственно в клетки. Более 90% T4 в клетках теряет один атом І и превращается в T3. Указанное обстоятельство делает T3 главным тироидным гормоном внутри клеток 2.

Норма содержания свободного тироксина в крови составляет 10-20 пмоль/л. Нормы концентрации свободной фракции T3 составляют 2,5-5,5 пмоль/л.

Норма содержания общего тироксина в крови варьирует в зависимости от возраста человека, а именно: новорожденные до 1 месяца – 116-232 нмоль/л; дети до 5 лет – 90-194 нмоль/л; дети до 10 лет – 83-172 нмоль/л, дети старше 10 лет и взрослые до 60 лет – 65-155 нмоль/л, взрослые старше 60 лет – 65-135 нмоль/л, беременные в последние 5 месяцев – 79-227 нмоль/л.

Нормы концентрации общего T3 также варьируют в зависимости от возраста: новорожденные — 1,16–4,00 нмоль/л, дети до 5 лет — 1,54–4,00

нмоль/л, дети до 10 лет – 1,39–3,70 нмоль/л, дети 10–15 лет — 1,23–3,23 нмоль/л, взрослые — 1,17–2,18 нмоль/л [49].

1.4 Гипоталамо-гипофизарная система

Для нормальной жизнедеятельности сложного организма, например человека, необходима помимо всего прочего, координация между множеством возможных метаболических реакций. Скорость каждой из них должна повышаться или понижаться в ответ на те или иные изменения в окружающей среде. Частично эти скорости определяются кинетическими свойствами ферментов: они повышаются или понижаются в ответ в соответствии с изменениями концентрации субстратов и факторов [50]. Например, глюкозо-6-фосфат может превращаться в печени в глюкозо-1-фосфат, фруктозо-6-фосфат, 6-фософоглюконовую кислоту или свободную глюкозу; каждую из этих реакций катализирует особый фермент, и скорость каждой из них зависит от средства соответствующего фермента к глюкозо-6-фосфату и от максимальной скорости данной ферментативной реакции при полном насыщении фермента субстратом. Одно лишь изменение концентрации глюкозо-6-фосфата приведет не просто к сдвигу скоротай метаболических реакций, но и к изменению самого направления процессов обмена [51]. При малых концентрациях глюкозо-6-фосфата субстратом будет насыщен только один фермент-глюкозо-6фосфатдегидрогеназа, имеющийся в небольшом количестве глюкозо-6-фосфата сможет превратиться в 6-фософоглюконовую кислоту. При этой низкой концентрации субстрата глюкозо-6-фосфатаза, сродство которой к нему очень невелико, вряд ли вообще будет действовать, и лишь ничтожная часть глюкозо-6-фосфата, сможет превратиться в свободную глюкозу. При высоких концентрациях глюкозо-6-фосфата, когда все ферменты насыщены субстратом, направление метаболических процессов будет уже определяться соотношением максимальных скоростей реакций всех четырех ферментов. Так как

максимальная скорость реакции, катализируемой глюкоза-6-фосфатазой, особенно велика, то при высоких концентрациях глюкозо-фосфата большая часть будет превращаться в глюкозу [52].

Помимо концентраций субстрат и кофакторов, на активность многих ферментов влияет так же присутствие других молекул. Например, АМФ повышает, ап АТФ тормозит активность фософруктокиназы, превращающей фруктозо-6-фосфат в фруктозо-1,6-дифосфат. В то же время АМФ тормозит активность фруктозодифосфатазы-фермента, катализирующую обратное превращение фруктозо-1,6-дифосфата в фруктозо-6-фосфат [53]. Противоположное влияние АМФ на эти два фермента позволяет избежать одновременного действия их обоих, которое проводило бы к бесполезной трате АТФ в результате его циклического гидролиза.

На эти регулирующие факторы, определяемые свойствами самих ферментов и изменением их активности под действием метаболитов, накладываются влияния иного рода, обусловленные специфическими гормонами. Некоторые гормоны – тироксин, инсулин, гормон роста и кортизол – оказывают глубокое воздействие на метаболизм самых различных тканей; кроме того они участвуют в координации между многочисленными метаболическими реакциями, которые могут протекать в этих тканях [54].

Гипофиз лежит в небольшом углублении на дне полости черепа под самым гипоталамусом. Эта железа величиной примерно с горошину состоящая из двух долей. Ее передняя доля закладывается как вырост крышки ротовой полости а задняя растет вниз от нижней стороны головного мозга. Когда обе части встречаются, передняя доля частично обрастают задней. Передняя доля утрачивает связь с ротовой полостью, задняя же сохраняет связь с гипоталамусом. Определенные клетки гипоталамуса выделяют особые вещества – рилизинг – факторы, стимулирующие секрецию то или иного гормона передней доли гипофиза. Первым из них был химически

охарактеризован фактор, стимулирующий секрецию тиреотропного гормона; он оказался трипептидом-Пироглутомилгистидилпролиламидом [23].

Передняя доля гипофиза содержит клетки по меньшей мере пяти различных типов, которые различаются по своей форме, величине, окрашиваемости (на гистологических препаратах) и характеру цитоплазматических гранул. Вероятно, клетки каждого типа вырабатывают особой гормон.

Передняя доля гипофиза выделяет тиреотропный гормон, который стимулирует в щитовидной железе ряд процессов связанных с образованием и секрецией тироксина. Повышение концентрации тироксина ведет к уменьшению секреции тиреотропного гормона, а при пониженной концентрации тироксина выделение тиреотропного гормона наоборот усиливается. Такого рода отрицательная обратная связь поддерживает содержание обоих гормонов в крови на более или менее постоянном уровне. Секреция тиреотропного гормона гипофизом может повыситься под действие специфического фактора, выделяемого клетками гипоталамуса в ответ на нервный стимул, возникающий при понижении температуры тела [50]. Гипоталамический фактор стимулирует секрецию тиреотропного гормона, а этот последний – секрецию тироксина, который повышает интенсивность обмена во всех клетках, а тем самым и температуру тела.

Существование этих обратных связей создаёт определенные трудности при лечебном применении гормонов. Тироксин, вводимый извне, подавляет секрецию тиреотропного гормона точно так же как и эндогенный тироксин так что при выделении тироксина собственной щитовидной железы больного уменьшается.

В яичнике стероидные половые гормоны секретируют клетки, выстилающие полость яйцевого фолликула, и желтое тело, образующиеся из этих клеток после овуляции. Яичники секретируют женские половые гормоны двух типов-эстрогены (к которым относится эстрадиол) и прогестерон [45].

1.5 Диффузно-токсический зоб

Диффузный токсический зоб (ДТЗ) считался неврологическим заболеванием до 1840 года, когда ученые Базедов и Грейвс связали его с работой щитовидной железы, но основной причиной ДТЗ все равно считали нарушения центральной нервной системы. В 30-е годы XX века связали стимулирующее влияние гипофиза и тиреотропного гормона, который активировал щитовидную железу [10]. Было обнаружено, что заболевание обусловлено патологически процессами, происходящими в щитовидной железе, поэтому было выявлено не повышение, а снижение уровня тиреотропного гормона у больных ДТЗ, что было парадоксально.

Так выяснилось, что это заболевание обусловлено патологическими изменениями в самой щитовидной железе, поэтому в те годы оно получило название первично-токсического зоба. Однако патогенез болезни оставался неизвестным.

Р. Вольпе предложил теорию согласно которой ДТЗ обусловлен нарушением иммунологического контроля над количеством и активностью лимфоцитов, что приводит к делению лимфоцитов, инициирующих выработку антител способных стимулировать функциональную активность щитовидной железы, в результате чего развиваются ее гиперфункция и гиперплазия, к тироидной ткани и инфильтрации щитовидной железы.

Патогенез

Теория Р. Вольпе нашла всеобщее признание, и в соответствии с современными представлениями диффузный токсический зоб рассматривается как системная аутоиммунная патология, что является причиной неуклонного прогрессирования болезни в отсутствие лечения и вовлечения различных органов и систем в аутоиммунный процесс [50] - лимфопролиферацию в виде лимфоцитоза, лимфаденопатию, увеличение селезенки, а в некоторых случаях и

тимуса, а также наличие ассоциированной аутоиммунной патологии. Было выявлено в ходе выяснения роли иммунной системы и в частности лимфоцитов в развитии ДТЗ.

Наиболее известное ассоциированное с ДТЗ аутоиммунное заболевание – эндокринная офтальмопатия. Реже наблюдается аутоиммунное поражение других эндокринных органов – инкреторной части поджелудочной железы (сахарный диабет 1 типа), надпочечников (хронический гипокортицизм), половых желез (гипогонадизм). Возможны аутоиммунные заболевания системы крови (лейкопения, гемолитическая анемия и тромбоцитопения), вилочковой железы (миастения), кожи (дермопатия, витилиго), костной ткани (акропатия), висцериты (гепатит, нефрит), полисерозит. Развитие ассоциированной с ДТЗ аутоиммунной патологии зависит от возраста: чаще она наблюдается у молодых пациентов, что характерно в целом для заболеваний аутоиммунного генеза [32].

Патофизиология

Избыточное количество тиреоидных гормонов, синтезируемое при диффузном токсическом зобе, вызывает развитие синдрома тиреотоксикоза [15]. Ключевое значение в патогенезе этого синдрома имеет способность тиреоидных гормонов потенцировать активность симпатической нервной системы, что обусловлено повышением плотности адренорецепторов в клетках и возрастанием их чувствительности к катехоламинам – медиаторам симпатаoadреналовой системы. Кроме того, имеет значение структурное сходство тиреоидных гормонов с катехоламинами: как катехоламины (дофамин, норадреналин, адреналин), так и гормоны щитовидной железы являются производными аминокислоты тирозина.

Симпатомиметический эффект тиреоидных гормонов повышает функциональную активность всех органов и систем организма: активизируются процессы нервной возбудимости и проводимости, учащается частота дыхания,

сердечных сокращений, возрастает артериальное давление, увеличивается почечная фильтрации и т.д [15].

Катехоламины имеют короткий период полувыведения, долговременное симпатомиметическое действие тиреоидных гормонов связывают с их эффектами на генном уровне. Гормоны щитовидной железы индуцируют экспрессию генов, регулирующих активность катехоламинобразующих ферментов, а также связываются с ядерными рецепторами в клетке, стимулируя метаболические процессы в митохондриях.

Повышение сократительной способности сердца и вазодилатация являются также результатом непосредственного влияния гормонов щитовидной железы на миокард и гладкомышечную ткань сосудов, в которых обнаружены рецепторы к тиреоидным гормонам.

Клиника

Повышенная симптоадреналовая активность под действием избыточной продукции гормонов щитовидной железы обусловливает клинически наиболее значимые изменения со стороны нервной и сердечнососудистой систем и желудочно-кишечного тракта. Типичная неврологическая симптоматика – это повышенная возбудимость, тревожность, раздражительность, эмоциональная лабильность, бессонница, чувство жара, потливость, плохая переносимость жаркой погоды, повышенная двигательная активность, дрожь, характерный выразительный взгляд из-за блеска глаз, расширенных глазных щелей, редкого мигания. Исследование неврологического статуса выявляет мелко размашистый трепет пальцев рук и высокие сухожильные рефлексы [45].

Сердечно-сосудистый синдром характеризуется тахикардией, сохраняющейся в состоянии покоя и в ночное время, а также дилатацией сосудов, что в сочетании с усиленным кровотоком определяет состояние кожи – теплой на ощупь и бархатистой. Повышенная сократительная способность сердца и вазодилатация формируют гиперкинетический тип кровообращения:

увеличенное пульсовое давление (вследствие увеличения систолического артериального давления и снижения диастолического), ускоренный высокий пульс, усиленный верхушечный толчок сердца, пульсация сосудов шеи, области щитовидной железы и эпигастрия, по данным электрокардиографии – повышенный вольтаж зубцов, по результатам эхокардиографии – высокая фракция выброса и увеличенная экскурсия стенок сердца. Длительная повышенная функциональная нагрузка на сердце в условиях интенсивного обмена при тиреотоксикозе приводит к развитию дистрофических изменений в миокарде с последующим снижением толерантности к физическим нагрузкам, появлением одышки, в тяжелых случаях – мерцания предсердий [50].

Еще в 1940-е годы клиницисты обращали внимание на выраженные отеки вплоть до анасарки, наблюдавшиеся у ряда пациентов

ДТЗ при сохранной сократительной способности сердца и в отсутствие фибрилляции предсердий. Было высказано предположение о роли повышенной проницаемости сосудов в развитии отечного синдрома. Убедительным подтверждением значения повышенной сосудистой проницаемости, способствующей появлению отеков, застойных явлений в органах и тканях и накоплению жидкости в полостях при ДТЗ, стало выяснение аутоиммунной природы заболевания и эффективности глюкокортикоидов в терапии данного осложнения.

Характерными желудочно-кишечными симптомами являются похудание, несмотря на повышенный аппетит, склонность к частому жидкому стулу. Высокая функциональная нагрузка на печень, обусловленная повышенной активностью обменных процессов при тиреотоксикозе, приводит к увеличению уровня печеночных ферментов и билирубина [6].

Диагноз диффузный токсический зоб устанавливается на основании клинических симптомов тиреотоксикоза и его лабораторного подтверждения (исследование гормонов щитовидной железы), диффузных структурно-функциональных изменений в щитовидной железе (визуально-пальпаторная

оценка, ультразвуковое исследование, сцинтиграфия) и маркеров аутоиммунного процесса (антитела к тканям щитовидной железы, эндокринная офтальмопатия).

Гормональное исследование при тиреотоксикозе обнаруживает повышение тироксина и/или трийодтиронина наряду со значительным снижением уровня тиреотропного гормона. Для оценки тиреоидного статуса при ДТЗ определяют тиреотропный гормон и свободный тироксин, продуцируемый преимущественно щитовидной железой в отличие от трийодтиронина, образующегося из тироксина в периферических тканях.

У больных пожилого возраста могут наблюдаться менее выраженные изменения в гормональном статусе в виде умеренного снижения ТТГ в сочетании с высоконормальным уровнем свободных фракций тироксина и трийодтиронина [45].

Ультразвуковое исследование щитовидной железы выявляет в большинстве случаев увеличение тиреоидного объема, снижение эхогенности вследствие обильного кровоснабжения и повышенный кровоток. Определение объема щитовидной железы необходимо для выбора тактики ведения пациента: при тиреоидном объеме 40 см³ и более предпочтение отдается радикальному лечению (хирургический, радиоийодтерапия) в связи с высоким риском рецидива тиреотоксикоза.

Обнаружение повышенного титра антител к тканям щитовидной железы (к рецептору ТТГ, тиреопероксидазе, тиреоглобулину), а также наличие признаков эндокринной офтальмопатии подтверждают аутоиммунный генез тиреотоксикоза.

1.6 Ишемическая болезнь сердца

При поражении коронарных артерий развивается патологическое состояние, характеризующееся частичным или полным нарушением кровоснабжения миокарда, если это обусловлено атеросклерозом или осложнением сердечно-сосудистых заболеваний, то это будет являться основной причиной смертности среди взрослых лиц в различных странах мира, в том числе и России. Сердечно-сосудистые заболевания являются основной причиной смертности у 65% женщин и 50% мужчин. Ишемической болезнью сердца страдают 10 млн. трудоспособного населения России и только половина знает о своем заболевании [31].

Ежегодная смертность от ИБС составляет 2–3%, а не смертельный инфаркт миокарда развивается примерно у 3% пациентов, страдающих ИБС. Необходимо подчеркнуть, что коэффициенты смертности от ИБС в России за период с 1965 по 1998 г. среди мужчин 45–74 лет повысились с 499 до 1152, среди женщин того же возраста – с 237 до 401 на 100 тыс. населения [31].

У 95% пациентов с ИБС в коронарных артериях, преимущественно в проксимальных отделах, находят атеросклеротические поражения, что является основным фактором ишемической болезни сердца.

Коронарные артерии становятся более чувствительны к факторам окружающей среды из-за атеросклероза, так как при атеросклерозе происходит спазм и величина коронарной обструкции достигает 75%, что проявляется клинически при ишемической болезни сердца [29].

На основании многочисленных клинических, лабораторных и эпидемиологических исследований доказано, что развитие атеросклероза, в том числе коронарных артерий, связано с образом жизни, наличием некоторых особенностей обмена веществ и заболеваний или патологических состояний, которые в совокупности определяют, как факторы риска ИБС. Самыми

значимыми факторами риска являются: курение, сахарный диабет, ожирение, наличие ИБС у близких родственников, гиподинамия. Особенно вероятно развитие ишемической болезни сердца при сочетании двух и более выше указанных факторов.

Развитие несоответствия между потребностью миокарда в кислороде и возможностями коронарного кровотока удовлетворить эти потребности является основным патологическим механизмом развития ишемической болезни сердца. Из-за такого несоответствия развиваются такие факторы:

- 1) органическое нарушение проходимости коронарных артерий, обусловленная атеросклерозом. Механизм резкого ограничения кровотока связан с инфильтрированием стенок артерий атерогенными липопротеидами, развитием фиброза, формированием атеросклеротических бляшек и стенозированием, а также с образованием тромба;
- 2) динамическая обструкция коронарных артерий характеризуется развитием коронароспазма на фоне атеросклеротически измененных артерий. В этой ситуации степень сужения просвета артерии зависит как от степени органического поражения, так и от выраженности спазма (концепция “динамического стеноза”). Сужение просвета артерии до 50% часто протекает бессимптомно для организма, сужение более 70% ведет к стенокардии. Чем проксимальное расположено стеноз, тем большая масса миокарда подвергается ишемии в соответствии с зоной васкуляризации.

Течение ИБС может быть различным. В некоторых случаях болезнь начинается остро, манифестируя острым коронарным синдромом, к которому относят нестабильную стенокардию и острый инфаркт миокарда. Иногда первым (и последним) проявлением болезни является внезапная сердечная смерть. Однако чаще всего ИБС приобретает хроническое течение и проявляется стабильной стенокардией напряжения. Стенокардия служит первичным проявлением ишемической болезни сердца у 40% процентов мужчин и 56% у женщин [50]. С острого инфаркта миокарда болезнь

начинается у 52,2% мужчин и у 36,1% женщин. Неблагоприятная значимость стенокардии выше у мужчин, нежели чем у женщин.

2 МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЛКОВ ОСТРОЙ ФАЗЫ

Объектом исследований являлась плазма и сыворотка больных. Контрольную группу составили здоровые люди. Пробы предоставлялись институтом «НИИ медицинских проблем Севера».

Количество людей с патологиями составило:

- с ДТЗ – 32 человека;
- ИБС – 50 человек;

Уровень церулоплазмина определяли в плазме крови по методу Равина.

Для определения С-реактивного белка в сыворотке крови был использован метод латекс-теста.

Для определения эстрadiола и тироксина был использован иммуноферментный анализ.

2.1 Метод определения церулоплазмина по методу Равина

Принцип метода основан на окислении р-фенилендиамина при участии ЦП.

Реактивы:

1. 0.5% водный раствор солянокислого р-фенилендиамина.
2. 0.4 М ацетатный буфер, pH 5.5. Готовят из двух растворов:

1) 54.44 г ацетата натрия растворяют в 1л дистиллированной воды;

2) 22.6 мл ледяной уксусной кислоты доводят до 1л.

Полученные растворы смешивают в отношении 9:1 в большом количестве.

3. 3% раствор фтористого натрия. После растворения соли в дистиллированной воде раствор профильтровывают.

Ход определения:

В пробирки вносят по 8 мл ацетатного буфера и 0.1 мл плазмы. В контрольную пробирку добавляют 2 мл раствора фтористого натрия (для инактивации ферментативной активности ЦП). Затем во все пробирки вносят по 1 мл раствора р-фенилендиамина (используемого в качестве субстрата). Пробирки встряхивают, помещают в термостат и инкубируют в течение часа при температуре 37°C. После инкубации во все пробирки (за исключением контрольной) добавляют по 2 мл раствора фтористого натрия. Содержимое пробирок перемешивают, затем их переносят в холодильник, где выдерживают 30 мин при 4°C. Пробы колориметрируют против контроля (бледно-розовой окраски) в кюветах с шириной слоя 1,0 см при L = 530 нм.

Умножая значение оптической плотности на коэффициент пересчета 875, получают величину концентрации ЦП в мг/л.

2.2 Определение содержания С-реактивного белка методом латекс-агглютинации

Метод латексной агглютинации (ЛА) – это иммунологический метод, основанный на агрегации модифицированных латексных частиц, происходящей вследствие афинного взаимодействия антиген-антитело.

Латекс-агглютинация может использоваться как быстрый полуколичественный метод определения СРБ. Его назначение – скрининг повышенных концентраций, после чего следует перейти к мониторингу с использованием количественных методов.

СРБ-латекс реагент представляет собой суспензию латексных частиц, на поверхности которых иммобилизированы антитела против СРБ человека. При смешивании данного реагента с сывороткой крови, содержащей СРБ в концентрации, превышающей 5 мг/л, в результате специфической реакции между антителами к СРБ и СРБ развивается агглютинация латексных частиц. Агглютинация определяется визуально, что свидетельствует о положительной реакции пробы.

Реакцию латексной агглютинации возможно провести несколькими способами. Различают прямую и конкурентную реакцию латексной агглютинации (в различных источниках так же встречаются названия «торможение реакции латексной агглютинации» или «обратная реакция латексной агглютинации»).

Реакцию прямой ЛА используют для определения поливалентных антигенов.

Преимущества метода латексной агглютинации при скрининге наркотических веществ заключаются в следующем:

- возможность использования минимальных объемов исследуемого материала,
- возможность проведения больших партий анализов,
- быстрота проведения реакции (2–10 минут),
- простота и доступность для любых лабораторий,
- не требуется специальное оборудование и высококвалифицированный персонал,

- невысокая стоимость исследования.

Реакция латексной агглютинации считается положительной при наблюдении агглютинации микрочастиц суспензии вследствие смешивания компонентов реакционной системы. Агглютинация проявляется в слипании и осаждении полимерных частиц из первоначально стабильной суспензии. Результат латексной агглютинации выявляется простым визуальным наблюдением: раствор мутнеет или выпадает творожистый осадок белого цвета или реже – окрашенный.

При положительной реакции на пластинках образуются видимые невооруженным глазом агглютинаты, которые затем увеличиваются в размере, а в пробирках выпадает осадок. В микропланшетах агглютинация проявляется в виде равномерного покрытия частицами поверхности лунки, тогда как в контроле на дне лунки образуется точечный латексный преципитат

При наблюдении реакции ЛА визуальным способом анализ проводят на стеклянных или полистирольных пластинках, в пробирках или 96-луночных микропланшетах с U-образными лунками, в которых смешивают равные объемы тестируемых сывороток в последовательных двукратных разведениях и латекс-теста и через определенное время (от нескольких минут до 5 часов) наблюдают реакцию.

Результат РЛА носит только качественный характер. Для получения полуколичественных результатов (оценка степени агглютинации) используют титры. То есть количество антител в иммунной сыворотке или в других жидкостях в реакции агглютинации по выявлению антител оценивается их титром. Под титром антител понимают то наибольшее разведение сыворотки или иной жидкости, при котором реакция антиген-антитело все еще учитывается.

Для количественной оценки агглютинации применяют различные инструментальные методы. Среди них оптические методы: турбидиметрия (по

изменению оптической плотности измеряют потерю интенсивности светового луча, прошедшего через суспензию частиц), нефелометрия (в этом случае анализируется интенсивность света, рассеянного под углом Q к падающему потоку; обычно, $Q = 90^\circ$), сканирующая лазерная микроскопия и др.

Для полуколичественного определения СРБ анализируются последовательные разведения исследуемого образца. Об уровне СРБ судят по последнему разведению (титру), при котором была выявлена визуально определяемая агглютинация.

Состав набора:

- 1.Реагент № 1. СРБ-латекс суспензия (2 мл);
- 2.Реагент № 2. Разбавитель (10 мл);
- 3.Реагент № 3. Положительный контроль – СРБ > 10 мг/л (0,1 мл);
- 4.Реагент № 4. Отрицательный контроль – СРБ < 5 мг/л (0,2 мл);
- 5.Реагент № 5. Слабоположительный контроль – СРБ 5–10 мг/л (0,2 мл);
- 6.Тест-пластина.

Подготовка реагентов к процедуре анализа:

Реагент № 1 перед применением перемешать до гомогенной суспензии осторожным встряхиванием. Перед применением все реагенты необходимо нагреть до комнатной температуры ($18\text{--}25^\circ\text{C}$).

Процедура определения:

- Качественное определение

Рас капать по 20 мкл в лунки тест-пластины исследуемые образцы и реагенты, используя каждый раз одноразовые наконечники пипеток, набирая образцы сыворотки:

- №№1-10 – исследуемые образцы сыворотки

- в лунку (+) – реагент №3 (положительный контроль)
- в лунку (–) – реагент №4 (отрицательный контроль)
- в лунку (+/–) – реагент №5 (слабоположительный контроль)

Рядом с первой каплей во всех лунках поместить по 20 мкл реагента №1 (латекс суспензии). Смешать содержимое двух капель в лунке до гомогенного состояния, охватывая всю поверхность лунки. Для каждой лунки использовать одноразовый шпатель (зубочистку, спичку). Вращать тест-пластиинку вручную или на механической мешалке со скоростью 80-100 об/мин в течение 2 минут. Развитие процесса агглютинации необходимо наблюдать в промежутке со 2-ой по 3-ю минуту от момента начала вращения тест-пластины. Затягивание процесса считывания результата может привести к регистрации ложной агглютинации, возникающей в процессе подсыхания реакционной смеси.

Оценка результатов:

Четко видимые агрегаты латексных частиц свидетельствуют о концентрации СРБ > 10 мг/л; мелкие агрегаты – о концентрации близкой к 5-10 мг/л; равномерно-гомогенная молочная суспензия указывает на концентрацию СРБ ниже 5 мг/л – результат отрицательный или ниже предела обнаружения используемого метода.

- Полуколичественное определение.

Приготовить разведения исследуемых проб с помощью реагента №2 (разбавителя) в соответствии с Таблицей 1.

Таблица 1 – Разведение исследуемых проб реагентом №2

Разведение СРБ	(мг\л)
1:1	>10
1:2	>15
1:3	>20
1:4	>25

Затем уже с каждым разведением проводить исследование в соответствии с качественным анализом.

Нормальные значения: до 5 мг/л.

2.3 Иммуноферментный анализ

Иммуноферментный анализ (ИФА) – это лабораторный иммunoлогический метод качественного определения и количественного измерения антигенов, а также иммуноглобулинов и гормонов.

Метод ИФА обладает высокой чувствительностью и специфичностью, которая в настоящее время составляет более 90%.

Достоинства иммуноферментного анализа (ИФА):

- Относительно высокая чувствительность.
- Приемлемая стоимость.
- Позволяет проводить раннюю диагностику (благодаря возможности определения классов иммуноглобулинов при анализе).

- Позволяет отслеживать динамику инфекционного процесса (благодаря возможности определения классов иммуноглобулинов).
- Удобство в работе.
- Иммunoлогический анализ крови позволяет получить быстрый ответ.

Недостатки ИФА анализа крови:

- Иногда иммуноферментный анализ дает ложноположительные или ложноотрицательные результаты [12].

Определение концентрации эстрадиола в сыворотке крови было произведено с помощью набора «ЭСТРАДИОЛ-ИФА» производства ООО «ХЕМА». Набор реагентов «ЭСТРАДИОЛ-ИФА» предназначен для количественного определения концентрации эстрадиола в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

Определение эстрадиола основано на использовании конкурентного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы кроличьи поликлональные антитела к эстрадиолу. Эстрадиол из образца конкурирует с конъюгированным эстрадиолом за связывание с антителами на поверхности лунки. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски обратно пропорциональна концентрации эстрадиола в исследуемом образце. Концентрацию эстрадиола в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания эстрадиола в калибровочных пробах.

Оборудование и материалы, необходимые при работе с набором

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450 нм;

- термостат, поддерживающий температуру +37 °C ±0,1 °C (или термостата-тируемый шейкер);
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 25–250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

Подготовка реагентов для анализа

Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре (+18...+25 °C) не менее 30 мин.

Приготовление планшета

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °C в течение всего срока годности Набора.

Приготовление отмывочного раствора

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора (22 мл), перенести в мерный цилиндр вместимостью 500 мл, добавить 440 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать. В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 21 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора + 20 мл дистиллированной воды).

Проведение анализа

1. Поместить в рамку необходимое количество стрипов – исследуемые образцы в 2 повторах и 14 лунок для калибровочных проб и контрольной сыворотки.

2. Внести в соответствующие лунки в дубликатах по 25 мкл калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внести в дубликатах по 25 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови. Внесение калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов произвести в течение 5–10 минут.

3. Внести во все лунки по 100 мкл коньюгата.

4. Заклеить планшет бумагой для заклеивания планшета и инкубировать его в течение 120 минут при температуре +37 °C.

Допускается инкубация в течение 60 минут при + 37 °C и постоянном встряхивании (600 об/мин)

5. По окончании инкубации удалить содержимое лунок и отмыть лунки 5 раз. При каждой отмывке добавить во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора, встряхните планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Задержка при отмывке (замачивание лунок) не требуется. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

6. Внести во все лунки по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина. Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина в лунки произвести в течение 2–3 мин. Инкубировать планшет в темноте при комнатной температуре (+18...+25 °C) в течение 10–20 минут в зависимости от степени развития синего окрашивания.

7. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента, при этом содержимое лунок окрашивается в ярко- желтый цвет.

8. Измерить величину оптической плотности содержимого лунок планшета на фотометре при длине волны 450 нм. Измерение ОП содержимого лунок планшета произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реагента. Бланк фотометра выставить по воздуху.

9. Построить в полулогарифмических координатах калибровочный график: ось абсцисс (x) – десятичный логарифм концентрации эстрadiола в калибровочных пробах (нмоль/л), ось ординат (y) – оптическая плотность калибровочных проб (ОП 450 нм). Для алгоритма обсчета калибровочного графика использовать интервальный метод. Приравнять концентрацию калибровочной пробы 0 нмоль/л к несущественно малой величине, например, 0.001 нмоль/л

10. Определить по калибровочному графику содержание эстрadiола в исследуемых образцах.

- Иммуноферментный анализ для определения общего тироксина «ДС-ИФА-Тироид-T4 общий»

Состав набора реагентов «ДС-ИФА-Тироид-T4 общий»

1) иммunoсорбент - планшет полистероловый разборный (12 стрипов по 8 лунок каждый разборонить до 1 лунки) с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к тироксину - 1шт

2) Коньюгант - тироксин(т4) меченый пероксидазой хрена.

Прозрачная розового цвета жидкость.

В качестве консервантов содержат: 0,1 проклин 300, 0,004 процента гентамицина сульфат. - 1 флакон, 12,0 мл

3) Калибратор 0, калибратор 1, калибратор 2, калибратор 3, калибратор 4, калибратор 5 - стандартные калибровочные пробы на основе сыворотки крови человека, содержащие известное количество общего Т4. Прозрачные или слегка

опалесцирующие бесцветные или светло-желтого цвета жидкости. Значение концентраций тироксина в калибровочных пробах указано на этикетках флаконов и в аналитическом паспорте качества. В качестве консервантов содержат: 0,1 процентов проклин, 300, 0,001 тимерусал, 0,1 процента фенол - 6 флаконов по 0,5 мл.

4) Контрольная сыворотка - сыворотка с известным содержанием общего Т4. Прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная или светло-желтого цвета жидкость. Значение концентрации тироксина в сыворотке указано на этикетке флакона в аналитическом паспорте качества. В качестве консервантов содержат: 0,1 процентов проклин, 300, 0,001 тимерусал, 0,1 процента фенол - 1 флакон, 0,5 мл

5) 8- АНС- раствор 8- анилинофтил-1-сульфокислоты- блокатор связывания Т4 с белками-переносчиком. Прозрачная зеленовато-коричневого цвета жидкость. В качестве консерванта содержит 0,05 проклин 300. - 1 флакон 12,0 мл

6) ПР (концентрант х 25) - промывочный раствор, концентрат. Прозрачная или опалесцирующая, бесцветная или светло-желтого цвета жидкость. - 1 флакон, 14,0 мл.

7) ТМБ- субстратный раствор - прозрачная бесцветная жидкость. 1 флакон, 14,0 мл.

8) стоп-реагент/0,2М- H₂S04 в концентрации 0,2 моль/литр. Прозрачная бесцветная жидкость. 1 флакон, 25,0 мл.

9) Бланк для построения калибровочной кривой - 1 шт

10) Инструкция по применению - 1 шт.

Проведение анализа

Стандартные калибровочные пробы и контрольную сыворотку вносить по 25 мкл в двух повторах. Рекомендуется оставить 2 лунки для измерения ОП

ТМБ - субстратного раствора. В остальные лунки в двух повторах внести по 25 мкл исследуемых образцов сывороток крови. Время внесения образцов не должно превышать 10 минут.

Во все лунки планшета, кроме лунок с контролем ТМБ-субстратного раствора, внести по 200 мкл смешанного реагента (коньюгант АНС), стрипы планшета закрыть крышкой или защитной пленкой. Возможно 2 процедуры инкубации планшета:

Процедура №1 (термостатируемый шейкер, 37 градусов по Цельсию)

Планшет инкубировать в течении 30 минут на термостатируемом шейкере. При встряхивании со скоростью от 500 до 800 оборотов в минуту при температуре 37,0 градусов по Цельсию.

Процедура №2 (комнатная температура)

После внесения в лунки планшета образов и смешанного реагента (коньюгат 8-АНС) содержимое перемешать аккуратным постукиванием по краям планшета в течение 30 секунд, стрипы закрыть крышкой или защитной пленкой и инкубировать в течение 90 минут при комнатной температуре(20-25 градусов по Цельсию).

По истечении указанного времени содержимое лунок удалить с помощью вошера (или многоканальной пипетки) в емкость для сбора инфицированного материала, иммуносорбент промыть 5 раз рабочим ПР, заливая его до краев лунок (не менее 300 мкл в лунку) и удаляя промывочный раствор с помощью вошера (или многоканальной пипетки) в емкость для сбора инфицированного материала. По окончанию промывки тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге. Не допускать остатка жидкости в лунках планшета.

Во все лунки отмытого планшета внести по 100 мкл ТМБ-субстратного раствора и выдержать при комнатной температуре в темноте:

Процедура №1 15-20 минут

Процедура №2 15-20 минут

Реакцию остановить добавлением во все лунки планшета по 150 мкл стоп-реагента, встряхнуть стрипы на шейкере в течение 5-10 секунд, провести учет результатов. Время между остановкой реакцией и измерением ОП не должно превышать 20 мин. Контроль внесения коньюгата рекомендуется проводить при длинах волн 540(550) нм, критерии: ОП > 0, 500.

Регистрацию результатов проводить спектрофотометрически при длине волны 450 нм с настройкой прибора по «воздуху».

Реакцию следует учитывать, если среднее значение ОП в лунках с контролем ТМБ-субстратного раствора не превышает 0,2.

Необходимо построить калибровочный график по средним величинам ОП «калибратор 0»; «калибратор 1»; «калибратор 2»; «калибратор 3»; «калибратор 4»; «калибратор 5». На бланке для построения калибровочной кривой по оси абсцисс X откладывают соответствующие значения концентраций общего T4, выраженный в нмоль/литр, по оси ординат Y откладывают средние значения ОП стандартных калибровочных проб. По полученным точкам строят плавную калибровочную кривую.

Для обсчета результатов так же возможно использовать построенный в системе координат «Logit-log» график зависимости logit (B/B0) от логарифма(LN) концентраций тироксина в калибровочных пробах, где B- среднее значение оптической плотности в лунках, содержащей калибровочные или исследумые пробы, B0- среднее значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочную пробу 0. Logit(B/B0) рассчитывается как LN((1-B/B0)/(B/B0)).

Контрольная сыворотка служит для проверки точности и достоверности результатов. Полученные результаты концентраций общего T4 в образцах

считать достоверными, если вычисленное попадает в пределы, указанные на этикетке флакона.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Из текста выпускной квалификационной работы изъяты результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Медицинская учебная литература [Электронный ресурс] //Патология // ВОСПАЛЕНИЕ // <https://auno.kz/patologiya/268-vospalenie.html> // Запись опубликована 05.08.2012
2. Абаев, Ю.К., Телятицкий, Н.И. / КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ БЕЛКОВ ОСТРОЙ ФАЗЫ // Белорусский государственный медицинский университет – 2005. – № 1. – С. 31–34.
3. Потемина, Т.Е. К729 ВОСПАЛЕНИЕ (Системные изменения в организме при воспалении. Хроническое воспаление): метод. разработки для самост. работы студентов медицинских вузов: ученик / Т.Е. Потемина, В.А. Ляляев, С.В. Кузнецова. – Н. Новгород: Издательство НижГМА, 2010. – 33 с.
4. «Медиаторы воспаления. Лихорадка» [Электронный ресурс]: Dommedika, 2016. – Режим доступа: <http://dommedika.com/phisiology/433.html>
- 5 «Значение белков острой фазы» [Электронный ресурс]: Dommedika, 2016 – Режим доступа: <http://dommedika.com/phisiology/433.html>
6. «Биология конспект лекций//Патологическая физиология//Ответ острой фазы при воспалении: патогенез, проявления. Роль цитокинов.» [Электронный ресурс]: Биология конспект лекций, 2014 - Режим доступа: <http://biology-konspekt.org/>
7. Активность воспаления [Электронный ресурс]: Профиль 16, 2014 г. – Режим доступа: <http://gemohelp.ru/id/213>
- 8.Белки острой фазы: классификация, значение в развитии воспалительной реакции. Определение С-реактивного белка: аналитическая процедура, интерпретация результата [Электронный ресурс]: Студопедия, 2015 г. Режим доступа: <http://studopedia.info/2-77783.html>.

9. Церулоплазмин в крови [Электронный ресурс]: 2016, Режим доступа:
<http://old.smed.ru/guides/372/#article>.
10. Справочник врача //С-реактивный белок// Центральный НИИ Эпидемиологии[Электронный ресурс]: 2014, Режим доступа: <https://www.cmd-online.ru/vracham/spravochnik-vracha/s-reaktivnyy-belok/>
11. Биология и фармакология церулоплазмина: от эксперимента до лекарственной терапии 2008 / Ващенко В. И., Ващенко Т. Н./ Церулоплазмин от метаболита до лекарственного средства [Электронный ресурс]: (Тема научной статьи по специальности «Фармакология») 2015 г. Режим доступа: - <https://cyberleninka.ru/article/n/tseruloplazmin-ot-metabolita-do-lekarstvennogo-sredstva>.
12. База знаний: Церулоплазмин [Электронный ресурс]: (Лабораторная служба Хеликс), 2012, Режим доступа: <http://helix.ru/kb/item/06-080>
13. Адо А.Д. и др. Патологическая физиология; рец.: Ю.М. Лопухин, Ю.В. Архипенко: - М.: Дрофа, 2009 – 256 с.
14. Ашмарин И.П., Е.П. Каразеева, М.А. Карабасова и др.: Патологическая физиология и биохимия. – М.: Экзамен, 2005-388 с.
15. Ефремов А.В. Зайчик А.Ш. Патофизиология. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008 – 961 с. 4. - СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2005-402 с.
16. Литвицкий П.Ф.: Патофизиология. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009 – 364 с.
17. Меньщикова Е.Б. и др. ; Науч. центр клин. и эксперимент. медицины СО РАМН : Окислительный стресс. - Новосибирск: АРТА, 2008-486 с.
18. Общая патологическая физиология. под общ. ред. В.А. Фролова, Д.П. Билибина ; рец.: П.Ф. Литвицкий, Г.В. Порядин:.. - М.: Высшее Образование и Наука, 2009-445 с.
19. Паткин Е.Л.: Эпигенетические механизмы распространенных заболеваний человека. - СПб.: Нестор-История, 2008-562 с.

20. Прошаев К.И., А.Н. Ильинский, И.В. Князькин, И.М. Кветной: Боль. Молекулярная нейроиммunoэндокринология и клиническая патофизиология. - СПб.: ДЕАН, 2006 – 473 с.
21. Тель Л.З.: Патологическая физиология. - М.: Медицинское информационное агентство, 2007-333 с.
22. Б.И. Ткаченко Физиология человека:. Compendium. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009-825 с
24. Роль белков острой фазы воспаления [Электронный ресурс]: «Кровь.ру» 2017 г., Режим доступа - <http://gruz35.ru/limfa/rol-belkov-ostroj-fazy-vospalenija.html>.
25. Mediators of inflammation and acute phase response in the liver. [Электронный ресурс]:2015 г. Режим доступа - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11502073>
26. Белки острой фазы воспаления [Электронный ресурс]: «Градусник.нет», 2013 г., Режим доступа: <https://gradusnik.net/belki-ostroj-fazy-vospaleniya/>.
28. Автореферат и диссертация по медицине (14.00.09) на тему: Клинико-патогенетическое и диагностическое значение белков острой фазы и маркера апоптоза при заболеваниях почек и бронхолегочной системы у детей [Электронный ресурс]: 2013 г. – Режим доступа: <http://medical-diss.com/medicina/kliniko-patogeneticheskoe-i-diagnosticheskoe-znachenie-belkov-ostroy-fazy-i-markera-apoptoza-pri-zabolevaniyah-pochech-i-b>.
29. Цитокины [Электронный ресурс]: 2014 г. Режим доступа - <https://biochemmack.ru/upload/uf/f0f/f0f6c687d5c0b5a690edb78973082a1a.pdf>
30. Дуффузный токсический зоб. Терапия [Электронный ресурс]: (Издательство: Бионика Медиа (Москва), 2015 г. – Режим доступа: <https://elibrary.ru/item.asp?id=25512734>.

31. Д. С. Кострикин - Инструкция к набору для проведения анализа «ЭСТРАДИОЛ-ИФА» производства ООО «ХЕМА» - Москва, 2018 г. – с. 2;
32. Электронный сайт «Регистр лекарственных средств России» - https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_1448.htm - дата обращения 10.03.2019;
33. Электронный сайт «medbe.ru» - статья «Химическая структура стероидных гормонов» - <https://medbe.ru/materials/endokrinnye-funktsii/khimicheskaya-struktura-steroidnykh-gormonov-estranovye-steroidnye-gormony/> - дата обращения 10.03.2019;
34. Электронный сайт «bib.social» - статья «Стероидные гормоны» - https://bib.social/endokrinologiya_1005/steroidnyie-gormonyi-152697.html - дата обращения 11.03.2019;
35. Электронный сайт «База знаний по биологии человека» - статья «Эстрогены: синтез в яичниках» - <http://humbio.ru/humbio/femrep/00005b06.htm> - дата обращения 11.03.2019;
36. Электронный сайт «Medbiol.ru» - статья «Эстрадиол: метаболизм» - <http://medbiol.ru/medbiol/femrep/00009890.htm> - дата обращения 09.03.2019;
37. Электронный сайт «Medbiol.ru» - статья «Эстрадиол (E2)» - <http://medbiol.ru/medbiol/endocrinology/00097c9b.htm> - дата обращения 09.03.2019;
38. Электронный сайт «Medbiol.ru» - статья «Эстрадиол (E2): функции» - <http://medbiol.ru/medbiol/endocrinology/000879cb.htm> - дата обращения 09.03.2019;
39. Электронный сайт «Medbiol.ru» - статья «Эстрадиол и прогестерон: механизм действия» - <http://medbiol.ru/medbiol/femrep/00009267.htm>
40. Электронный сайт «База знаний по биологии человека» - статья «Эстрогены: структура и биологическая активность» - <http://humbio.ru/humbio/femrep/00005b06.htm> - дата обращения 09.03.2019;

41. Электронный сайт «Справочник химика» - статья «Активность эстрогенная» - <https://chem21.info/info/143386/> - дата обращения 11.03.2019;
42. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. «Биохимия человека»: В 2-х томах. Т. 2. Пер. с англ.: — М.: Мир, 1993.— 215 с.
43. Лениндже А. — «Основы биохимии»: В 3-х т. Т. 1. Пер. с англ.-М.: Мир, 1985.- 67 с;
44. Свешников А. А., Бегимбетова Н. Б. – «Менструальный цикл и репаративное костеобразование при чрескостном остеосинтезе» - Изд. «Академия Естествознания» - 2012 г. -231 с.;
45. Репина М. А. – «Прогестерон и беременность»; статья для журнала «Акушерство и беременность»; Кафедра репродуктивного здоровья женщин Санкт-Петербургской медицинской академии - 2011 г.;
46. Электронный сайт «Биохимия для студента» - страница «Женские половые гормоны» - <http://biokhimiya.ru/?id=180&start=2> – дата обращения 09.03.2019 г.;
47. Д. С. Кострикин - Инструкция к набору для проведения анализа «ЭСТРАДИОЛ-ИФА» производства ООО «ХЕМА» - Москва, 2018 г. – с. 2;
48. Камышников В. С. – Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностики. – М.: МЕДпресс-информ, 2004. – 911 с.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт Фундаментальной Биологии и Биотехнологии
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
 Е. И. Шишацкая
инициалы, фамилия
«7 » июня 2019 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА
06.03.01 - Биология
Физиологические связи острофазного ответа в условиях патологии

Научный руководитель



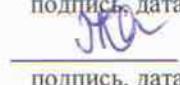
доцент, к.б.н.

должность, ученая степень

Ф.А. Гершкорон

инициалы, фамилия

Выпускник



подпись, дата

подпись, дата

П.В.Курякова

инициалы, фамилия