**Методы биохимического исследования белков крови**

Кровь представляет собой многокомпонентный водный раствор высокомолекулярных и низкомолекулярных органических и минеральных соединений, содержащий концентрированную взвесь клеток – эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов. На долю клеточных элементов приходится до 45%, а на долю плазмы свыше 55% общего объёма крови.

В плазме крови 90% приходится на воду и 10% на долю растворенных органических и минеральных веществ. Основная часть растворенных в плазме веществ представлена белками. С помощью электрофореза на бумаге или ацетатцеллюлозных пластинках сывороточные белки делятся на пять основных фракций:

-альбумин -50-62%

-α1-глобулины - 1,6- 5,8 %

-α2- глобулины -5,9 -11,0 %

-β- глобулины -7,9-14%

-γ –глобулины -11-18%.

Каждая из фракций представлена не одним индивидуальным белком, а нес-

колькими совершенно различными по своим функциям белками. Они объединяются во фракции по признаку совместной миграции в электрическом поле,так как имеют примерно одинаковые размеры и величину заряда молекул.

Изменения концентрации индивидуальных белков плазмы крови наблюдается при многих физиологических и патологических состояниях. Важное диагностическое значение имеют изменения соотношения различных белковых фракций (**диспротеинемия)**, появление необычных белков или отсутствие какого-либо белка сыворотки (**парапротеинемия)**.

Содержащиеся в плазме крови многочисленные белки, различающиеся по структуре, физико-химическим свойствам и функциям, обозначается как **общий белок** и представляет собой сумму всех плазменных белков.

Концентрация общего белка в плазме крови определяется тремя факторами:

а) скоростью синтеза;

б) скоростью удаления;

в) объёмом распределения.

Она зависит от возраста, пола, интенсивности физической активности, питания, беременности, положения тела при взятии крови для исследования У взрослых людей концентрация общего белка составляет 66-87 г/л.

**Среди патологических факторов на концентрацию общего белка влияют потери плазменных белков через почки, кишечник, нарушения синтеза при заболеваниях прежде всего печени, желудочно-кишечного тракта, изменениях объёма внеклеточной жидкости и многих других состояниях.**

Белки плазмы крови подразделяются по их функциям, причем один и тот же белок может выполнять несколько различных функций. Так альбумин сыворотки крови поддерживает её онкотическое давление, обеспечивая объём циркулирующей крови и микроциркуляцию тканей, участвует в транспорте различных веществ кровью, является белком острой фазы.

Концентрация общего белка крови может существенно изменяться в течение короткого времени; при переходе из горизонтального положения тела в вертикальное уже через 20 мин концентрация общего белка может увеличиваться на 10-20% от первоначальной величины. Ложное повышение уровня общего белка в плазме наблюдается при венепункции с наложением на плечо жгута и, особенно, массирование или т.н. «работа рукой» при взятии крови из вены. В этих случаях концентрация общего белка повышается уже через 2-3 мин. Связано это с тем, что даже непродолжительный веностаз приводит к повышению внутривенозного гидралического давления и к повышению проницаемости воды венозной стенкой, вызывающей сгущение крови.

**Изменения концентрации общего белка крови обусловлены изменениями концентрации либо альбумина, либо иммуноглобулинов.** Другие фракции белков крови при изменениях их концентраций не оказывают заметного влияния на концентрацию общего белка.

Быстрое увеличение концентрации общего белка крови (гиперпротеинемия) всегда связано с уменьшениеми объёма внеклеточной жидкости (дегидратации), а быстрое снижение (гипопротенинемия) – с гипергидратацией (задержкой избытка воды).

По механизму развития гипо- и гиперпротеинемии могут быть абсолютными и относительными.

***Абсолютная гиперпротеинемия*** развивается при увеличении какого-либо белка, в основном иммуноглобулинов. Она никогда не бывает связана с усиленным биосинтезом альбумина, поэтому гиперальбуминемия указывает на дегидратацию или технические погрешности в проведении анализа (нарушение процедуры взятии крови- венозный стаз при длительном сдавливании вен жгутом, сжимание и разжимание кисти руки в момент взятия крови .

Гипериммуноглобулинемия как причина абсолютной гиперпротеинемии наблюдается при хронических заболеваниях печени (хронический и подострый гепатит), аутоиммунных заболеваниях (ревматоидный артрит, дерматомиозит).

***Относительная гиперпротеинемия*** является следствием дегидратации. Повышенная потеря воды при многократной рвоте, поносах, обильном потоотделении, одышке вызывает сгущение крови, повышение гематокрита и увеличение содержания общего белка. При этом в равной степени увеличивается концентрация гемоглобина, количество эритроцитов; при дегидратации и повышении вязкости крови обычно снижается СОЭ.

***Абсолютная гипопротеинемия***, как правило, обусловлена снижением концентрации альбумина либо в результате повышенной потери альбумина с мочой, через слизистую оболочку кишечника, поврежденную кожу, либо в результате снижения биосинтеза альбумина печенью при её патологии (цирроз).

Патогенетически гипоальбуминемия может быть гепатогенной или нефрогенной.

Абсолютные гипопротеинеми подразделяют на ***первичные (наследственные) и вторичные (приобретенные).***

Первичную гипопротеинемию с пониженным содержанием альбумина и глобулинов (особенно гамма-фракции) находят при экссудативной энтеропатиии у детей. Такие дети страдают хронической неинфекционной диареей и теряют через кишечник большие количества лимфы и тканевой жидкости с белком.

Вторичные гипопротеинемии встречаются чаще первичных и характеризуются гипоальбуминемией на фоне гиперглобулинемии. Такие изменения белковых фракций плазмы крови называются **диспротеинемиями.** Их развитие обусловлено изменениями скорости биосинтеза различных белков - снижением синтеза альбумина и ускорением синтеза глобулиновых фракций белков. Обычно диспротеинемию вызывают острые воспалительные заболевания, циррозы печени, опухоли и другие патологические процессы.

***Относительная гипопротеинемия*** развивается при задержке воды в организме (олигурия, анурия) или при избыточной инфузии водных растворов солей и глюкозы.

Измерение концентрации общего белка крови имеет определенное диагностическое и прогностическое значение. В клинической лабораторной практике для этого используется унифицированный биуретовый метод, основанный на образовании в щелочной среде с сернокислой медью окрашенного в фиолетовый цвет продукта. Интенсивность окраски, измеряемая фотометрически, пропорциональна концентрации в растворе белка.

Другие методы, в частности, рефрактометрический применяются реже.

**Альбумин**

В количественном отношении альбумин составляет 55-60% общего белка. Среди других плазменных белков альбумин имеет относительно небольшую молекулярную массу (66241 Да). Этот белок синтезируется исключительно клетками печени. За сутки у взрослого человека синтезируется 20-25 г альбумина. Его период полураспада равен 19-20 дней. Концентрация в плазме крови колеблется у взрослых людей от 35 до 54 г/л. Молекула альбумина имеет форму эллипсоида вращения с размерами 3 х15 нм, состоит из 586 аминокислотных остатков.

Альбумин обладает большой гидрофильностью и отрицательным зарядом поверхности. Благодаря этому молекулы альбумина связывают и удерживают в кровеносном русле большое количество воды и ионов натрия,т.е. обеспечивают онкотическое и осмотическое давление крови.

Гидратированные (окруженные водной оболочкой) молекулы альбумина обеспечивают его основную функцию – микроциркуляцию тканей. Кроме того альбумин обладает способностью связывать практически все низкомолекулярные, особенно гидрофобные, соединения, такие как свободные жирные кислоты, неконъюгированный билирубин, желчные кислоты, различные лекарственные вещества, токсины эндогенного и экзогенного происхождения.Транспортная функция альбумина обеспечивает связывание и перенос различных веществ кровью к различным органам, в том числе к печени, почкам.

В результате связывания альбумином лекарственных и токсических веществ они становятся биологически и токсически неактивными. Такая способность альбумина плазмы крови связывать и инактивировать различные соединения играет важную роль в поддержании чистоты внутренней среды организма (эндоэкологии).

**Концентрация альбумина в плазме крови определяется тремя факторами:**

**а) интенсивностью его синтеза в печени;**

**б) объёмом распределения;**

**в) потерями и скоростью утилизации клетками тканей.**

Наибольшее клиническое значение среди изменений концентрации альбумина в плазме крови имеет **гипоальбуминемия**, которая чаще всего развивается в результате потери через почки с мочой (например,при нефротическом синдроме), усиленного катаболизма при лихорадке, опухолях, а также при снижении его синтеза в печени при белковом голодании, нарушениях переваривания белков в пищеварительном тракте и всасывания аминокислот в кишечнике, при заболеваниях печени. При задержке воды в организме развивается относительная гипоальбуминемия. Она характеризуется пропорциональным снижением уровня в плазме крови и других белков.

**Гиперальбуминемия** чаще всего является следствием погрешностей преа-

литического этапа исследования крови (наложение жгута на плечо при взятии крови из вены). Другой причиной гиперальбуминемии (относительной) является общая дегидратация организма при повышенной потере воды (полиурия, асцит, многократная рвота, понос, одышка, ожоговая болезнь).

Основным унифицированным методом определения концентрации альбумина в сыворотке крови является метод с бромкрозоловым зеленым. При взаимодействии альбумина с бромкрезоловым зеленым (БКЗ) в слабокислой среде в присутствии детергента образуется окрашенный комплекс зеленого цвета. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации альбумина и измеряется при 630-690 нм.

**Причины гипоальбуминемии**

|  |  |
| --- | --- |
| Потери альбумина | -нефротический синдром;  -кровопотери;  -шок;  -энтероколиты;  -ожоговая болезнь |
| Снижение биосинтеза | -цирроз печени;  -голодание;  -хронические инфекции;  -воспаление;  -заболевания пищеварительной системы |
| Повышенный катаболизм | -лихорадка, сепсис, инфекции;  -травматическая болезнь, опухоли;  -гипоксия;  -гиперкортицизм;  -панкреатит |
| Патологическое распределение | -послеоперационный период, ожоговая болезнь,токсикозы;  -асцит, плеврит, перитонит, поврежде-  ния мягких тканей |

**Белки острой фазы (БОФ)**

В ответ на любое повреждение (физическая травма, ожоги, хирургическое вмешательство, инфекции, аутоиммунные процессы и т.п.) в организме развивается комплекс физиологических реакций, направленных на локализацию очага повреждения и восстановление нарушенных функций. Этот процесс известен как воспаление, а комплекс местных и системных изменении, возникающий вслед за повреждением, составляет острую фазу повреждения (воспаления).

Одной из реакций острой фазы повреждения является изменение биосинтеза различных белков в печени, которые объединяют в группу белков острой фазы. В эту группу входят более 30 различных белков, каждый из которых участвует в воспалительном ответе на повреждение. Концентрация БОФ крови существенно зависит от стадии заболевания и объёма повреждения ткани. Длительность острой фазы воспаления зависит от времени действия в организме повреждающих факторов (флогогенов).

Особенностью БОФ является их неспецифичность относительно природы повреждающих патогенов илокализации повреждения и высокая корреляция концентрации в сыворотке крови с активностью патологического процесса. Это отличает БОФ как показателя воспаления от других, тоже неспецифических показателей, таких как ускоренная СОЭ, лейкоцитоз, изменения лейкоцитарной формулы.

Концентрация различных БОФ при повреждениях и воспалении варьирует в широких пределах. В зависимости от степени и времени изменения концентрации БОФ в сыворотке крови при воспалении все БОФ делятся на 5 групп.

**Классификация БОФ по степени и времени изменения их концентрации в крови**

|  |  |
| --- | --- |
| Группы БОФ | Белки острой фазы |
| «Главные реактанты»-увеличение их концентрации в сотни раз в течение 6-12 часов | С-реактивный белок (С-РБ)  Амилоидный белок сыворотки крови (SAA) |
| Умеренное увеличение (в2-5 раз) в течение 24 часов | Гаптоглобин  Фибриноген  α1-кислый гликопротеин |
| Незначительное увеличение (на 20-60%) в течение 48 часов | Церулоплазмин  С3-и С4-компоненты комплемента |
| «Нейтральные реактанты»- уровень их остается в пределах нормы | Иммуноглобулины G, A, M |
| «Негативные» реактанты- их концентрация снижается в течение 12-24 часов | Альбумин  Трансферрин  Апо А1-липопротеин и др. |

**С-реактивный белок (С-РБ)**

Одним из центральных участников острой фазы воспаления является С-РБ. В норме его содержание в крови не превышает 5 мг/л. Состоит из 5 идентичных субъединиц, связанных между собой нековалентными связями с образованием кольцеобразной структуры пентамера. Молекулярная масса субъединиц С-РБ составляет 23 кД.

С-РБ –это компонент неспецифического иммунного ответа, который развивается на ранних стадиях проникновения антигена в организм и действует благодаря стимуляции фагоцитоза.

С-РБ избирательно взаимодействует прежде всего с фосфатидилхолином клеточных оболочек и мембран, а также с полисахаридами поверхностных структур многих бактерий, грибов и паразитов, гликопротеинами, поликатионами и нуклеиновыми кислотами. Присоединенный к мембранам микроорганизмов и поврежденных клеток, С-РБ активирует каскад комплемента по классическому пути.

Основное значение в реакциях острой фазы С-реактивного белка заключается в распознавании потенциально токсических веществ, образующихся при распаде собственных клеток организма, в связывании их, детоксикации путем фагоцитоза и удалении из крови.

Синтез белка происходит в печени со скоростью 1-10 мг в сутки. При тяжелых воспалениях синтез возрастает в сотни раз. Его уровень в сыворотке крови повышается уже через 3-6 часов после повреждения тканей и удваивается примерно каждые 8 часов; в итоге содержание С-РБ при воспалении может превышать верхнюю граниницу референтного интервала в десятки и сотни раз. Период полураспада белка равен 12-24 часа.

Определение содержания С-РБ в сыворотке крови - широко востребованный лабораторный тест для диагностики различных заболеваний, мониторинга их течения, оценки эффективности проводимых лечебных мероприятий, прогнозирования исходов заболеваний.

Тест на С-РБ характеризуется:

-быстрым (в первые 6-12 часов, максимум на 2-е сутки) увеличением концентрации в крови при развитии острофазного ответа;

-многократным (в десятки сотни раз) возрастанием уровня С-РБ, что делает тест очень чувствительным;

-возможностью дифференцирования вирусной и бактериальной инфекции по степени увеличения его концентрации в крови;

-быстрым снижением уровня при эффективном лечении;

-простотой и доступностью теста.

До недавнего времени диагностическое значение С-РБ оценивали по показателям т.н. клинического диапазона, т.е. по уровню белка, превышающего 5 мг/л. В настоящее время в лабораторно-клинической практике широко используется высокочувствительный иммунотурбидиметрический метод с латексным усилением. Его нижняя граница чувствительности измерения концентрации С-РБ составляет 0,05 мг/л. Методом высокочувствительного измерения С-РБ (hs C-RP, от high sensitive) было обнаружено,что в норме в плазме крови всегда присутствуют т.н. базовые концентрации С-РБ.

Применение высокочувствительного измерения базовых уровней С-РБ привело к новым представлениям о механизме возникновения и развития сердечно-сосудистых заболеваний, сахарного диабета, метаболического синдрома, некоторых почечных заболеваний.

Если раньше считалось, что в основе развития атеросклероза лежат нарушения метаболизма и транспорта липидов, то в настоящее время общепризнана роль в атерогенезе хронического асептического воспаления интимы артерий.

Многочисленными исследованиями показано,что вялотекущее воспаление, которое обнаруживается по повышению концентраций hs C- РБ, связано с начальными стадиями развития атеросклероза и прогнозирует риск:

-острого инфаркта миокарда;

-мозгового инсульта;

-внезапной смерти у лиц, не страдающих сердечно-сосудистыми заболеваниями. Риск развития таких осложнений атеросклероза зависит от концентрации в сыворотке крови hs С-РБ:

-при концентрации меньше 1 мг/л – риск низкий;

-при концентрации 1-3 мг/л- риск средний;

-при концентрации больше 3 мг/л –риск высокий.