Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Фармацевтический колледж

**Молекулярная биология**

сборник методических указаний

для обучающихся к практическим занятиям

по специальности 31.02.03 – Лабораторная диагностика

(углубленной подготовки)

Красноярск

2016

УДК 57(07)

ББК 28.070

М 75

Молекулярная биология : сб. метод. указаний для обучающихся к практ. занятиям по специальности 31.02.03 – Лабораторная диагностика (углубленной подготовки) / сост. Г. В. Перфильева ; Фармацевтический колледж. – Красноярск : тип. КрасГМУ, 2016. – 101 с.

**Составитель:** Перфильева Г.В.

Сборник методических указаний к практическим занятиям предназначен для аудиторной работы обучающихся. Составлен в соответствии с ФГОС СПО (2014 г.) по специальности 31.02.03 – Лабораторная диагностика (базовой, углубленной подготовки), рабочей программой дисциплины (2015 г.) и СТО СМК 4.2.01-11. Выпуск 3.

Рекомендован к изданию по решению методического совета Фармацевтического колледжа (протокол № 4 от декабря 2016 г.)

© ФГБОУ ВО КрасГМУ

им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого

Минздрава России, Фармацев-тический колледж, 2016

**Оглавление**

[Практическоезанятие № 1 Изучение строения и функций ДНК 4](#_Toc469249890)

[Практическое занятие №2 Изучение строения и функций РНК. 8](#_Toc469249891)

[Практическое занятие №3 Изучение основ репликации 12](#_Toc469249892)

[Практическое занятие №4 Изучение основ транскрипции 15](#_Toc469249893)

[Практическое занятие №5 Изучение основ трансляции 18](#_Toc469249894)

[Практическое занятие №6 семинар «матиричные биосинтезы» 23](#_Toc469249895)

[Практическое занятие №7 Проведение ПЦР-анализа (подготовительный этап) 26](#_Toc469249896)

[Практическое занятие №8 Проведение ПЦР-анализа (анализ данных) 32](#_Toc469249904)

[Практическое занятие № 9 Определение наличия и титра антител в сыворотке крови иммуноферментным анализом. Общие принципы 36](#_Toc469249912)

[Практическое занятие №10 Определение наличия И титра антител при вгв иммуноферментным анализом 46](#_Toc469249913)

[Практическое занятие №11 Определение онкомаркеров 54](#_Toc469249933)

[Практическое занятие № 12 Определение Альфа-фетопротеина (AFP) 60](#_Toc469249934)

[Практическое занятие №13 Изучение молекулярных основ воспалительного процесса 69](#_Toc469249936)

[Практическое занятие №14 Определение компонентов комплемента 72](#_Toc469249939)

[Практическое занятие №15 Определение малонового диальдегида 80](#_Toc469249942)

[Практическое занятие №16 Определение цитокинов 85](#_Toc469249944)

[Практическое занятие №17 Изучение активности ферментов антиперекисной защиты 95](#_Toc469249946)

[Практическое занятие №18 Зачетное занятие 100](#_Toc469249948)

[Рекомендуемая литература 102](#_Toc469249949)

# Практическоезанятие № 1 Изучение строения и функций ДНК

**Значение темы**:

Уникальным свойством живых клеток является их способность к воспроизводству себе подобных с почти идеальной точностью на протяжении многих поколений. Нуклеиновые кислоты ДНК и РНК играют большую роль в передаче наследственной информации и в синтезе белка. Нуклеиновые кислоты представляют собой полимеры с молекулярной массой от нескольких тысяч до миллиардов и состоят из многих тысяч мономеров - мононуклеотидов. Изменение хотя бы одного мономера этих кислот может провести к заболеваниям, которые иногда даже передаются по наследству. Для определения состава и структуры нуклеиновых кислот важно знать последовательность, расположение и состав основных компонентов РНК и ДНК. Изменение количества кислот в крови говорит об увеличении процессов катаболизма в организме.

На основе теоретических знаний и практических умений обучающийся должен **знать**:

- структуру и компоненты ДНК.

- отличия в химическом составе ДНК и РНК.

- химические связи в мононуклеотидах и между мононуклеотидами в ДНК;

- биологические функции ДНК, и свободных нуклеотидов в организме человека;

- современные методы молекулярно-генетического анализа ДНК;

**уметь:**

* составлять и анализировать таблицы;
* решать ситуационные задачи.

Студент должен овладеть **общими компетенциями**:

ОК 2. Организовывать собственную деятельность, выбирать типовые методы и способы выполнения профессиональных задач, оценивать их эффективность и качество.

ОК 4. Осуществлять поиск и использование инфо044Fрмации, необходимой для эффективного выполнения профессиональных задач, профессионального и личностного развития.

OK 5. Использовать информационно-коммуникационные технологии для совершенствования профессиональной деятельности.

**План изучения темы:**

**1.Контроль исходного уровня знаний.**

Ответьте на вопросы:

1. Какие вещества называются нуклеиновыми кислотами?

2. Как они классифицируются?

3. Расскажите о функциях свободных мононуклеотидов в организме.

4. Строение нуклеозида.

5. строение нуклеотида.

6. Структуры ДНК.

7. Строение нуклеосомы.

8. Функции ДНК в организме.

9. Свойства ДНК.

10. ПравилаЧаргаффа.

11. Формы ДНК: строение.

12. Уровня компактизации ДНК: характеристика, укорочение ДНК на каждом уровне

13. Характеристика гистонов.

14. Принципы строения ДНК.

**2. Содержание темы:**

**Строение и виды азотистых оснований**

Азотистые основания нуклеотидов делятся на 2 типа: ***пиримидиновые***и***пуриновые***.В нуклеиновых кислотах встречаются 5 ос­новных видов азотистых оснований (пуриновые — *аденин и гуанин,* пиримидиновые — *тимин, цитозин, урацил)* и более 50 редких (не­типичных) оснований.

**Пиримидиновые основания** —являются производными*пиримиди­на*— шестичленного гетероцикла, содержащего 2 атома азота. Для пиримидиновых оснований, содержащих в мо­лекулах ОН-группы, характерна **кето-енольнаятаутомерия,** связанная с миграцией протона между атомами азота и кислорода. Енольные формы содер­жат гидроксильные группы — ОН и двойные связи у од­них и тех же атомов углерода в цикле пиримидина. Кето-формы содержат атомы кислорода, связанные двойной связью с атомами углерода в цикле пиримидина. В состав нуклеиновых кислот пиримидиновые основания входят **в** кето-формах.

**Пуриновые основания** — производные *пурина,* который представляет собой конденсированный гетероцикл, состо­ящий из цикла пиримидина и цикла имидазола:

****

**3. Самостоятельная работа.**

1. Заполнение таблицы:

Таблица 1 - Характеристика ДНК

|  |  |
| --- | --- |
| **Признак ДНК** | **Характеристика**  |
| 1. Месторасположение в клетке. |  |
| 2. Углевод. |  |
| 3. Азотистые основания:- пуриновые- пиримидиновые |  |
| 4. Молекулярная масса. |  |
| 5. Функция. |  |
| 6. структура и тип связи:- первичная- вторичная- третичная |  |

Таблица 2 –Функции ДНК

|  |  |
| --- | --- |
| **Функция ДНК** | **Чем обеспечивается** |
| 1. |  |
| 2. |  |
| 3. |  |

2. Зарисуйте химические формулыазотистых оснований, входящих в состав ДНК в енольной и кето-формах.

3. Зарисуйте структуры ДНК, суперспирализацию ДНК

4. Решите предложенные задачи:

***Задача 1****.*

Достроить вторую цепочку молекулы ДНК, имеющую следующую последовательность нуклеотидов в одной цепи: АТТЦГАЦГГЦТАТАГ.

**Вопрос:** Определить ее длину, если один нуклеотид составляет 0,34 нм по длине цепи ДНК.

***Задача 2.***

В молекуле ДНК тимидиловый нуклеотид составляет 16% от общего количества нуклеотидов.

**Вопрос:** Определите количество (в процентах) каждого из остальных видов нуклеотидов.

***Задача 3.***

Одноцепочный фрагмент молекулы ДНК имеет следующую последовательность нуклеотидов:

**ЦГТГАТТТТГГТТГТА.**

**Вопрос:**  Какой будет структура этой ДНК после репликации?

***Задача 4.***

Дан участок ДНК со следующей последовательностью нуклеотидов в одной цепочке:

**АААГТЦГГЦЦАТТГ.**

**Вопрос:**  Определить процентное содержание каждого нуклеотида на участке ДНК.

**4. Итоговый контроль знаний.**

Тестирование.

**5. Подведение итогов.**

Итоговая оценка за занятие складывается из оценки за устный ответ, решения тестовых заданий, ситуационных задач, ведения рабочей тетради.

**6. Домашнее задание:** лекция №3,4 Молекулярная биология нуклеиновых кислот - РНК.

Самостоятельная работа: решение задач, тестовых заданий.

# Практическое занятие №2 Изучение строения и функций РНК.

**Значение темы**:

Уникальным свойством живых клеток является их способность к воспроизводству себе подобных с почти идеальной точностью на протяжении многих поколений. Нуклеиновые кислоты ДНК и РНК играют большую роль в передаче наследственной информации и в синтезе белка. Нуклеиновые кислоты представляют собой полимеры с молекулярной массой от нескольких тысяч до миллиардов и состоят из многих тысяч мономеров - мононуклеотидов. Изменение хотя бы одного мономера этих кислот может провести к заболеваниям, которые иногда даже передаются по наследству. Для определения состава и структуры нуклеиновых кислот важно знать последовательность, расположение и состав основных компонентов РНК и ДНК. Изменение количества кислот в крови говорит об увеличении процессов катаболизма в организме.

На основе теоретических знаний и практических умений обучающийся должен **знать**:

- структуру и компоненты РНК.

- отличия в химическом составе ДНК и РНК.

- химические связи в мононуклеотидах и между мононуклеотидами в РНК;

- виды и биологические функции РНК, и свободных нуклеотидов в организме человека;

**уметь:**

* составлять и анализировать таблицы;
* решать ситуационные задачи.

Студент должен овладеть **общими компетенциями**:

ОК 2. Организовывать собственную деятельность, выбирать типовые методы и способы выполнения профессиональных задач, оценивать их эффективность и качество.

ОК 4. Осуществлять поиск и использование информации, необходимой для эффективного выполнения профессиональных задач, профессионального и личностного развития.

OK 5. Использовать информационно-коммуникационные технологии для совершенствования профессиональной деятельности.

**План изучения темы:**

**1.Контроль исходного уровня знаний.**

Ответьте на вопросы:

1. Какие вещества называются нуклеиновыми кислотами?

2. Как они классифицируются?

3. Расскажите о функциях свободных мононуклеотидов в организме.

4. Строение нуклеозида.

5. строение нуклеотида.

6. Структуры РНК.

7. Виды РНК

8. Функции РНК в организме.

9. Свойства РНК.

10. Строение и функции тРНК

11. Строение и функции рРНК

13. Строение и функции мРНК

14. Строение и функции гяРНК

15. Строение и функции мяРНК

**2. Содержание темы:**

**Строение и виды азотистых оснований**

Азотистые основания нуклеотидов делятся на 2 типа: ***пиримидиновые***и ***пуриновые***.В нуклеиновых кислотах встречаются 5 ос­новных видов азотистых оснований (пуриновые — *аденин и гуанин,* пиримидиновые — *тимин, цитозин, урацил)* и более 50 редких (не­типичных) оснований.

**Пиримидиновые основания** —являются производными*пиримиди­на*— шестичленного гетероцикла, содержащего 2 атома азота. Для пиримидиновых оснований, содержащих в мо­лекулах ОН-группы, характерна **кето-енольнаятаутомерия,** связанная с миграцией протона между атомами азота и кислорода. Енольные формы содер­жат гидроксильные группы — ОН и двойные связи у од­них и тех же атомов углерода в цикле пиримидина. Кето-формы содержат атомы кислорода, связанные двойной связью с атомами углерода в цикле пиримидина. В состав нуклеиновых кислот пиримидиновые основания входят **в** кето-формах.

**Пуриновые основания** — производные *пурина,* который представляет собой конденсированный гетероцикл, состо­ящий из цикла пиримидина и цикла имидазола:

****

**3. Самостоятельная работа.**

1. Заполнение таблицу:

Таблица 1 - Характеристика РНК

|  |  |
| --- | --- |
| **Признак РНК** | **Характеристика**  |
| 1. Месторасположение в клетке. |  |
| 2. Углевод. |  |
| 3. Азотистые основания:- пуриновые- пиримидиновые |  |
| 4. Молекулярная масса. |  |
| 5. Функция. |  |
| 6. Виды:-  |  |

2. Зарисуйте химические формулы азотистых оснований, входящих в состав РНК в енольной и кето-формах.

3. РНК. Зарисуйте строение тРНК.

4. Решите предложенные задачи:

**Задача 1.**

 Установите последовательность фрагмента иРНК, если соответствующий фрагмент на ДНК имеет последовательность: ААГЦТЦТГАТТЦТГАТЦГГАЦЦТААТГА.

1. Какие реакции относятся к реакциям матричного синтеза?

2. Как называется процесс биосинтеза иРНК?

3. Какие виды РНК синтезируются на ДНК?

4. Какие виды РНК имеются в клетке? В чем их биологическое значение?

**Задача 2.**

Какое строение будет иметь молекула и-РНК, если порядок нуклеотидов в цепочке гена, на котором она синтезируется, имеет следующую последовательность:

ГТГТААЦГАЦЦГАТАТТТГТА

**Вопрос**: Какова длина молекулы ДНК, если длина одного нуклеотида 0,34 нм?

**Задача 3.**

4. Химический анализ показал, что фрагмент кодирующей цепи молекулы ДНК (гена) бактериофага имеет такую структуру:

**ТТТТТТАГГАТЦА.**

**Вопрос:**  Укажите состав противоположной цепи ДНК, состав и-РНК.

**Задача 4.**

Сколько содержится тимидиловых, адениловых и цитидиловых нуклеотидов (в отдельности) во фрагменте молекулы ДНК, если в нем обнаружено 880 гуаниловых нуклеотидов, которые составляют 22 % от общего количества нуклеотидов в этом фрагменте молекулы ДНК?

**Вопрос:** Какова длина этого фрагмента ДНК?

**Задача 5.**

Укажите последовательность нуклеотидов в обеих цепочках фрагмента ДНК, если известно, что РНК, построенная на этом участке ДНК, имеет следующее строение:

**АГУАЦЦГАУАЦУУГАУУУАЦГ.**

**Вопрос** Какова длина этого фрагмента ДНК, если длина одного нуклеотида 0,34 нм?

**4. Итоговый контроль знаний.**

Тестирование.

**5. Подведение итогов.**

Итоговая оценка за занятие складывается из оценки за устный ответ, решения тестовых заданий, ситуационных задач, ведения рабочей тетради.

**6. Домашнее задание:** лекция № 5, 6,7

Самостоятельная работа: решение задач, тестовых заданий.

# Практическое занятие №3 Изучение основ репликации

**Значение темы:**

Уникальным свойством живых клеток является их способность к воспроизводству себе подобных с почти идеальной точностью на протяжении многих поколений. Нуклеиновые кислоты ДНК и РНК играют большую роль в передаче наследственной информации и в синтезе белка.

На основе теоретических знаний и практических умений обучающийся должен **знать:**

- основные этапы биосинтеза белка и их сущность

**уметь:**

- составлять и анализировать таблицы;

- решать ситуационные задачи.

Студент должен овладеть общими компетенциями:

ОК 2. Организовывать собственную деятельность, выбирать типовые методы и способы выполнения профессиональных задач, оценивать их эффективность и качество.

ОК 4. Осуществлять поиск и использование информации, необходимой для эффективного выполнения профессиональных задач, профессионального и личностного развития.

OK 5. Использовать информационно-коммуникационные технологии для совершенствования профессиональной деятельности.

**План изучения темы:**

**1.Контроль исходного уровня знаний.**

1. Этапы биосинтеза белка.
2. Что называют репликацией?
3. Компоненты репликации
4. Локализация репликации, этапы, ферменты процесса.
5. Репликация эукариот- особенности и отличия
6. Что называют репарацией?
7. Репарация: этапы, ферменты процесса.
8. Свойства генетического кода
9. Принципы репликации
10. Объясните последовательность передачи генетической информации: ген –белок – признак.

**2. Содержание темы:**

Процесс удвоения родительских молекул геномной ДНК во время воспроизводства клеток живого организма получил назва­ние репликации, или репликативного синтеза ДНК.

Репликация ДНК является примером матричного синтеза био­логических макромолекул. Основу хромосомы составляет одна не­прерывная двуцепочечная молекула ДНК. Во время репликации каждая из цепей родительской ДНК служит матрицей для синтеза комплементарной дочерней цепи. Положение каждого нуклеотида в строящейся цепи ДНК по правилам комплементарности однозначно определяется положением соответствующего нуклеотида матрицы.

После одного раунда репликации одна цепь в каждой из двух дочерних молекул является родительской, т. е. консервативной, а другая — синтези­рованной заново. Такой способ удвоения молекул ДНК называет­ся полуконсервативным.

**3. Самостоятельная работа.**

1. Заполните таблицы:

Таблица 1 – Характеристика компонентов репликации

|  |  |
| --- | --- |
| **Компоненты репликации** | **Функции компонентов** |
|  |  |
|  |  |

Таблица 2 – Характеристика ферментов репликации

|  |  |
| --- | --- |
| **Фермент репарации** | **Функция фермента** |
|  |  |
|  |  |

Таблица 3 – Характеристика репарации.

|  |  |
| --- | --- |
| **Вид репарации** | **Сущность репарации** |
|  |  |
|  |  |

2. Зарисуйте строение «репликативной вилки», обозначьте структурные элементы

3. Решение задач:

**Задача 1.** В белке содержится 51 аминокислота.
Сколько нуклеотидов будет в цепи гена, кодирующей этот
белок, и сколько - в соответствующем фрагменте
молекулы ДНК?

**Задача 2.** В кодирующей цепи гена содержится 600
нуклеотидов. Сколько аминокислот содержится в молекуле
белка, информация о которой закодирована в этом гене,
если в конце гена имеются два стоп - триплета?

**Задача 3.** В белке содержится 25 аминокислот.
Сколько нуклеотидов содержится в кодирующей цепи
гена, если три «знака препинания» стоят в конце гена?

**Задача 4.** Длина фрагмента молекулы ДНК
бактерии равняется 20,4 нм. Сколько аминокислот будет в
белке, кодируемом данным фрагментом ДНК?

**4. Итоговый контроль знаний.**

Тестирование.

**5. Подведение итогов.**

Итоговая оценка за занятие складывается из оценки за устный ответ, решения тестовых заданий, ситуационных задач, ведения рабочей тетради.

**6. Домашнее задание:** лекция №8.

Самостоятельная работа: решение задач, тестовых заданий.

## Практическое занятие №4 Изучение основ транскрипции

**Значение темы:**

Уникальным свойством живых клеток является их способность к воспроизводству себе подобных с почти идеальной точностью на протяжении многих поколений. Нуклеиновые кислоты ДНК и РНК играют большую роль в передаче наследственной информации и в синтезе белка.

На основе теоретических знаний и практических умений обучающийся должен **знать:**

- основные этапы биосинтеза белка и их сущность

**уметь:**

- составлять и анализировать таблицы;

- решать ситуационные задачи.

Студент должен овладеть общими компетенциями:

ОК 2. Организовывать собственную деятельность, выбирать типовые методы и способы выполнения профессиональных задач, оценивать их эффективность и качество.

ОК 4. Осуществлять поиск и использование информации, необходимой для эффективного выполнения профессиональных задач, профессионального и личностного развития.

OK 5. Использовать информационно-коммуникационные технологии для совершенствования профессиональной деятельности.

**План изучения темы**

**1.Контроль исходного уровня знаний.**

1. Дать определение термину «транскрипция»

2. Принципы транскрипции.

3. Условия необходимые для транскрипции

4. Характеристика фермента ДНК-зависимая –РНК-полимераза

5. Структурна единица транскрипции у прокариот и экукариот

6. Строение опреона.

7. Этапы транскрипции

8. Особенности транскрипции у эукариот

9. Белки регулирующие транскрипцию у эукариот

10. Процессинг мРНК у эукариот.

**2. Содержание темы**

РНК сохраняет все информационное содержание той ДНК, копией которой она является, а также способность к спариванию комплементарных оснований. Синтез молекул РНК называется **транскрипцией ДНК.**

Одна из цепей ДНК служит матрицей, на которой испытывается способность очередных нуклеотидов к комплементарному спариванию. При хорошем соответствии с ДНК-матрицей рибонуклеотид включается в растущую цепь РНК как ковалентно связанная составная часть. Таким способом цепь РНК удлиняется последовательным добавлением одного нуклеотида. Транскрипция отличается от репликации ДНК рядом особенностей.

Количество молекул РНК, копируемых с определенного участка ДНК, контролируется регуляторними белками, которые связываются со специфическими участками ДНК, закрывая кодирующие последовательности гена. Поскольку каждая молекула РНК может транслироваться во многие тысячи копий, то информация, содержащаяся в маленьком участке ДНК, может направлять синтез миллионов копий специфического белка.

Транскрипция — процесс переноса генетической информации от ДНК к РНК. Все виды РНК - мРНК, рРНК и тРНК - синтезируются в соответствии с последовательностью оснований в ДНК, служащей матрицей. Транскрибируется только одна, так называемая «+»-цепь ДНК. Процесс транскрипции у прокариот и эукариот существенно различается.

**3. Самостоятельная работа студентов.**

1. Заполнить предложенные таблицы, используя материал лекций:

Таблица 1- Компоненты необходимые для синтеза мРНК.

|  |  |
| --- | --- |
| **Компоненты необходимые для транскрипции** | **Функция компонентов** |
| 1. |  |
| 2. |  |
| 3. |  |
| 4. |  |
| 5. |  |

Таблица 2 – Принципы транскрипции

|  |  |
| --- | --- |
| **Принципы транскрипции** | **Обоснование**  |
| 1. |  |
| 2. |  |
| 3. |  |
| 4. |  |
| 5. |  |

Таблица 3 – Строение оперона

|  |  |
| --- | --- |
| **Структурный компонент оперона** | **Функции компонента** |
|  |  |
| 1. |  |
| 2. |  |
| 3. |  |
| 4. |  |

Таблица 4 – Характеристика этапов процессинга мРНК эукариот

|  |  |
| --- | --- |
| **Этап процессинга** | **Характеристика этапа** |
| 1. |  |
| 2. |  |
| 3. |  |

2. Дать характеристику ферментам, участвующим в транскрипции

3. Дать определение следующим терминам:транскрипция, оперон, сплайсинг, процессинг, энхансеры, сайленсеры.

**4. Итоговый контроль знаний.**

Тестирование.

**5. Подведение итогов.**

Итоговая оценка за занятие складывается из оценки за устный ответ, решения тестовых заданий, ситуационных задач, ведения рабочей тетради.

**6. Домашнее задание:** лекция №9,10

Самостоятельная работа: решение задач, тестовых заданий.

## Практическое занятие №5 Изучение основ трансляции

**Значение темы:**

Уникальным свойством живых клеток является их способность к воспроизводству себе подобных с почти идеальной точностью на протяжении многих поколений. Нуклеиновые кислоты ДНК и РНК играют большую роль в передаче наследственной информации и в синтезе белка.

На основе теоретических знаний и практических умений обучающийся должен **знать:**

- основные этапы биосинтеза белка и их сущность

**уметь:**

- и анализировать таблицы;

- решать ситуационные задачи.

Студент должен овладеть общими компетенциями:

ОК 2. Организовывать собственную деятельность, выбирать типовые методы и способы выполнения профессиональных задач, оценивать их эффективность и качество.

ОК 4. Осуществлять поиск и использование информации, необходимой для эффективного выполнения профессиональных задач, профессионального и личностного развития.

OK 5. Использовать информационно-коммуникационные технологии для совершенствования профессиональной деятельности.

**План изучения темы:**

**1.Контроль исходного уровня знаний.**

1. Дать определение термину «Трансляция»

2. Этапы трансляции

3. Рекогниция – характеристика и сущность этапа

4. Аминоацил-tРНК-синтетаза **-**характеристикафермента

5. Строение и функции рибосомы

6. Каталитические центры рибосомы: назначение.

7. Особенности трансляции у эукариот.

**2. Содержание темы:**

**Трансляция**— это процесс декодирования мРНК, в результате которого информация с языка последовательности оснований мРНК переводится на язык аминокислотной последовательности белка.

Синтез белка в клетке состоит из двух этапов: рекогниции и собственно синтеза полипептида на рибосоме. Ключевым субстратом рекогниции является транспортная РНК.

**Синтез белка**осуществляется путем последовательной поликонденсации отдельных аминокислотных остатков, начиная с амино-(1М)-конца полипептидной цепи, в направлении к карбоксильному (С)-концу. Декодирование мРНК происходит соответственно в направлении 5' → 3'.

**Декодирование**происходит при специфическом связывании антикодона транспортной РНК (тРНК) с соответствующим кодоном мРНК. До такого взаимного узнавания кодона и антикодона к тРНК присоединяется соответствующий аминокислотный остаток: образуется *аминоацил-тРНК.*Этот процесс называется *активацией тРНК.*Синтез белка происходит в *рибосоме.*Все этапы этого процесса осуществляются с помощью множества разных ферментов и других белков (таких, например, как факторы инициации).

**Активация тРНК**— это присоединение аминокислоты к 3'-концевому аденозину молекулы тРНК с образованием аминоацил-тРНК. Этот процесс катализируется ферментом аминоацил-тРНК—синтетазой, и для каждой аминокислоты существует по крайней мере один такой фермент-катализатор. Источником энергии для этого процесса служит гидролиз АТР.

**Рибосома**— это органелла, состоящая из двух субчастиц, на которой происходит синтез белка. Каждая субчастица представляет собой сложный комплекс из белков и молекул РНК. В течение всего процесса синтеза белка растущая полипептидная цепь, мРНК и очередная аминоацил-тРНК остаются прикрепленными к рибосоме. Коэффициент седиментации рибосом прокариот типа *Е. coli*составляет примерно 70S, а у эукариот для рибосом, обнаруживаемых в цитоплазме, он равен 80S.

**3. Самостоятельная работа студентов.**

1. Заполнение таблицу:

Таблица 1 - Основные компоненты белоксинтезирующей системы.

|  |  |
| --- | --- |
| **Необходимые компоненты.** | **Функции компонентов.** |
| Аминокислоты АК. |  |
| тРНК. |  |
| Аминоацил-тРНК-синтетазы. |  |
| мРНК. |  |
| Рибосомы. |  |
| АТФ, ГТФ. |  |
| Белковые факторы инициации, элонгации, терминации. |  |
| Ионы магния. |  |

2. Рассмотрите расположение функциональных центров на малой и большой субчастицах рибосомы, укажите функции этих центров.



  Существует четкое разделение труда между двумя субчастицами рибосомы: - малая субчастица выполняет генетические функции, ответственна за прием и декодирование генетической информации,

- большая участвует в энзиматических реакциях в процессе трансляции.

Таблица 2 - Этапы биосинтеза белка.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Этапы биосинтеза.** | **Определение** | **Основные стадии** | **Функции.** |
| Рекогниция |  | -- |  |
| Элонгация (собственно синтез белка) |  | --- |  |
| Терминация |  |  |  |

2. Решите предложенные задачи, используя таблицу генетического кода:

**Задача 1**. Покажите порядок аминокислот в белке, если известно, что и-РНК, по которой он строится, имеет следующую последовательность нуклеотидов:

**АААЦААГУУАЦАГАУУУЦ.**

**Задача 2.** С какой последовательности мономеров начинается полипептид, если в гене он закодирован следующей последовательностью нуклеотидов:

**ГТТЦТААААГГГЦЦЦ**

Как изменится последовательность мономеров полипептида, если под воздействием облучения между восьмым и девятым нуклеотидами гена встроится тимидиловый нуклеотид?

**Задача 3.** Какие изменения в гене приводят к развитию серповидно-клеточной анемии, если известно, что у больного человека гемоглобин в седьмой позиции содержит аминокислоту валин вместо глутаминовой, характерной для гемоглобина здоровых людей?

**Задача 4.** Под воздействием ионизирующей радиации цитидиловый нуклеотид в кодирующей цепи гена заменяется на тимидиловый. Как изменится аминокислотный состав белковой молекулы, если белок до облучения был следующим: вал-цис-тре-фен-цис?

**Задача 5**.Фрагмент белковой молекулы имеет следующий состав аминокислот:-ала-тре-вал.

Определите фрагментцепи гена, которая его кодирует. Какие т-РНК могут участвовать в синтезе этого белка?

**Таблица генетического кода.**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Названия аминокислот | Сокращения | Кодирующие триплеты аминокислот – кодоны. |
| 1. Глицин.  | гли | ГГУ | ГГЦ | ГГА | ГГГ |  |  |
| 2. Аланин. | ала | ГЦУ | ГЦЦ | ГЦА | ГЦГ |  |  |
| 3. Валин. | вал | ГУУ | ГУЦ | ГУА | ГУГ |  |  |
| 4. Лейцин. | лей | ЦУУ | ЦУЦ | ЦУА | ЦУГ | УУА | УУГ |
| 5. Изолейцин. | иле | АУУ | АУЦ | АУА |  |  |  |
| 6. Серин. | сер | УЦУ | УЦЦ | УЦА | УЦГ | АГУ | АГЦ |
| 7. Треонин. | тре | АЦУ | АЦЦ | АЦА | АЦГ |  |  |
| 8. Цистеин. | цис | УГУ | УГУ | УГЦ |  |  |  |
| 9. Метионин | мет | АУТ |  |  |  |  |  |
| 10.Глутаминовая кислота | глу | ГАА | ГАГ |  |  |  |  |
| 11.Аспарагиновая кислота  | асп | ГАУ | ГАЦ |  |  |  |  |
| 12. Глутамин | глн | ЦАА | ЦАГ |  |  |  |  |
| 13. Аспарагин  | асн | ААУ | ААЦ |  |  |  |  |
| 14. Аргинин | арг | ЦГУ | ЦГЦ | ЦГА | ЦГГ | АГА | АГГ |
| 15. Лизин | лиз | ААА | ААГ |  |  |  |  |
| 16. Фенилаланин | фен | УУУ | УУЦ |  |  |  |  |
| 17. Тирозин | тир | УАУ | УАЦ |  |  |  |  |
| 18. Пролин | про | ЦЦУ | ЦЦЦ | ЦЦА | ЦЦГ |  |  |
| 19.Гистидин | гис | ЦАУ | ЦАЦ |  |  |  |  |
| 20. Триптофан | три | УГГ |  |  |  |  |  |
| Стоп-кодоны |  | УГА | УАГ | УАА |  |  |  |

**5. Подведение итогов.**

Итоговая оценка за занятие складывается из оценки за устный ответ, заполнения таблиц решения задач, ведения рабочей тетради.

**6. Домашнее задание:** лекции №5-10,подготовка к семинару.

## Практическое занятие №6 семинар «матиричные биосинтезы»

**Значение темы**:

Молекулярная биология использует широкий арсенал биологических, физических и химических методов, одни из которых достались ей «в наследство» от наук-предшественниц (биохимии, цитологии, генетики), а другие были созданы в процессе ее собственного развития специально для работы с молекулярными объектами.

Благодаря техническому прогрессу и научным изысканиям в области химии, физики, биологии и информатики современное оборудование позволяет выделять, изучать и изменять отдельные гены и процессы, в которые они вовлечены.

На основе теоретических знаний и практических умений обучающийся должен

**знать**: основные методики современных исследований молекулярной биологии, используемые в лабораторной диагностике (ИФА)

**уметь:** применять основные методики современных исследований молекулярной биологии, используемые в лабораторной диагностике;

Студент должен овладеть **общими компетенциями**:

OK 1. Понимать сущность и социальную значимость своей будущей профессии, проявлять к ней устойчивый интерес.

ОК 2. Организовывать собственную деятельность, выбирать типовые методы и способы выполнения профессиональных задач, оценивать их эффективность и качество.

ОК 4. Осуществлять поиск и использование информации, необходимой для эффективного выполнения профессиональных задач, профессионального и личностного развития.

OK 5. Использовать информационно-коммуникационные технологии для совершенствования профессиональной деятельности.

**План занятия**

**1.Контроль уровня знаний.**

Тестирование

**2. Самостоятельная работа студентов**

**Дать определение следующим терминам:**

1. Геномика
2. Протеомика
3. Гистоны
4. ДНК
5. РНК
6. Нуклеосома
7. Уровни компактизации ДНК:
8. Метафазная хромосома
9. В-форма ДНК
10. Z-форма ДНК
11. гяРНК
12. Оперон
13. Энхансеры
14. Сайленсеры
15. Экзоны
16. Интроны
17. Транскрипция
18. Трансляция
19. Репарация
20. Репликон
21. ДНК-полимераза
22. Лигаза
23. Праймаза
24. Топоизомераза
25. Геликаза
26. Цистроны
27. Энхансеры
28. Сайленсеры
29. Сплайсинг
30. Кэпирование
31. Полиаденилирование
32. Рекогниция
33. Кодаза
34. Формиометионин
35. рибосома

**Решение задач.**

1. Какие т-РНК участвуют в синтезе белка,зашифрованного следующей последовательностьюнуклеотидов кодирующей цепи ДНК:

**ААТЦАЦГАТЦЦТ?**

2. В каком случае образовавшийся белок будет
сильнее отличаться от первоначального:

1)ионизирующаярадиация «выбивает» из гена 1 нуклеотид;

2)ионизирующая радиация «выбивает» из гена 3 рядом
стоящих нуклеотида?

3. Какие изменения в гене приводят к развитию
серповидно-клеточной анемии, если известно, что у
больного человека гемоглобин в седьмой позиции
содержит аминокислоту валин вместо глутаминовой,
характерной для гемоглобина здоровых людей?

4. Под воздействием ионизирующей радиациицитидиловый нуклеотид в кодирующей цепи геназаменяется на тимидиловый. Как изменитсяаминокислотный состав белковой молекулы, если белок дооблучения был следующим: вал-цис-тре-фен-цис?

5.Фрагмент белковой молекулы имеет следующийсостав аминокислот:-ала-тре-вал. Определите фрагментцепи гена, которая его кодирует. Какие т-РНК могутучаствовать в синтезе этого белка?

**5. Подведение итогов.**

Итоговая оценка за занятие складывается из оценки за решения тестовых заданий, ситуационных задач, ведения рабочей тетради.

**6. Домашнее задание:** лекции №11,12

## Практическое занятие №7 Проведение ПЦР-анализа (подготовительный этап)

**Значение темы**:

**ПЦР** — (Polymerasechainreaction, PCR diagnostics)  полимеразная цепная реакция  - современный высокотехнологичный метод исследования, применяемый  в диагностике инфекционных заболеваний, позволяющий определить наличие возбудителя заболевания, даже если в пробе присутствует всего несколько молекул его ДНК. Теоретически метод ПЦР диагностики позволяет обнаружить даже единственную копию чужеродной ДНК в образце, что позволяет говорить об отсутствии у него предела чувствительности. Кроме высокой чувствительности, исследование методом ПЦР имеет абсолютную специфичность, то есть если метод ПЦР диагностики выполнен правильно, то он не дает ложноположительных результатов.

ПЦР способен идентифицировать возбудителей инфекционных болезней на основе выявления их генетического материала (ДНК или РНК) в пробах, полученных от обследуемого человека.

На основе теоретических знаний и практических умений обучающийся должен

**знать**: основные методики современных исследований молекулярной биологии, используемые в лабораторной диагностике (ИФА)

**уметь:** применять основные методики современных исследований молекулярной биологии, используемые в лабораторной диагностике;

Студент должен овладеть **общими компетенциями**:

OK 1. Понимать сущность и социальную значимость своей будущей профессии, проявлять к ней устойчивый интерес.

ОК 2. Организовывать собственную деятельность, выбирать типовые методы и способы выполнения профессиональных задач, оценивать их эффективность и качество.

ОК 9. Быть готовым к смене технологий в профессиональной деятельности.

ОК 13. Организовывать рабочее место с соблюдением требований охраны труда, производственной санитарии, инфекционной и противопожарной безопасности.

ПК 7.1. Готовить рабочее место и аппаратуру для проведения клинических лабораторных исследований.

ПК 7.2. Осуществлять высокотехнологичные клинические лабораторные исследования биологических материалов.

**План изучения темы:**

**1.Контроль исходного уровня знаний.**

1. Сущность ПЦР анализа
2. История открытия ДНК и разработки метода ПЦР
3. Принцип метода ПЦР:
4. Проведение ПЦР
5. Применение ПЦР в диагностике
6. Биологический материал для ПЦР
7. Интерпретация результатов ПЦР
8. Преимущества ПЦР

## 2. Содержание темы:

**Принцип методаПЦР:**

Метод основан на многократном избирательном копировании определённого участка нуклеиновой кислоты [ДНК](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%94%D0%9D%D0%9A) при помощи [ферментов](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A4%D0%B5%D1%80%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D1%82) в искусственных условиях ([*invitro*](http://ru.wikipedia.org/wiki/In_vitro)). В специальный реактор помещается небольшое количество биологического материала, в котором могут быть фрагменты ДНК микроба (например, кровь, слюна, выделения из половых органов).

Далее к этому материалу добавляют специальные ферменты, которые связываются с ДНК микроба и синтезируют ее копию. Реакция копирования ДНК идет в несколько этапов, по принципу цепной реакции: на первом этапе реакции из 1 молекулы ДНК образуются 2 новые молекулы, на втором этапе из имеющихся 2 молекул – образуются 4 новые и тд. После нескольких циклов вместо 1 копии ДНК появляется несколько сотен или тысяч копий. Такое количество копий микробной ДНК может быть легко проанализировано и сравнено с базой данных, которая содержит информацию о строении ДНК различных микробов.

ПЦР анализ дает возможность не только определить какой тип инфекции есть в организме, но и дает количественную оценку инфекции: то есть как много микробов есть в организме человека. Количественный анализ ПЦР является очень важным в диагностике и в оценке эффективности лечения многих хронических инфекций (например, вирусного гепатита C).

**Проведение ПЦР**

**Компоненты реакции**

Для проведения ПЦР в простейшем случае требуются следующие компоненты:

* *ДНК-матрица*, содержащая тот участок ДНК, который требуется [амплифицировать](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%90%D0%BC%D0%BF%D0%BB%D0%B8%D1%84%D0%B8%D0%BA%D0%B0%D1%86%D0%B8%D1%8F_%28%D0%B3%D0%B5%D0%BD%D0%B5%D1%82%D0%B8%D0%BA%D0%B0%29).
* *Два*[*праймера*](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A1%D0%BB%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D1%80%D1%8C_%D0%B3%D0%B5%D0%BD%D0%B5%D1%82%D0%B8%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%B8%D1%85_%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%BC%D0%B8%D0%BD%D0%BE%D0%B2#.D0.9F), [комплементарные](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A1%D0%BB%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D1%80%D1%8C_%D0%B3%D0%B5%D0%BD%D0%B5%D1%82%D0%B8%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%B8%D1%85_%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%BC%D0%B8%D0%BD%D0%BE%D0%B2#.D0.9A) противоположным концам разных цепей требуемого фрагмента ДНК.

**Праймеры**

Специфичность ПЦР основана на образовании комплементарных комплексов между матрицей и [праймерами](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9F%D1%80%D0%B0%D0%B9%D0%BC%D0%B5%D1%80), короткими [синтетическими олигонуклеотидами](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A1%D0%B8%D0%BD%D1%82%D0%B5%D0%B7_%D0%BE%D0%BB%D0%B8%D0%B3%D0%BE%D0%BD%D1%83%D0%BA%D0%BB%D0%B5%D0%BE%D1%82%D0%B8%D0%B4%D0%BE%D0%B2) длиной 18—30 оснований. Каждый из праймеровкомплементарен одной из цепей двуцепочечной матрицы и ограничивает начало и конец амплифицируемого участка.

После гибридизации матрицы с праймером последний служит затравкой для ДНК-полимеразы при синтезе комплементарной цепи матрицы.

Важнейшая характеристика праймеров — [температура плавления](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%93%D0%B8%D0%B1%D1%80%D0%B8%D0%B4%D0%B8%D0%B7%D0%B0%D1%86%D0%B8%D1%8F_%D0%94%D0%9D%D0%9A)  комплексапраймер-матрица.

Верхний предел температуры плавления ограничен оптимумом температуры действия полимеразы, активность которой падает при температурах выше 80 °C.

При выборе праймеров желательно придерживаться следующих критериев:

-[GC-состав](http://ru.wikipedia.org/wiki/GC-%D1%81%D0%BE%D1%81%D1%82%D0%B0%D0%B2) ~ 40—60 %;

- близкие Tm праймеров (отличия не более, чем на 5 °C);

- отсутствие неспецифических вторичных структур — шпилеки димеров;

- желательно, чтобы на 3’-конце был [гуанин](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%93%D1%83%D0%B0%D0%BD%D0%B8%D0%BD) или [цитозин](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A6%D0%B8%D1%82%D0%BE%D0%B7%D0%B8%D0%BD), поскольку они образуют три водородные связи с молекулой матрицы, делая гибридизацию более стабильной.

* Термостабильная [*ДНК-полимераза*](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%94%D0%9D%D0%9A-%D0%BF%D0%BE%D0%BB%D0%B8%D0%BC%D0%B5%D1%80%D0%B0%D0%B7%D0%B0) — [фермент](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A4%D0%B5%D1%80%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D1%82), который катализирует реакцию полимеризации ДНК. Полимераза для использования в ПЦР должна сохранять активность при высокой температуре длительное время, поэтому используют ферменты, выделенные из термофилов — *Thermusaquaticus* (*Taq*-полимераза),*Pyrococcusfuriosus* (*Pfu*-полимераза), *Pyrococcuswoesei* (*Pwo*-полимераза) и другие.
* [*Дезоксирибонуклеозидтрифосфаты*](http://ru.wikipedia.org/w/index.php?title=%D0%94%D0%B5%D0%B7%D0%BE%D0%BA%D1%81%D0%B8%D1%80%D0%B8%D0%B1%D0%BE%D0%BD%D1%83%D0%BA%D0%BB%D0%B5%D0%BE%D0%B7%D0%B8%D0%B4&action=edit&redlink=1) (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).
* Ионы Mg2+, необходимые для работы полимеразы.
* [*Буферный раствор*](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%91%D1%83%D1%84%D0%B5%D1%80%D0%BD%D1%8B%D0%B9_%D1%80%D0%B0%D1%81%D1%82%D0%B2%D0%BE%D1%80), обеспечивающий необходимые условия реакции — [рН](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A0%D0%9D), [ионную силу раствора](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%98%D0%BE%D0%BD%D0%BD%D0%B0%D1%8F_%D1%81%D0%B8%D0%BB%D0%B0_%D1%80%D0%B0%D1%81%D1%82%D0%B2%D0%BE%D1%80%D0%B0). Содержит соли, [бычий сывороточный альбумин](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%91%D1%8B%D1%87%D0%B8%D0%B9_%D1%81%D1%8B%D0%B2%D0%BE%D1%80%D0%BE%D1%82%D0%BE%D1%87%D0%BD%D1%8B%D0%B9_%D0%B0%D0%BB%D1%8C%D0%B1%D1%83%D0%BC%D0%B8%D0%BD).





Рисунок 1**.**Амплификатор для проведения ПЦР

ПЦР проводят в амплификаторе — приборе, обеспечивающем периодическое охлаждение и нагревание пробирок, обычно с точностью не менее 0,1 °C.

**Этапы реакции**

**1. Денатурация**

Двухцепочечную ДНК-матрицу нагревают до 94—96 °C на 0,5—2 мин, чтобы цепи ДНК разошлись. Эта стадия называется [денатурацией](http://ru.wikipedia.org/w/index.php?title=%D0%94%D0%B5%D0%BD%D0%B0%D1%82%D1%83%D1%80%D0%B0%D1%86%D0%B8%D1%8F_%D0%BD%D1%83%D0%BA%D0%BB%D0%B5%D0%B8%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D1%8B%D1%85_%D0%BA%D0%B8%D1%81%D0%BB%D0%BE%D1%82&action=edit&redlink=1), так как разрушаются водородные связи между двумя цепями ДНК. Обычно, перед первым циклом проводят длительный прогрев реакционной смеси в течение 2—5 мин для полной денатурации матрицы и праймеров.

**2. Отжиг**

Когда цепи разошлись, температуру понижают, чтобы праймеры могли связаться с одноцепочечной матрицей. Эта стадия называется *отжигом*. Температура отжига зависит от состава праймеров и обычно выбирается равной температуре плавления праймеров. Время стадии отжига — 30 сек, одновременно, за это время полимераза уже успевает синтезировать несколько сотен нуклеотидов. Рекомендуется подбирать праймеры с температурой плавления выше 60 °C и проводить отжиг и элонгацию одновременно, при 60-72 °C.

**3. Элонгация**

ДНК-полимераза [реплицирует](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A0%D0%B5%D0%BF%D0%BB%D0%B8%D0%BA%D0%B0%D1%86%D0%B8%D1%8F_%28%D0%B1%D0%B8%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D0%B8%D1%8F%29) матричную цепь, используя праймер в качестве затравки. Это — стадия *элонгации*. Полимераза начинает синтез второй цепи от 3'-конца праймера, который связался с матрицей, и движется вдоль матрицы, синтезируя новую цепь в направлении от 5' к 3' концу. Температура элонгации зависит от полимеразы -72 °C. Время элонгации зависит как от типа ДНК-полимеразы, так и от длины амплифицируемого фрагмента. Обычно время элонгации принимают равным одной минуте на каждую тысячу пар оснований. После окончания всех циклов часто проводят дополнительную стадию *финальной элонгации*, чтобы достроить все одноцепочечные фрагменты. Эта стадия длится 7—10 мин.



**Рис. 2**: Схематическое изображение первого цикла ПЦР.

(1) Денатурация при 94—96 °C.

(2) Отжиг при 68 °C (например).

(3) Элонгация при 72 °C (P=полимераза).

(4) Закончен первый цикл. Две получившиеся ДНК-цепи служат матрицей для следующего цикла, поэтому количество матричной ДНК в ходе каждого цикла удваивается

Число «длинных» копий ДНК тоже растет, но линейно, поэтому в продуктах реакции доминирует специфический фрагмент.

Рост требуемого продукта в [геометрической прогрессии](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%93%D0%B5%D0%BE%D0%BC%D0%B5%D1%82%D1%80%D0%B8%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%B0%D1%8F_%D0%BF%D1%80%D0%BE%D0%B3%D1%80%D0%B5%D1%81%D1%81%D0%B8%D1%8F) ограничен количеством реагентов, присутствием [ингибиторов](http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%98%D0%BD%D0%B3%D0%B8%D0%B1%D0%B8%D1%82%D0%BE%D1%80), образованием побочных продуктов. На последних циклах реакции рост замедляется, это называют «эффектом плато».

**3. Самостоятельная работа.**

1. Изучите теоретический материал, и, анализируя прочитанное, выполните предложенные задания.

2. Записать принцип методики определения ПЦР.

3. Заполнить таблицу:

Таблица 1- Этапы ПЦР

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Этап**  | **Сущность**  | **Условия**  | **Компоненты**  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |

**4. Итоговый контроль знаний.**

Тестирование.

**5. Подведение итогов.**

Итоговая оценка за занятие складывается из оценки за устный ответ, решения тестовых заданий, ситуационных задач, ведения рабочей тетради.

**6. Домашнее задание:** лекция №11,12

Самостоятельная работа: решение задач, тестовых заданий.

## Практическое занятие №8 Проведение ПЦР-анализа **(анализ данных)**

**Значение темы**:

**ПЦР** — (Polymerasechainreaction, PCR diagnostics)  полимеразная цепная реакция  - современный высокотехнологичный метод исследования, применяемый  в диагностике инфекционных заболеваний, позволяющий определить наличие возбудителя заболевания, даже если в пробе присутствует всего несколько молекул его ДНК. Теоретически метод ПЦР диагностики позволяет обнаружить даже единственную копию чужеродной ДНК в образце, что позволяет говорить об отсутствии у него предела чувствительности. Кроме высокой чувствительности, исследование методом ПЦР имеет абсолютную специфичность, то есть если метод ПЦР диагностики выполнен правильно, то он не дает ложноположительных результатов.

ПЦР способен идентифицировать возбудителей инфекционных болезней на основе выявления их генетического материала (ДНК или РНК) в пробах, полученных от обследуемого человека.

На основе теоретических знаний и практических умений обучающийся должен

**знать**: основные методики современных исследований молекулярной биологии, используемые в лабораторной диагностике (ИФА)

**уметь:** применять основные методики современных исследований молекулярной биологии, используемые в лабораторной диагностике;

Студент должен овладеть **общими компетенциями**:

ОК 2. Организовывать собственную деятельность, выбирать типовые методы и способы выполнения профессиональных задач, оценивать их эффективность и качество.

ОК 3. Решать проблемы, оценивать риски и принимать решения в нестандартных ситуациях.

ОК 5. Использовать информационно-коммуникационные технологии для совершенствования профессиональной деятельности.

охраны труда, производственной санитарии, инфекционной и противопожарной безопасности.

ПК 7.2. Осуществлять высокотехнологичные клинические лабораторные исследования биологических материалов.

ПК 7.3Проводить контроль качества высокотехнологичных клинических лабораторных исследований.

ПК 7.4. Дифференцировать результаты проведенных исследований с позиции «норма - патология».

ПК 7.5. Регистрировать результаты проведенных исследований.

**План изучения темы:**

**1.Контроль исходного уровня знаний.**

1. Сущность ПЦР анализа
2. История открытия ДНК и разработки метода ПЦР
3. Принцип метода ПЦР:
4. Проведение ПЦР
5. Применение ПЦР в диагностике
6. Биологический материал для ПЦР
7. Интерпретация результатов ПЦР
8. Преимущества ПЦР

## 2. Содержание темы:

**Применение ПЦР в диагностике**

|  |  |
| --- | --- |
| **Заболевание** | **Возбудитель** |
| Гепатит В, С | Вирус гепатита В, C |
| Хламидиоз половых дыхательных путей и органов | Chlamydiatrachomatis (хламидия трахоматис) |
| Уреаплазмоз половых органов | Ureaplasmaurealiticum (уреаплазмауреалитикум)Ureaplasmaparvum (уреаплазмапарвум) |
| Микоплазмоз дыхательных путей и половых органов | Mycoplasmahominis (микоплазмоза хоминис), Mycoplasmagenitalium (микоплазмоза гепиталиум) |
| Кандидоз половых органов (молочница) | Candidaalbicans (кандидаалбиканс) |
| Бактериальный вагиноз (гарднереллез) | Gardnerellavaginalis (гарднереллавагиналис) |
| Трихомониаз | Trichomonasvaginalis (трихомонасвагиналис) |
| Инфекционный мононуклеоз | Вирус Эпшетейна-Барр |
| Туберкулез | Микобактерия туберкулеза |
| Папилломавирусная инфекция | Вирус папилломы человека (в том числе его онкогенные виды 16, 18, 31, 33, 45, 51, 52, 56, 58, 59) |
| ВИЧ (СПИД) | Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ 1, ВИЧ 2) |
| Герпесная инфекция | Вирусы простого герпеса 1 и 2 типов |
| Хеликобактериоз | Helicobacterpylori |

**3. Самостоятельная работа.**

1. Изучите теоретический материал, и, анализируя прочитанное, выполните предложенные задания.

1. Заполнить таблицу:

**1. Характеристика компонентов реакции ПЦР**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Компонент**  | **Функция в реакции** | **Условия**  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |

**4. Итоговый контроль знаний.**

Решите предложенные задачи:

**Задача 1.**

Во время планового обследования перед операцией у женщины, 34 лет, в крови был обнаружен маркер гепатита В. Были сданы анализы.
**Результаты исследования:**

HBeAg<0.01 (по нормам лаборатории, меньше 0,09 - отрицательный)
ПЦР – ВГВ -обнаружен (чувствительность тест-системы - 200 копий/мл.)
ПЦ – ВГВ - 5,51х10\*3 копий/мл

**Печеночные пробы**

АЛТ 118 Ед/л

АСТ 18 Ед/л

 ГГТ 213 Ед/л

ЩФ 40 Ед/л

Билирубин общий 3,6 мкмоль/л

билирубин прямой 1,42 мкмоль/л

билирубин непрямой 2,18 мкмоль/л

1. Оцените результаты исследования.

2. Сделайте заключение о наличии патологии. Ответ обоснуйте.

**Задача 2.**

В лабораторию поступили образцы крови для исследования методом ИФА на наличие инфекций, мужчина, 29 лет:

**Результаты исследования:**

анти HCV-IgM-3,178л,

анти HCV-IgG(core)-3,300л,

анти HCV-IgG (NS3)-2,999л

анти HCV-IgG(NS4)-3,300л

анти HCV-IgG(NS5)-3.158л

ПЦР-ВГС- 6,51х103 копий/мл

АСТ-75 U/L,

АЛТ-92U/L.

Билирубин общ -15.39,

прямой-5,13.

непрямой-10.26 ммл/л.

Тимоловая проба -5,78ед.

1. Оцените результаты исследования ИФА
2. Определите тип и наличие инфекции, стадию заболевания. Ответ обоснуйте.

**5. Подведение итогов.**

Итоговая оценка за занятие складывается из оценки за устный ответ, решения тестовых заданий, ситуационных задач, ведения рабочей тетради.

**6. Домашнее задание:** лекции №13,14

Самостоятельная работа: решение задач, тестовых заданий.

## Практическое занятие № 9 Определение наличия и титра антител в сыворотке крови иммуноферментным анализом. Общие принципы

**Значение темы**:

Последние годы иммуноферментный анализ занял устойчивое положение среди других методов серологической диагностики инфекций передающихся половым путем и прочно вошел в повседневную медицинскую практику во многих регионах России. На сегодняшний день ИФА остаётся непревзойдённым лидером среди методов, применяемых для скрининговых исследований.

На основе теоретических знаний и практических умений обучающийся должен

**знать**: основные методики современных исследований молекулярной биологии, используемые в лабораторной диагностике (ИФА, РИА)

**уметь:** применять основные методики современных исследований молекулярной биологии, используемые в лабораторной диагностике;

Студент должен овладеть **общими компетенциями**:

OK 1. Понимать сущность и социальную значимость своей будущей профессии, проявлять к ней устойчивый интерес.

ОК 2. Организовывать собственную деятельность, выбирать типовые методы и способы выполнения профессиональных задач, оценивать их эффективность и качество.

ОК 3. Решать проблемы, оценивать риски и принимать решения в нестандартных ситуациях.

ОК 9. Быть готовым к смене технологий в профессиональной деятельности.

ОК 13. Организовывать рабочее место с соблюдением требований охраны труда, производственной санитарии, инфекционной и противопожарной безопасности.

ПК 7.1. Готовить рабочее место и аппаратуру для проведения клинических лабораторных исследований.

ПК 7.2. Осуществлять высокотехнологичные клинические лабораторные исследования биологических материалов.

ПК 7.3.Проводить контроль качества высокотехнологичных клинических лабораторных исследований.

**План изучения темы:**

**1.Контроль исходного уровня знаний.**

Ответьте на вопросы:

1. Дать определение термину - ИФА.
2. Механизм реакции ИФА
3. Применение ИФА в лабораторной диагностике
4. Преимущества ИФА
5. Недостатки ИФА
6. Интерпретация результатов ИФА

**2. Содержание темы:**

**Общие принципы ИФА**

В основе метода ИФА лежит принцип: на твердофазном носителе (поверхность лунок полистироловогопланшета) фиксируется антиген возбудителя инфекции, антитела к которому необходимо выявить.

Антиген, иммобилизованный на поверхности твёрдого носителя, принято называть **иммуносорбентом.** В состав набора тест-системы входит уже готовый иммуносорбент. Схема иммунологической реакции, которая происходит в лунках планшета при проведении анализа, представлена на рис. 1.



Рисунок 1 -Схема иммуноферментного анализа на иммуноглобулины класса G (IgG).

1 – носитель (поверхность лунки планшета);

2 – антиген;

3 – специфические IgG сыворотки крови;

4 – моноклональные анти-IgG–антитела, меченые пероксидазой хрена (конъюгат).

1. В ходе инкубации иммуносорбента с испытуемой сывороткой при наличии в ней антител к данному антигену происходит их связывание в комплекс «антиген–антитело».

2. После удаления несвязавшихся иммуноглобулинов следует инкубация с мечеными ферментом антителами к иммуноглобулинам человека (**конъюгатом),** в ходе, которой на поверхности носителя происходит присоединение к имеющимся комплексам «антиген–антитело» антител, меченых.

3. После удаления несвязавшегосяконъюгата в ходе инкубации с раствором субстрата происходит взаимодействие фермента с субстратом, в результате чего развивается цветная реакция.

4. Результат реакции оценивается спектрофотометрически с выводом цифровых данных, что исключает субъективность оценки. Некоторые иммуноферментные тест-системы допускают визуальную оценку результатов, что может быть полезно при отсутствии соответствующего оборудования.

В зависимости от того, какие антигены используются, все иммуноферментные тест-системы для выявления антител подразделяются на:

• **лизатные** – в которых в качестве антигена, иммобилизованного на твердой фазе или входящего в состав конъюгата, используется нативный антиген (лизированный или обработанный ультразвуком возбудитель инфекции, полученный в культуре);

• **рекомбинантные** – в которых используются полученные генно-инженерным способом белки – аналоги определенных белковых антигенов возбудителя;

• **пептидные** – использующие химически синтезированные фрагменты белков.

 Технология получения рекомбинантных белков позволяет получить в достаточно чистом виде аналог любого отдельного антигена. Для создания высококачественной рекомбинантной тест-системы необходимо выбрать антигены, которые отвечали бы следующим требованиям:

• они должны быть высоко иммуногенными, т.е. в организме инфицированного человека должны вырабатываться антитела к этим антигенам в достаточно большом количестве;

• антитела к этим антигенам должны присутствовать в определяемых количествах в крови больного в течение всего заболевания;

• эти антигены должны быть высоко специфичными, т.е. характерными лишь для данного возбудителя и не дающими перекрестных реакций с антителами другой природы.

**Использование ИФА в диагностика сифилиса**

 Динамика антителообразования при сифилисе:

- первыми после заражения вырабатываются IgМ, выявляемые в определяемых количествах на второй неделе и достигающие максимальной концентрации в крови на 6–9 неделе. Затем концентрация их даже без лечения начинает снижаться вследствие замены их IgG. Рецидив заболевания или повторное заражение приводят к новому нарастанию концентрации IgM, причем в случае рецидива антитела этого класса часто вырабатываются даже в более высоких концентрациях, чем при первичном инфицировании. После проведения эффективного лечения концентрация IgM быстро падает, и, обычно, через 3–9 месяцев они перестают определяться в сыворотке крови.

- IgG в определяемых количествах появляются в крови через 3–4 недели от момента инфицирования. Концентрация их нарастает, на 6-ой неделе начинает преобладать над концентрацией IgM, и, достигая максимума, сохраняется на определенном уровне в течение длительного времени. После проведения эффективного лечения концентрация Ig постепенно снижается, но как правило, IgG в определяемых количествах могут обнаруживаться спустя год и более после проведенной терапии, а в отдельных случаях — даже спустя десятилетия.

 В настоящее время широко применяются реакции, основанные на гемагглютинации (реакция пассивной гемагглютинации (РПГА) или её зарубежные аналоги — the T. Pallidum hemaggluti nationassay (TPHA), а также ИФА. Являясь специфическими трепонемными тестами и обладая высокими чувствительностью и специфичностью, они легко выполняются, не требуют высокой профессиональной подготовки персонала и могут быть использованы при обследовании большого количества образцов.

**Иммуноферментные тест-системы для диагностики сифилиса**

В настоящее время Министерством здравоохранения России рекомендованы к применению в медицинской практике 10 иммуноферментных тест-систем для диагностики сифилиса отечественного производства:

• «РекомбиБестантипаллидум» ЗАО «Вектор- Бест», п. Кольцово, Новосибирская обл.;

• «РекомбиБестантипаллидум – суммарные антитела», ЗАО «Вектор- Бест», п. Кольцово,

Новосибирская обл.;

• «ИФА–АНТИ–LUIS», НПО «Диагностические системы», г. Нижний Новгород;

• Тест-система Иммуноферментная для выявления антител к возбудителю сифилиса (Treponemapallidum) на основе рекомбинантных белков, БТК «Биосервис », г. Москва;

• «ЛюисСкрин», ЗАО «Ниармедик» и АЗОТ «Диаклон», г. Москва;

• «ЭКОлаб–антипаллидум–скрин», ТОО «ЭКОлаб», г Электрогорск, Московская обл.;

• «ИФА–анти-трепонема», ЗАО «Вектор-Майстар», п. Кольцово, Новосибирская обл.;

• «АТ–Треп.–ИФТС», ГП «Аллерген», г. Ставрополь;

• «Сиф–Ат–№1, 2», ТОО НИИ «Аквапаст», г. Санкт-Петербург;

• «ИФАанти-СИФ», НПК «Препарат», г. Нижний Новгород.

Все эти тест-системы прошли государственные испытания в Центральном научно-исследовательском кожно-венерологическом институте (ЦНИКВИ), и большинство из перечисленных тест-систем являются рекомбинантными. В них в качестве специфического антигена, иммобилизованного на поверхности планшета, используются

рекомбинантные белки – аналоги отдельных антигенов Treponemapallidum. Две тест-системы («АТ–Треп.–ИФТС» и «ЛюисСкрин ») – лизатные. Основу тест-системы «Сиф–Ат–№1, 2» составляют химически синтезированные пептиды.

**Оборудование, необходимое для работы с иммуноферментными тест-системами**

Лаборатории, в которых осуществляется ИФА, должны быть укомплектованы:

* набором автоматических пипеток (микродозаторов), который включает в себя одноканальные пипетки переменного объёма, рассчитанные на дозирование 5—40, 40—200 и 200—1000 мкл жидкости, а также 8-канальные пипетки переменного объёма на 5—50 и 50—200 мкл;
* набором мерной химической посуды;
* термостатом, рассчитанным на поддержание температуры 37°С;
* холодильником с морозильной камерой;
* дистиллятором лабораторным для получения дистиллированной воды;
* спектрофотометром планшетным (ридером), оснащенным светофильтром на 450 нм.
* вошеры – промыватели планшетов. Существуют различные их варианты от 8- или 12-канальных ручных «гребёнок», подключаемых к вакуумному насосу, до полностью автоматизированных программируемых приборов.

**Для получения достоверных результатов при постановке ИФА необходимо соблюдать следующие требования и рекомендации:**

**1.Строгое соблюдение инструкции по применению тест-системы.**

Наиболее часто встречающиеся нарушения:

• изменение времени инкубации с раствором хромогена;

• изменение числа промывок планшета и способа промывания.

**2. Соблюдение сроков и условий хранения наборов и отдельных компонентов тест-системы.**

 Качественная работа диагностических наборов гарантирована производителем лишь в рамках указанного срока годности и при соблюдении требуемых условий хранения.

3**. Периодический контроль работы оборудования**.

Очень важным фактором, влияющим на качество проведения ИФА и получение достоверного результата, является точность работы оборудования. Поэтому необходимо периодически контролировать работу автоматических пипеток, термостатов, спектрофотометров, вошеров.

**4. Качественная подготовка посуды.**

Посуда должна хорошо промываться с использованием моющих средств (без биодобавок) и тщательно прополаскиваться проточной, а затем дистиллированной водой. Нельзя мыть

с использованием моющих средств посуду, использующуюся для раствора хромогена, так как даже их следы могут привести к неконтролируемому разложению последнего. Такую посуду нужно каждый раз ополаскивать 50%-ным раствором этилового спирта и затем дистиллированной водой. Рекомендуется выделить отдельную посуду и для работы с растворами конъюгатов. Наконечники для автоматических пипеток желательно использовать однократно. Для работы с раствором хромогена желательно иметь отдельные наконечники, которые сразу после использования промывать спиртом и дистиллированной водой. Особенно высокие требования должны предъявляться к чистоте посуды и наконечников, применяемых для манипуляций с растворами конъюгатов, так как даже незначительные их загрязнения могут привести к падению активности конъюгата

и, следовательно, к снижению чувствительности проводимого анализа.

**5. Правильная подготовка тестируемых образцов**

Тестирование проводят свежеприготовленных образцов сывороток (плазмы). Если это невозможно, то:

• до 5 суток хранить образцы в холодильнике при 4°С;

• сразу заморозить их (при этом нельзя допускать повторного замораживания и оттаивания образцов).

Тестируемый образец должен быть прозрачным, в нём должны отсутствовать признаки гемолиза, хилёза, бактериемии. Необходимо исключить возможность попадания даже микроколичеств одной сыворотки в другую, использовать для каждого образца индивидуальный наконечник для пипетки.

**6. Исключение возможности смешивания компонентов из наборов разных серий**

**7. Внимательность и сосредоточенность на работе лаборанта, выполняющего анализ**

ИФА-тест-системы предусматривают одновременную работу с большим количеством исследуемых образцов, возможна путаница при их внесении в лунки планшета. Для того чтобы свести к минимуму такую возможность, рекомендуется перед началом анализа заполнить протокол исследования, в котором на схеме планшета отразить предполагаемую последовательность внесения образцов. Такая схема поможет лаборанту контролировать себя в ходе работы. По окончании исследования в протокол рекомендуется также внести результаты анализа. Таким образом, Вы получите документ, удобный для сохранения информации о проведённом исследовании.

**8. Тщательная правильная отмывка планшета на каждой стадии постановки ИФА**

Режим отмывки должен строго соответствовать инструкции по применению тест-системы. Качество отмывки планшета – один из решающих факторов в постановке ИФА. Необходимо следить за равномерностью заполнения и опорожнения всех лунок планшета, за уровнем заполнения (желательно полное заполнение лунки), регулярно менять фильтровальную бумагу, используемую для подсушивания планшета.

**9. Соблюдение температурного режима инкубации хромогена**

По инструкции инкубация раствора хромогена должна проходить при комнатной температуре. Стандартно комнатной считается температура (18—25)°С.

**3. Самостоятельная работа.**

1. Изучите теоретический материал и анализируя прочитанное выполните предложенные задания.

2. Изобразите основные этапы ИФА в виде схемы или рисунка.

3. Заполните таблицы:

Таблица 1 - Типы тест-ситсем, используемых в ИФА

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Типы тест-систем** | **Характеристика специфичных антигенов** | **Пример тест-ситсемы, с данным видом антигеном** |
| **1.****2.** |  |  |

Таблица 2 - Оборудование ИФА

|  |  |
| --- | --- |
|  **Вид оборудования** | **Назначение оборудования в ИФА** |
| **1.****2.** |  |

Таблица 3 - Основные ошибки при проведении ИФА и способы их предупреждения

|  |  |
| --- | --- |
| **Ошибки при ИФА** | **Способы устранения ошибок** |
|  |  |

Таблица 4 - Динамика антителообразования при сифилисе

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  **N п\п** | **IgG** | **IgM** | **Стадия заболевания** |
|  |  |  | Отсутствие инфекции |
|  |  |  | Острая инфекция |
|  |  |  | Носительство вируса, после лечения |
|  |  |  | Вторичная рецидивная инфекция |

4. Решите задачи используя таблицу «ИФА-диагностика инфекционных заболеваний»,

значение титра антител:

1. Титр 1:5 - слабоположительный результат
2. Титр 1:10- положительный результат
3. Титр 1:20 и выше – сильноположительный

**Задача 1.**

Оцените результаты анализа ИФА на инфекции:

Женщина 33 года, беременнось 30 недель:

 1. Ig G к цитомегаловирусу - 10,3 МE/мл

*(> 15 МЕ/мл – положительно; 7 -15 МЕ/мл – сомнительно; < 7 МЕ/мл – отрицательно)*

 2. Ig М к токсоплазме - 1,7 МЕ/мл

*(>1,1 МЕ/мл –положительно; 0.9 - 1,1 МЕ/мл –сомнительно; < 0,9 МЕ/мл -отрицательно)*

3. Ig М к цитомегаловирусу - 0,157 МЕ/мл

*(< 0,9 МЕ/мл –отрицательно; > 1,1 МЕ/мл –положительно; 0,9 -1,1 МЕ/мл -сомнительно)*

4. Ig G к токсоплазме - 9,78 МЕ/мл

*(> 8,00 МЕ/мл–положительно; 6,5 - 8,0 МЕ/мл–сомнительно; < 6,5 МЕ/мл-отрицательно)*

5. Ig G к герпесу 1 и 2 типов - ОП кр. 0,168,

*ОП сывор. 3,077 -положительно*

6. Ig М к герпесу 1 и 2 типов - не обнаружены (не выявлено)

**Задача 2.**

Оцените результаты анализа ИФА, женщина, 35 лет

anti-Chlamydiatrahomatis IgA 1:100

anti-ChlamydiaIgMобщиеОБНАРУЖЕНО

anti-Chlamydiatrahomatis IgG 1:50

**Задача 3.**

Больная Г.А. родилась 27.09.2003 г. Мать в родах имела положительные результаты серологических тестов на сифилис. Вместе с ребенком исчезла из поля зрения врачей. Специфического лечения девочка не получала. Мать обратилась к врачам в ноябре 2003 г. У ребенка яркие клинические симптомы врожденного сифилиса. Результаты серологического обследования в ИФА:

Суммарные антитела – положительный,

IgG – положительный, титр – 1/5120,

IgM – положительный, титр – 1/10240.

Ребенок получил полный курс лечения по схеме раннего врожденного сифилиса. Результаты клинико- серологического контроля: 18.02.04 (спустя 3 мес. после лечения):

суммарные антитела – положительный,

IgG – положительный, титр – 1/640,

IgM – отрицательный;

28.04.04 (спустя 5 мес) –

суммарные антитела – положительный,

gG – положительный, титр –1/80,

gM – отрицательный.

В настоящее время больная состоит на диспансерном учете.

1. Оцените степень инфицирования и фазу заболевания при первичном обследовании, через 3 месяца после лечения, через 5 месяцев.

**4. Итоговый контроль знаний.**

Тестирование.

**5. Подведение итогов.**

Итоговая оценка за занятие складывается из оценки за устный ответ, решения тестовых заданий, ситуационных задач, ведения рабочей тетради.

**6. Домашнее задание:** лекции №13,14

Самостоятельная работа: решение задач, тестовых заданий.

## Практическое занятие №10 Определение наличия И титра антител при вгв иммуноферментным анализом

**Значение темы**:

Последние годы иммуноферментный анализ занял устойчивое положение среди других методов серологической диагностики инфекций передающихся половым путем и прочно вошел в повседневную медицинскую практику во многих регионах России. На сегодняшний день ИФА остаётся непревзойдённым лидером среди методов, применяемых для скрининговых исследований.

На основе теоретических знаний и практических умений обучающийся должен

**знать**: основные методики современных исследований молекулярной биологии, используемые в лабораторной диагностике (ИФА, РИА)

**уметь:** применять основные методики современных исследований молекулярной биологии, используемые в лабораторной диагностике;

Студент должен овладеть **общими компетенциями**:

OK 1. Понимать сущность и социальную значимость своей будущей профессии, проявлять к ней устойчивый интерес.

ОК 2. Организовывать собственную деятельность, выбирать типовые методы и способы выполнения профессиональных задач, оценивать их эффективность и качество.

OK 5. Использовать информационно-коммуникационные технологии для совершенствования профессиональной деятельности.

ПК 7.4. Дифференцировать результаты проведенных исследований с позиции «норма - патология».

ПК 7.5. Регистрировать результаты проведенных исследований.

**План изучения темы:**

**1.Контроль исходного уровня знаний.**

Ответьте на вопросы:

1. Дать определение термину - ИФА.
2. Механизм реакции ИФА
3. Применение ИФА в лабораторной диагностике
4. Преимущества ИФА
5. Недостатки ИФА
6. Интерпретация результатов ИФА

## 2. Содержание темы:

## В структуре ВГВ выделяют следующие антигенные системы:

## 1. поверхностный (“австралийский”) антиген, HBsAg, находящийся в составе липопротеидной оболочки ВГВ, является маркером ВГВ, указывая на инфицированность вирусом;

## 2. антиген сердцевидный или ядерный (core), HBсAg, выявляется в составе нуклеокапсида вирионов, свидетельствует об активной репродукции вируса;

## 3. антиген HBеAg входит в состав ядра ВГВ, указывая на активность вируса и, кроме того, на его высокую вирулентность и инфекционность.

## Если уровень анти-HBsAg составляет< 10 мМЕ/л таким лицам показана вакцинация против гепатита В, при уровне 10-100 мМЕ/л вакцинация должна быть отложена на один год, при уровне > 100 мМЕ/л вакцинация показана через 5-7 лет

## mark_r1

## Периоды обнаружения в крови маркеров вирусного гепатита В:

## 1. Поверхностный HBs антиген - с инкубационного периода до периода ранней реконвалесценции (5,5-6 месяцев).

## 2. Антиген Hbe - обнаруживается в инкубационный и продромальный периоды (до 3,5 месяцев). Обнаружение его свидетельствует о репликации вируса.

## 3. Антитела к Hbe антигену - появляются в острый период заболевания (3-4 месяц) и сохраняются до нескольких лет (5-6 лет).

## 4. Антитела класса IgM к ядерному антигену (анти-HBc-IgM) - появляются в продромальном периоде и сохраняются до периода реконвалесценции (со 2 по 6 месяц заболевания).

## 5. Антитела класса IgG к ядерному антигену (анти-HBc-IgG) - появляются в продромальном периоде и сохраняются на протяжении всей жизни (ведущий маркер вирусного гепатита “В”).

6. Антитела к поверхностному Hbs антигену (анти-HBs) - появляются в стадию **позд**ней реконвалесценции (6 месяц) и сохраняются до 5 лет.

**Диагностика вирусного гепатита В**

**HbsAg** - выявление этого «австралийского антигена» свидетельствует об инфицировании вирусом гепатита В. При этом выявляется структурный компонент самого вируса. В том случае, если данный антиген определяется в крови пациента более 6-и месяцев, можно сделать вывод о том, что излечения не произошло и имеется переход заболевания в хроническую форму.

**Анти HbsAg** – этот анализ определяет наличие антител к тому самому вирусному антигену HbsAg. Потому определение этих антител является важным показателем инфицированности вирусом гепатита В, а так же дает информацию об активности специфического гуморального иммунитета против этого вируса. Исследование позволяет оценить полноценность иммунитета и необходимость проведения вакцинации. Анти HbsAg может определяться еще длительное время после излечения заболевания.

**Анти HbcAg** выявляются с начала клинических проявлений заболевания и продолжают стабильно выявляться в течение всего периода заболевания – в любых стадиях. Лабораторные исследования выявляют эти антитела двух классов:
•    **IgM** - ранние антитела, которые синтезируются на ранних стадиях иммунного ответа. Данные антитела свидетельствуют о недавнем инфицировании или о высокой активности инфекции. Так же могут выявляться при обострении процесса вирусного поражения.
•    **IgG** - эти антитела формируются спустя несколько месяцев после первичного контакта с вирусом, однако длительное время они могут присутствовать в крови и после излечения, обеспечивая стойкий иммунитет к инфекции. Даже после излечения данные антитела надолго остаются в крови человека, что свидетельствует о формировании стойкого иммунитета. В том случае, если IgM не выявляется на фоне стабильного титра IgG, это свидетельствует о формировании стойкого иммунитета.
•   **Суммарные Анти HbcAg**– это количественный суммарный показатель количества антител разных классов IgM + IgG.

**HbeAg** - его обнаружение в свободной циркуляции всегда указывает на активную репликацию вируса гепатита В и может трактоваться как свидетельство высокой инфекциозности крови. Это требует безотлагательного противовирусного лечения. Больные, у которых выявлен HbeAg признаются опасными для передачи вирусной инфекции и должны соблюдать особые меры предосторожности.

**Anti-HbeAg** – этот показатель свидетельствует о формировании полноценного иммунитета в отношении вирусного гепатита В. При обнаружении антител к HbeAg опасность инфицирования окружающих людей такими пациентами низкая.

**ПЦР исследование:** Преимущество данного исследования в том, что позволяет обнаружить в крови непосредственно сам вирусный геном (ДНК), а не его частные антигены, и поэтому данная методика получила широкое распространение. ДНК вируса удается обнаружить в 100% случаев в раннем периоде гепатита В, что позволяет рекомендовать данный метод для диагностики острого гепатита В и особенно для оценки эффективности противовирусной терапии.

**Диагностика вирусного гепатита С**

Серологические исследования производятся методом иммуноферментного анализа (ИФА) В диагностике гепатита С определяют наличие и количество специфических антител Anti-HCV.

**Anti-HCV** - данные антитела бывают 2-х видов IgM и IgG. Так же в анализе могут определять суммарное количество антител Anti-HCV total = IgM + IgG.

Обнаружение антител к вирусу гепатита С возможно уже через 4-6 недель после инфицирования. В это время формируются и активно циркулируют в крови IgM. Спустя некоторое время запускается синтез IgG. Как правило, это происходит спустя 11-12 недель после первичного инфицирования. При этом длительное обнаружение Anti-HCV класса М свидетельствует о высокой активности вирусной инфекции и о переходе заболевания в хроническую форму. При хроническом гепатите периодическое выявление Anti-HCV класса М свидетельствует об обострениях вирусного поражения печени.

[**ПЦР**](http://www.polismed.com/subject-pcr-polimeraznaja-cepnaja-reakcija.html)**диагностика** гепатита С дает важную информацию о наличии инфицирования и об активности инфекционного процесса.
При проведении качественной ПЦР диагностики результат может быть либо положительным (инфицирование вирусом герпеса подтверждено) или отрицательным (при этом диагностика не выявила генетического материала вируса гепатита С).

**Количественным ПЦР** выявляется не только наличие генетического материала вируса, но и его количество. По этим данным можно следить за активностью вируса в организме. Выражается эта активность определением **«вирусная нагрузка».** Вирусная нагрузка – этот показатель указывает на количество единиц выявленного при исследовании генетического материала в одном миллилитре крови. Данный показатель указывается следующими единицами измерения ME/мл. Высокая вирусная нагрузка считается неблагоприятным признаком динамики процесса.
Низким значением вирусной нагрузки считается показатель менее 800.000 МЕ/мл, высоким – более 800.000 МЕ/мл.

**Диагностика вирусного гепатита А**

**анти-НАV IgМ** – этот анализ включает в себя определение уровня антител Ig М к вирусу гепатита А. Показатель повышается по прошествии нескольких недель с момента инфицирования. Как правило к моменту первых клинических проявлений гепатита анализ крови на анти-НАV IgМ дает положительный результат.

**анти-НАV IgG** - выявление этого класса антител возможно спустя 10 недель с момента инфицирования. Титр этих антител на долгое время может оставаться высоким при условии полного излечения пациента. Этот показатель свидетельствует о формировании стойкого иммунитета.

**3. Самостоятельная работа.**

1. Изучите теоретический материал, и анализируя прочитанное выполните предложенные задания.

2. Заполните сравнительную таблицу:

Таблица 1- Результаты ИФА при различных типах вирусных гепатитов.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Стадии заболевания** | **Гепатит А** | **Гепатит В** | **Гепатит С** |
| Острый гепатит |  |  |  |
| Хронический персистирующий |  |  |  |
| Выздоровление  |  |  |  |
| Иммунизация  |  |  |  |

3.Рассмотрите набор «Вектогеп В - HBs-антиген» для определения ИФА гепатита В, проведите исследование согласно методики:

«Вектогеп В - HBs-антиген» - набор предназначен для выявления HBsAg в сыворотке крови человека и может быть использован для обследования доноров крови, органов, тканей человека и дифференциальной диагностики вирусных гепатитов.

Набор рассчитан на проведение 96 анализов, включая контроли. Предусмотрено использова­ние набора частями, воз­можны 12 независимых постановок ИФА.

Минимальная концентрация HBsAg, вы­являемая с помощью настоящего набора, со­ставляет по стандартному образцу HBsAg 0,05 МЕ/мл.

**Принцип метода** заключается во взаимодействии HBsAg с моноклональными антителами, иммобили­зованными на поверхности лунок разборного полистиролового планшета. Комплекс «анти­ген-антитело» выявляют с помощью конъюгатаполиклональных антител с пероксидазой хрена.

Интерпретация результатов

Положительными считать образцы с ОП, превышающей илиравной ОПКр. Положи­тельный результат означает, что тестируемый образец содержит HBsAg или неспецифически реагирующий агент.

Образцы, давшие первичный положитель­ный результат, должны быть исследованы с помощью набора «Вектогеп В - HBs-антиген» с це­лью подтверждения результата.

Отрицательными считать образцы, име­ющие ОП меньше ОПкрыт. Отрицательный результат указывает, что тестируемая сыворот­ка не содержит HBsAgили содержит HBsAg в концентрации ниже определяемого тест-системой уровня.

Если первично положительная сыворотка при подтверждении в наборе «Вектогеп В -HBs-антиген» дала отрицательный результат, то сыворотку признают отрицательной, не содержащей HBsAg.

3. Решите предложенные задачи, используя таблицу «Иммунологические маркеры при ВГВ-инфекции»:

**Задача 1.**

Студентка медицинского колледжа, во время прохождения медосмотра, сдала анализ на наличие гепатита В и С. Оцените результаты исследования:

- Антитела к HCV – отрицательный

- Anti-HB сorAg – положительный

- HBeAg - отрицательный

- Anti-HBs – положительный

- HBsAg – отрицательный

1. Оцените результаты исследования.

2. Свидетельствуют ли данные результаты о наличие гепатита В или С? Ответ обоснуйте.

**Задача 2.**

Оцените результаты исследования, пациента инфекционного отделения:

HBsAg-отрицательный,

анти HCV-core-Ag-положительный,

HCV-NS-Ag-положительный.

-АСТ-84 U/L,

АЛТ-113U/L.

Билирубин общ -13.68,

Билирубин прямой-1,78.

Билирубин непрямой-11.97 ммл/л.

1. Свидетельствуют ли данные результаты о наличии вирусного гепатита, какого типа? Ответ обоснуйте.

2. Свидетельствуют ли данные результаты о нарушении функции печени? Ответ обоснуйте.

**Задача 3.**

Оцените результаты исследования, мужчина, 29 лет:

анти HCV-IgM-3,178л,

анти HCV-IgG(core)-3,300л,

анти HCV-IgG (NS3)-2,999л

анти HCV-IgG(NS4)-3,300л

анти HCV-IgG(NS5)-3.158л

ПЦР-положительно.

АСТ-75 U/L,

АЛТ-92U/L.

 Билирубин общ -15.39,

прямой-5,13.

непрямой-10.26 ммл/л.

Тимол-3,78ед.

1. Свидетельствуют ли данные результаты о наличии вирусного гепатита, какого типа? Ответ обоснуйте.

2. Свидетельствуют ли данные результаты о нарушении функции печени? Ответ обоснуйте.

**Задача 4.**

Оцените результаты исследования ИФА:

HAV IgM отрицательно

HBsAg отрицательно

HCVAb положительно

HBCor положительно

1. Вирусы, каких гепатитов были исследованы?

2. Свидетельствуют ли данные результаты о наличие вирусного гепатита, какого? Ответ обоснуйте.

3. Какие исследования нужно еще провести?

**Иммунологические маркеры при ВГВ-инфекции**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Диагноз** | **HBsAg** | **Анти- HBs** | **Анти-НВс** | **HBeAg** | **Анти- HBe** |
| IgM | IgG |
| Острый гепатит В | + (-) | - | + | + | + (-) | - (+) |
| выздоровление | - | +  | - | + | - | + |
| фулминантный гепатит | + (-) | + | + | + | + | - |
|  Хронический персистирующий гепатит | + (-) | - | + (-) | + | + (-) | + (-) |
| Хронический активный гепатит | + (-) | - | + | + | + | - |
| Здоровые носители | + | - (+) | - | + | - | - |
| Активная иммунизация | - | + | - | - | - | - |
| Пассивная иммунизация | - | + | - | (+) | - | - |

**5. Подведение итогов.**

Итоговая оценка за занятие складывается из оценки за устный ответ, решения тестовых заданий, ситуационных задач, ведения рабочей тетради.

**6. Домашнее задание:** лекция № 17,18

Самостоятельная работа: решение задач, тестовых заданий.

## Практическое занятие №11 Определение онкомаркеров

**Значение темы**:

Заболеваемость раком растет с каждым годом. Причин тому огромное множество – это и общее ухудшение экологической ситуации, распространение вредных привычек (курение, алкоголь), употребление канцерогенов в пищу или применение их в быту, старение населения. Отмечается также тенденция к уменьшению среднего возраста больных, рак «молодеет». К счастью, медицина не стоит на месте, современные технологии позволяют диагностировать рак на самых ранних стадиях, а значит существенно увеличить вероятность излечения. Одним из наиболее эффективных способов диагностики онкологических заболеваний в настоящее время является анализ на онкомаркеры.

На основе теоретических знаний и практических умений обучающийся должен

**знать**: основные методики современных исследований молекулярной биологии, используемые в лабораторной диагностике (ПЦР)

**уметь:** применять основные методики современных исследований молекулярной биологии, используемые в лабораторной диагностике;

Студент должен овладеть **общими компетенциями**:

OK 1. Понимать сущность и социальную значимость своей будущей профессии, проявлять к ней устойчивый интерес.

ОК 2. Организовывать собственную деятельность, выбирать типовые методы и способы выполнения профессиональных задач, оценивать их эффективность и качество.

ОК 4. Осуществлять поиск и использование информации, необходимой для эффективного выполнения профессиональных задач, профессионального и личностного развития.

ОК 9. Быть готовым к смене технологий в профессиональной деятельности.

ПК 7.4. Дифференцировать результаты проведенных исследований с позиции норма - патология.

ПК 7.5. Регистрировать результаты проведенных исследований.

**План изучения темы:**

**1.Контроль исходного уровня знаний.**

1. Дайте определение термину «онкомаркеры»
2. Перечислите критерии значимости онкомаркеров.
3. Перечислите общие свойства онкомаркеров.
4. Характеристика основных онкомаркеров (РЭА, АФП, ХГ, кальцитонин, β2-Микроглобулин, простато-специфические маркеры)

**2. Содержание темы:**

**Значение определения онкомаркеров**

**Онкомаркеры** – это особые белки, которые обнаруживаются в крови или моче больных раком. Опухолевые клетки продуцируют и выделяют онкомаркеры в кровь с момента возникновения новообразования, что делает возможным диагностику заболевания на ранних стадиях.

Анализ на онкомаркеры – не только один из самых надежных способов обнаружения злокачественной опухоли, но и возможность оценить эффективность проводимого лечения. Рецидив злокачественных заболеваний можно предвидеть за несколько месяцев до начала клинических проявлений. Благодаря специфичности каждого белка можно предположить очаг заболевания.

Отклонение от нормы одних маркеров однозначно свидетельствует о поражении определенных органов (ПСА, сПСА), другие онкомаркеры могут обнаруживаться при различных локализациях опухоли. В этом случае целесообразно провести комплексное обследование, поскольку  диагностика рака на основе одного только анализа на онкомаркеры не является достоверной.

Каждое новообразование выделяет строго определенный белок. Известно около 200 соединений, относящихся к опухолевым маркерам, но диагностическую ценность из них имеет не более 20. Наиболее часто проводят анализы на следующие виды онкомаркеров:

1. Раковый эмбриональный антиген (РЭА).
2. α-Фетопротеин (АФП).
3. Раковый антиген 19-9 (СА 19-9).
4. Раковый антиген 50 (СА 50).
5. Раковый антиген 195 (СА 195).
6. Раковый антиген 72-4 (СА 72-4).
7. Раковый антиген 15-3 (СА 15-3).
8. Раковый антиген 125 (СА 125) .
9. Муциноподобный карцинома-ассоциированный антиген (МСА).
10. Раковоассоциированный антиген 549 (СА 549) .
11. Антиген плоскоклеточной карциномы (SСС).
12. Нейрон-специфическая енолаза (НСЕ).
13. Фрагмент цитокератина 19 (СYFRА 21 - 1).
14. Хорионический гонадотропин (ХГ).
15. Простата-специфические маркеры .
16. Тканевой полипептидный антиген (ТРА) .
17. Тканевой полипептид-специфический антиген (ТРS).
18. β2-Микроглобулин (β-2-м).
19. Сывороточная дезокситимидинкиназа (С-ТК).
20. Трофобластический β1-гликопротеин (ТВГ или Р).
21. Плацентарный белок (РР-10).
22. Кальцитонин.
23. Глутатион S-трансфераза (ГТ Р1-1).

Для оценки общего биохимического статуса пациента определяют в сыворотке крови несколько наиболее важных показателей:

- "белковосинтетической функции" печени - общий белок, альбумин, мочевину, активность аланиновойтрансаминазы;

- почек и мочевыделительной системы - мочевину;

- инсулярного аппарата поджелудочной железы - глюкозу.

- о возможности поражения костей скелета первичной опухолью или метастазами судят по содержанию в сыворотке крови ЩФ.

Обнаруживаемые при общем скрининге наиболее существенные сдвиги могут быть интерпретированы следующим образом:

- увеличение содержания мочевины при нормальной концентрации креатинина свидетельствует об интенсивном распаде опухоли, а при повышенной его концентрации - о нарушении функции почек

- увеличение содержания глюкозы указывает на нарушение функции инсулярного аппарата, а снижение - на значительную утилизацию глюкозы опухолевыми клетками (например, при лимфосаркоме и некоторых быстро растущих опухолях у детей);

- увеличение содержания общего белка (при снижении концентрации альбумина) - характерный признак миеломной болезни;

- снижение содержания общего белка и альбумина обнаруживается у онкологических больных при поражении печени метастазами и в ряде других случаев как отражение общего действия опухоли на организм;

- белки острой фазы (ферритин, СРБ, церрулоплазмин, гаптглобин) - повышение их уровня свидетельствут о сопутствующем воспалительном процессе либо о секреции опухолью специфических ростовых факторов;

- повышение активности ЩФ свидетельствует о нарушении функции печени, в частности, в результате появления в ней метастазов (появление избыточных количеств фермента в крови может быть также следствием его гиперпродукции клетками остеогенной саркомы);

повышение обшей активности фермента имеет место у больных с опухолями желудочно-кишечного тракта;

- ЛДГ - общая активность фермента возрастает в сыворотке крови при различных онкологических заболеваниях, специфичность изоферментного спектра при тех или иных формах опухолей не выявлена.

- гипопротеинемия и гипоальбуминемия - показатели общего воздействия опухоли на организм как следствие снижения синтеза белка и усиленного его распада.

Таблица 1- Клиническое использование опухолевых маркеров

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Локализация рака** | **Гистологический тип** | **Опухолевый маркер** | **Диагноз** | **Стадия** | **Прогноз** | **Мониторинг** |
| Молочная железа | Аденокарцинома | РЭА | + | ++ | ++ | +++ |
| МСА | + | + | +++ | +++ |
| Легкие | Мелкоклеточный рак легкого | НСЕ | ++ | ++ | +++ | +++ |
| Аденокарцинома и малые клеточные карциномы | РЭА | + | + | ++ | +++ |
| РЭА + СА 19-9 | + | + | + | +++ |
| Ободочная и прямая кишка | Аденокарцинома | РЭА | ++ | ++ | +++ | +++ |
| Печень | Гепатоцеллюлярная карцинома | АФП | +++ | - | - | +++ |
| Метастазы из первичной опухоли | РЭА | ++ | - | + | +++ |
| Желудок | Аденокарцинома | СА-19-9 | ++ | - | - | +++ |
| РЭA | - | - | - | ++ |
| Поджелудочная железа | Аденокарцинома | СА 19-9 | +++ | - | - | +++ |
| РЭА | + | - | + | ++ |
| Яичко | Несеминома | АФП и/или ХГ | +++ | ++ | +++ | +++ |
| Сeминома | ХГ | +++ | ++ | +++ | +++ |
| Матка | Аденокарцинома | РЭА | - | - | - | ++ |
| Хорионкарцинома | ХГ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Яичник | Слизистые опухоли | РЭА | - | - | - | +++ |
| Эпителиальные опухоли кроме слизистых | СА 125 | - | ++ | - | +++ |
| Эмбриональная клеточная опухоль | АФП и/или ХГ | +++ | - | - | +++ |
| Щитовидная железа | Медуллярная карцинома | РЭА + кальцитонин | +++ | ++ | ++ | +++ |
| Предстательная железа | Аденокарцинома | Кислая фосфатаза (простатический изофермент)+ РSА | ++ | +++ | +++ | +++ |
| Примечание к трактовке результатов: + - полезный, ++ - важный, +++ - очень важный. |

**3. Самостоятельная работа.**

1. Изучите теоретический материал, и, анализируя прочитанное, выполните предложенные задания.

2. Заполните таблицы:

Таблица 1- Диагностическая значимость опухолевых маркеров.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Маркер** | **Границы нормы** | **Показания к использованию** |
| Кальцитонин |  |  |
| Раковый антиген 72-4 (СА 72-4) |  |  |
| β-2-Микроглобулин (β-2-м) |  |  |
| Антиген плоскоклеточной карциномы (SСС) |  |  |
| Фрагмент цитокератина 19 (СYFRА 21-1) |  |  |
| Раковый антиген 15-3 (СА 15-3) |  |  |
| Углеводный антиген 19-9 (СА 19-9) |  |  |
| Раковый антиген 125 (СА 125) |  |  |
| Нейрон-специфическая енолаза (НСЕ) |  |  |
| Хорионический гонадотропин человека (ХГ) |  |  |
| Тканевой полипептидный антиген (ТРА) |  |  |
| Раковый эмбриональный антиген (РЭА) |  |  |
| α-Фетопротеин (АФП) |  |  |
| Простата специфический антиген (РSА) |  |  |

Таблица 2 - Интерпретация биохимических показателей в общем скрининге онкологических заболеваний

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Показатель  | Значение нормы | Интерпретация повышения | Интерпретация снижения |
| Белки острой фазы: СРБ,ферритин, церулоплазмин,гаптоглобин |  |  |  |
| Глюкоза |  |  |  |
| МочевинКреатинин |  |  |  |
| Общий белокАльбумин |  |  |  |
| ЩФ |  |  |  |
| ЛДГ |  |  |  |

Таблица 3 - Рекомендуемые лабораторные тесты при обследовании больных группы повышенного риска возникновения онкологических заболеваний

|  |  |
| --- | --- |
| **Локализация опухоли** | **Лабораторные тесты** |
| **Онкомаркеры** | **Биохимические показатели** |
| Печень, поджелудочная железа |  |  |
| Желудок, тонкая, толстая, прямая кишка |  |  |
| Яичник, матка |  |  |
| Молочная железа |  |  |
| Яичко |  |  |
| Легкие |  |  |
| Предстательная железа |  |  |
| Гемобластозы |  |  |

**4. Итоговый контроль знаний.**

Тестирование.

**5. Подведение итогов.**

Итоговая оценка за занятие складывается из оценки за устный ответ, решения тестовых заданий, ситуационных задач, ведения рабочей тетради.

**6. Домашнее задание:** лекция № 17,18

Самостоятельная работа: решение задач, тестовых заданий.

## Практическое занятие № 12 Определение Альфа-фетопротеина (AFP)

**Значение темы**:

Заболеваемость раком растет с каждым годом. Причин тому огромное множество – это и общее ухудшение экологической ситуации, распространение вредных привычек (курение, алкоголь), употребление канцерогенов в пищу или применение их в быту, старение населения. Отмечается также тенденция к уменьшению среднего возраста больных, рак «молодеет». К счастью, медицина не стоит на месте, современные технологии позволяют диагностировать рак на самых ранних стадиях, а значит существенно увеличить вероятность излечения. Одним из наиболее эффективных способов диагностики онкологических заболеваний в настоящее время является анализ на онкомаркеры.

На основе теоретических знаний и практических умений обучающийся должен

**знать**: основные методики современных исследований молекулярной биологии, используемые в лабораторной диагностике (ИФА)

**уметь:** применять основные методики современных исследований молекулярной биологии, используемые в лабораторной диагностике;

Студент должен овладеть **общими компетенциями**:

OK 1. Понимать сущность и социальную значимость своей будущей профессии, проявлять к ней устойчивый интерес.

ОК 2. Организовывать собственную деятельность, выбирать типовые методы и способы выполнения профессиональных задач, оценивать их эффективность и качество.

ОК 9. Быть готовым к смене технологий в профессиональной деятельности.

ОК 13.Организовывать рабочее место с соблюдением требований охраны труда, производственной санитарии, инфекционной и противопожарной безопасности.

ПК 7.1. Готовить рабочее место и аппаратуру для проведения клинических лабораторных исследований.

ПК 7.2. Осуществлять высокотехнологичные клинические лабораторные исследования биологических материалов.

ПК 7.4. Дифференцировать результаты проведенных исследований с позиции «норма - патология».

**План изучения темы**

**1.Контроль исходного уровня знаний.**

1. Дайте определение термину «онкомаркеры»
2. Перечислите критерии значимости онкомаркеров.
3. Перечислите общие свойства онкомаркеров.
4. Характеристика основных онкомаркеров (РЭА, АФП, ХГ, кальцитонин, β2-Микроглобулин, простато-специфические маркеры)

## 2. Содержание темы:

**Альфа-фетопротеин (AFP)**

Альфа-фетопротеин (АФП, α-фетопротеин, AFP ) - гликопротеин с молекулярной массой 69 кДа, состоит из одной полипептидной цепи. По структуре и физико-химическим свойствам АФП очень близок к главному сывороточному белку - альбумину, эти белки являются двумя основными белками в кровообращении плода. Основные места синтеза АФП это печень и желточный мешок плода. Через 30 дней после зачатия в крови плода уже можно оперделить некоторую концентрацию АФП. Пик выработки АФП приходится на 13 неделю беременности и постепенно снижается до рождения. У детей второго года жизни АФП присутствует в незначительных следовых количествах. Аномально высокие уровни АФП в материнской сыворотке и амниотической жидкости связаны с пороками развития плода, такими как анэнцефалия и расщелина позвоночника. Пониженная концентрация АФП в материнской сыворотке обнаруживается при синдроме Дауна у зародыша. Определение АФП полезно, таким образом, при мониторинге беременности и для пренатальной диагностики пороков развития плода.

Определение АФП используется также при диагностике и, особенно, мониторинге терапии злокачественных новообразований. Поскольку первичный гепатоцеллюлярный рак является следствием цирроза печени, крайне важным является мониторинг групп повышенного риска развития рака печени (вирусоносители гепатита В, больные алкогольным циррозом).

**Принцип метода определения АФП**

АФП иммуноферментный тест фирмы HUMAN основан на классическом «сэндвич» методе ИФА c использованием высокоаффинной системы биотин-стрептавидин. На лунках микропланшета адсорбирован стрептавидин. При первой инкубации образцы сыворотки, калибраторы или контроли, конъюгат (меченые пероксидазой антитела к АФП), а также биотинилированныемоноклональные антитела к АФП смешиваются друг с другом, образуя при этом структуру типа «сэндвич», связанную с поверхностью лунок за счет взаимодействия биотина с имобилизованнымстрептавидином.

После инкубации не связавшийся конъюгат и моноклональные антитела удаляются промывкой. Добавление в лунки субстрата приводит к образованию окрашенного продукта, который меняет цвет на желтый при добавлении стоп-реагента, вносимого для остановки реакции. Интенсивность окраски измеряется фотометрически и пропорциональна концентрации АФП в пробе.

Численное значение концентрации определяется с помощью калибровочной кривой, построенной по калибраторам, входящим в состав набора.

**Необходимое оборудование и материалы, не входящие в состав набора**

1. Откалиброванные микропипетки со сменными наконечниками

2. Градуированная лабораторная посуда

3. Планшетный фотометр с длиной волны 450 и 630-690 нм

4. Дистиллированная или деионизованная вода.

**Подготовка к анализу**

1. Кровь на исследования рекомендуется сдавать натощак, пить можно только воду.
2. После последнего приёма пищи должно пройти не менее 8 часов.
3. Взятие крови на исследование необходимо проводить до начала приема лекарственных препаратов (если это возможно) или не ранее чем через 1-2 недели после их отмены. При невозможности отмены лекарственных препаратов в направлении на исследование должно быть указано какие лекарственные препараты получает больной и в каких дозах.
4. За день до взятия крови ограничить жирную и жареную пищу, не принимать алкоголь, исключить тяжёлые физические нагрузки.

**Факторы, влияющие на результаты анализа: г**емолиз, хилёз пробы.

**Исследуемые пробы: с**ыворотка крови.

Не используйте образцы с микробной контаминацией, гемолизом или гиперлипемией.

Пробы могут храниться до 5 дней при температуре 2-8 °С, или до 30 дней при температуре минус 20 °С. Повторное замораживание проб не допускается. После размораживания пробы необходимо гомогенизировать.

**ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Определение АФП показано при пренатальной диагностике дефектов плода, а также при диагностике и мониторинге терапии первичной гепатомы и тератомы.

При беременности аномально повышенный или пониженный уровни АФП могут указывать на пороки развития плода. Физиологический уровень АФП в материнской сыворотке растет с 10 по 36-ю неделю беременности, достигая максимума в 400-500 нг/мл, после чего снижается до 250 нг/мл к моменту рождения АФП является опухолевым маркером первичной гепатоцеллюлярной карциномы – наиболее распространенной во всех странах формы рака. Чувствительность и специфичность теста в отношении этого заболевания составляет 95-100%. Результаты определения АФП не могут являться единственным критерием при диагностике рака, диагноз должен основываться на всей совокупности клинических и лабораторных данных.

Таблица 1 - Ожидаемые результаты нормы

|  |  |
| --- | --- |
|  | **Концентрация АФП, нг/мл** |
| Нормальный уровень для здоровой популяции | < 8,5 |
| Пациенты с высоким риском гепатоцеллюлярной карциномы | 100-350 |
| Указание на гепатоцеллюлярную карциному | > 350 |

Концентрация АФП в сыворотке беременных зависит от срока.

Таблица 2 - Референтные значения концентрации АФП для рекомендуемых сроков беременности

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Неделя беременности** | **Концентрация АФП (медиана), нг/мл** | **Уровень АФП в крови, МЕ/мл** |
| 16 | 33,4 | 25 – 69 |
| 17 | 37,5 | 26 – 77.5 |
| 18 | 44,8 | 30 – 92.5 |
| 19 | 50,8 | 40 – 105 |
| 20 | 58,1 | 45 – 120 |
| 21 | 68,2 |   |

Для пересчета единиц: 1 нг/мл = 0,825 МЕ/мл

**ХГЧ - хорионический гонадотропин человека**. Он начинает выделяться тканями зародыша (точнее — хорионом) сразу после его прикрепления к стенке [матки](http://www.7ya.ru/article/Ne-po-dnyam-a-po-chasam-Izmeneniya-matki-vo-vremya-beremennosti), а это замечательное событие, напомним, происходит на четвертые сутки после оплодотворения.

Весь первый триместр беременности ХГЧ контролирует выработку в яичниках гормонов, необходимых для нормального развития беременности: прогестерона, эстрадиола и эстриола. Наибольший уровень хорионического гонадотропина отмечают на [8-9-й неделе](http://www.7ya.ru/calendar-pregn/8week/). Затем, к концу первого триместра, когда гормоны начинают вырабатываться плацентой, уровень ХГЧ снижается и удерживается на этом уровне в течение второго триместра.

ХГЧ Мужчины и небеременные женщины 0 — 5 МЕ/ мл,

У беременных женщин:

|  |  |
| --- | --- |
| Срок | Уровень ХГЧ, мЕд/мл |
| 1 — 2 недели | 25 — 156 |
| 2 — 3 недели | 101 — 4870 |
| 3 — 4 недели | 1110 — 31500 |
| 4 — 5 недель | 2560 — 82300 |
| 5 — 6 недель | 23100 — 151000 |
| 6 — 7 недель | 27300 — 233000 |
| 7 — 11 недель | 20900 — 291000 |
| 11 — 16 недель | 6140 — 103000 |
| 16 — 21 неделя | 4720 — 80100 |
| 21 — 39 недель | 2700 — 78100 |

Повышение ХГЧ может быть признаком серьёзных заболеваний у небеременных женщин и у мужчин:

* опухоли яичек
* опухолевые заболевания желудочно-кишечного тракта
* новообразования легких, почек, матки
* хорионкарцинома

Низкий ХГЧ у беременных женщин может означать неправильную постановку срока беременности или быть признаком серьёзных нарушений:

* внематочная беременность
* неразвивающаяся беременность
* задержка в развитии плода
* угроза самопроизвольного аборта (пониженный ХГЧ более чем на 50 %)
* хроническая плацентарная недостаточность
* истинное перенашивание беременности
* гибель плода (во II—III триместре беременности).

**Эстриол**— это стероидный женский половой гормон, который относится к эстрогенам. Врачи даже называют его главным эстрогеном беременности, ведь эстриол способствует увеличению кровотока по сосудам матки (тем самым снижает их сопротивление), а также участвует в процессе развития системы протоков молочных желез. При нормальном состоянии уровень эстриола в организме женщины значительно ниже, чем при беременности.

 Особое внимание уровню эстриола врач уделит, если:

* возраст матери составляет больше 35 лет, отца — более 45;
* были случаи [развития пороков](http://beremennost.net/vrozhdennye-poroki-razvitiya-ploda) у предыдущих детей;
* присутствует семейное носительство хромосомных болезней;
* имело место радиационное облучение кого-либо из родителей
* беременность осложнена [диабетом](http://beremennost.net/sakharnyi-diabet-i-beremennost) либо гипертензией
* до беременности женщина имела знакомство с регулярным невынашиванием плода

Снижение уровня эстриола в крови является плохим показателем. Пониженный эстриол может спровоцировать выкидыш или [преждевременные роды](http://beremennost.net/prezhdevremennye-rody); стать симптомом развития [синдрома Дауна](http://beremennost.net/sindrom-dauna-pri-beremennosti); пороков развития ЦНС (анэнцефалия плода); внутриутробной инфекции плода;

Концентрация свободного эстриола в сыворотке крови:

|  |  |
| --- | --- |
| Срок беременности в неделях | Эстриолнмоль/л |
| 1 – 4 | 0 – 1.42 |
| 5 – 8 | 1.15 – 1.49 |
| 9 – 12 | 1.2 — 5.56 |
| 13 – 16 | 4.69 – 10.76 |
| 17 – 20 | 9.96 – 18.89 |
| 21 – 24 | 22.29 – 31.11 |
| 25 – 28 | 26.76 – 43.12 |
| 29 – 32 | 35.31. – 63.06 |
| 33 – 34 | 40.23 – 69.09 |
| 35 – 36 | 44.10 – 70.01 |

**3. Самостоятельная работа.**

1. Изучите теоретический материал, и, анализируя прочитанное, выполните предложенные задания.

2. Записать принцип методики определения АФП.

3. Заполнить таблицу:

**Характеристика фетальных маркеров**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Срок беременности | АФП, мЕ/мл | ХГЧ, мЕ/мл | Эстриол, нмоль/л  |
| 1 – 4 |  |  |  |
| 5 – 8 |  |  |  |
| 9 – 12 |  |  |  |
| 13 – 16 |  |  |  |
| 17 – 20 |  |  |  |
| 21 – 24 |  |  |  |
| 25 – 28 |  |  |  |
| 29 – 32 |  |  |  |
| 33 – 34 |  |  |  |
| 35 – 36 |  |  |  |
| Патология повышения |  |  |  |
| Патология снижения |  |  |  |

**4. Итоговый контроль знаний.**

Решите предложенные задачи:

**Задача 1.**

Женщина 22 года, срок беременности 18н, результаты скрининга:

 АФП13 IU/ml(скорр.МоМ 0.29)

 ХГЧ 11.32 IU/ml(скорр.МоМ 0.70)

 НE 3 5.12 nmol/l(скорр.МоМ 1.04)

возрастной риск 1:1225

риск трисомии 21 1:886

Комбинированный риск на трисомию 1:5416

Риск трисомии 18 1:7718

1. Оцените результаты анализа и риск развития патологии.

**Задача 2.**

Врач направил женщину, 38 лет, 20 недель беременности, на консультацию к генетику по поводу Риска СД 1:36.

**Первый анализ сдавала в 12 недель**

РАРР-А 3310 мкг/мл 1,3 МоМ;

Бета-ХГЧ 61,8 нг/мл 1,9 МоМ

**Второй анализ в 15 недель**

АФП 5 нг/мл 0,4 МоМ;

 ХГЧ 73 МЕ/л 2,7 МоМ;

НЭ 2,0 нг/мл 0,8 МоМ;

Риск СД 1:36.

1. Оцените результаты анализа и риск развития патологии.

**Задача 3.**

Женщина, 28 лет, первая беременность, 17 недель. Насколько повышается риск, если у родственников мужа ребенок с СД:

 AFP 10 нг/мл MOM,

ХГЧ 3,0 MOM.

Среди родственников мужа была патология генетического характера.

* 1. Оцените результаты анализа и риск развития патологии.

**Задача 4.**

Врач направилженщину 39 лет, 16-17 недель беременности, на консультацию к генетику по поводу Риска СД 1:329.

АФП 32 нг/мл 0,7 МоМ;

ХГЧ 56 МЕ/л 2,7 МоМ;

НЭ 1,7 нг/мл 0,5 МоМ;

Риск СД 1:329.

1. Оцените результаты анализа и риск развития патологии.

**Задача 5.**

Женщина, 32 года, срок беременности на момент анализа - 15-16нед.,

 результаты анализов на ХГЧ, АФП:

 АФП - 0,4 МоМ;

 ХГЧ - 0,9МоМ;

риск СД - 1:371

1. Оцените результаты анализа и риск развития патологии.

**Задача 6.**

Анализы тройного теста - срок 16-17 недель, результаты:

Д-димер 526 нг/мл (485 нг/мл)

 Гормоны-ХГЧ 43493мМе/мл (27795 мМе/мл)

 АФП 36,6 Ме/мл (33 Ме/мл)

 Фибриноген 6,72 г/л (2-4 г/л)

Эстриол 17,4нг/мл (13,0нг/мл)

1. Оцените результаты анализа и риск развития патологии.

2. Объясните изменения значение фибриногена и Д-димера

**5. Подведение итогов.**

Итоговая оценка за занятие складывается из оценки за устный ответ, решения тестовых заданий, ситуационных задач, ведения рабочей тетради.

**6. Домашнее задание:** лекция 19,20

Самостоятельная работа: решение задач, тестовых заданий.

## Практическое занятие №13 Изучение молекулярных основ воспалительного процесса

**Значение темы**:

Воспаление - биологический и основной общепатологический процесс. Он имеет защитно-приспособительную функцию, направленную на ликвидацию повреждающего агента и восстановление повреждённой ткани. Несомненно, воспаление существует столь же долго, как и жизнь на Земле. Принято считать, что история учения о воспалении началась с Гиппократа (460-377 гг. до н.э.), хотя, несомненно, и ранее люди знали об этом процессе. Римский учёный А. Цельс (25 г. до н.э.-50 г. н.э.) выделил основные внешние симптомы воспаления: красноту (rubor), опухоль (tumor), жар (calor) и боль (dolor). Позже К. Гален прибавил ещё один признак - нарушение функции (functiolaesa). Однако механизмы развития этих симптомов и других, более тонких процессов, определяющих суть воспаления, не изучены окончательно до настоящего времени.

На основе теоретических знаний и практических умений обучающийся должен **знать**: основные методики современных исследований молекулярной биологии, используемые в лабораторной диагностике.

**уметь:** применять основные методики современных исследований молекулярной биологии, используемые в лабораторной диагностике;

Студент должен овладеть **общими компетенциями**:

OK 1. Понимать сущность и социальную значимость своей будущей профессии, проявлять к ней устойчивый интерес.

ОК 2. Организовывать собственную деятельность, выбирать типовые методы и способы выполнения профессиональных задач, оценивать их эффективность и качество.

ОК 3. Решать проблемы, оценивать риски и принимать решения в нестандартных ситуациях.

ОК 4. Осуществлять поиск и использование информации, необходимой для эффективного выполнения профессиональных задач, профессионального и личностного развития.

OK 5. Использовать информационно-коммуникационные технологии для совершенствования профессиональной деятельности.

**План изучения темы:**

**1.Контроль исходного уровня знаний.**

1. Воспаление – определение, основные признаки.
2. Классификация повреждающих факторов.
3. Стадии воспаления.
4. Фаза альтерации.
5. Клетки воспаления

# Биохимические изменения при воспалении

1. Механизм эмиграции лейкоцитов. Закон Мечникова.
2. Фаза экссудации.
3. Изменение обмена веществ в очаге воспаления.
4. Фаза пролиферации.
5. Факторы, стимулирующие развитие процессов пролиферации

## 2. Содержание темы:

**Клетки воспаления:**

 Макрофаги – они вырабатывают ряд биологически активных веществ, таких как интерлейкин-I, ферменты, антиинфекционные агенты – интерфероны, трансферрин, транскобаламин; дериваты арахидоновой кислоты – простагландин Е2, тромбоксан А2, лейкотриены; ингибиторы протеаз. Важнейшая функция макрофагов – фагоцитоз, а также кооперация с другими клетками воспаления.

Тучные клетки. Эти клетки вырабатывают гистамин, гепарин, факторы хемотаксиса эозинофилов и активации тромбоцитов.

Нейтрофилы. Главная функция этих клеток – фагоцитоз. Они попадают из костного мозга в кровь, эмигрируют из сосудов и в больших количествах скапливаются в воспаленной ткани. В нейтрофилах вырабатываются лейкотриены, ряд ферментов, фактор активации тромбоцитов и антимикробные факторы.

Эозинофилы. Их роль в воспалении определяется рецепторами, расположенными на поверхности, и ферментами, находящимися внутри. Эозинофилы осуществляют деградацию гистамина и лейкотриенов.

Тромбоциты. Их роль в воспалении состоит главным образом в том, что они имеют непосредственное отношение к микроциркуляции и свертыванию крови. В тромбоцитах вырабатываются простагландины, серотонин, гистамин, тромбоцитарный фактор роста.

Лимфоциты. Эти клетки играют роль при любом воспалении,

 но особенно при иммунном.

Фибробласты. Действие фибробластов проявляется в последнейстадии процесса, когда в очаге воспаления увеличивается число этих клеток, активизируется синтез в них коллагена и гликозаминогликанов.

Медиаторы воспаления. Медиаторами воспаления называются биологически активные вещества, которые синтезируются в клетках или в жидкостях

**3. Самостоятельная работа.**

1. Изучите теоретический материал, и, анализируя прочитанное, заполните таблицу:

Таблица 1 - Характеристика стадий воспаления

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Стадия воспаления** | **Характеристика стадии** | **Фазы стадии**  | **Факторы стимулирующие фазу воспаления** |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |

Таблица 2 - Характеристика клеток воспаления.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Клетки**  | **Роль в воспалении** | **Продукты выработки**  |
|  |  |  |
|  |  |  |

Таблица 3 - Характеристика органов и тканей по возможности к пролиферации

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Группа** | **Характеристика группы** | **Представители группы** |
|  |  |  |
|  |  |  |

**4. Итоговый контроль знаний.**

Тестирование.

**5. Подведение итогов.**

Итоговая оценка за занятие складывается из оценки за устный ответ, решения тестовых заданий, ситуационных задач, ведения рабочей тетради.

**6. Домашнее задание:** лекция №19,20

Самостоятельная работа: решение задач, тестовых заданий.

## Практическое занятие №14 Определение компонентов комплемента

**Значение темы:**

Воспаление - биологический и основной общепатологический процесс. Он имеет защитно-приспособительную функцию, направленную на ликвидацию повреждающего агента и восстановление повреждённой ткани. Несомненно, воспаление существует столь же долго, как и жизнь на Земле. Принято считать, что история учения о воспалении началась с Гиппократа (460-377 гг. до н.э.), хотя, несомненно, и ранее люди знали об этом процессе. Римский учёный А. Цельс (25 г. до н.э.-50 г. н.э.) выделил основные внешние симптомы воспаления: красноту (rubor), опухоль (tumor), жар (calor) и боль (dolor). Позже К. Гален прибавил ещё один признак - нарушение функции (functiolaesa). Однако механизмы развития этих симптомов и других, более тонких процессов, определяющих суть воспаления, не изучены окончательно до настоящего времени.

На основе теоретических знаний и практических умений обучающийся должен

**знать**: основные методики современных исследований молекулярной биологии, используемые в лабораторной диагностике (ИФА)

**уметь:** применять основные методики современных исследований молекулярной биологии, используемые в лабораторной диагностике;

Студент должен овладеть **общими компетенциями**:

OK 1. Понимать сущность и социальную значимость своей будущей профессии, проявлять к ней устойчивый интерес.

ОК 2. Организовывать собственную деятельность, выбирать типовые методы и способы выполнения профессиональных задач, оценивать их эффективность и качество.

ОК 4. Осуществлять поиск и использование информации, необходимой для эффективного выполнения профессиональных задач, профессионального и личностного развития.

ОК 9Быть готовым к смене технологий в профессиональной деятельности.

ОК 13Организовывать рабочее место с соблюдением требований охраны труда, производственной санитарии, инфекционной и противопожарной безопасности.

ПК 7.3Проводить контроль качества высокотехнологичных клинических лабораторных исследований.

ПК 7.4.Дифференцировать результаты проведенных исследований с позиции норма - патология.

**План изучения темы:**

**1.Контроль исходного уровня знаний.**

## Дать определение термину «комплемент»

1. Основные функции системы комплемента.
2. Механизм действия системы комплемента
3. Принцип действия системы комплемента
4. Основные пути активации комплемента.

## 2. Содержание темы:

**[Комплементом](http://humbio.ru/humbio/immunology/imm-gal/000b3eaa.htm)** называют сложный комплекс белков, действующий совместно для удаления внеклеточных форм патогена; система активируется спонтанно определенными патогенами или комплексом антиге-антитело.

Активированные белки либо непосредственно разрушают патоген (киллерное действие), либо обеспечивают лучшее их поглощение [фагоцитами](http://humbio.ru/humbio/immunology/imm-gal/0013a7ad.htm) ([опсонизирующее действие](http://humbio.ru/humbio/immunology/imm-gal/000d69d4.htm) ); либо выполняют функцию [хемотаксических факторов](http://humbio.ru/humbio/immunology/imm-gal/00140fb7.htm), привлекая в зону проникновения патогена клетки [воспаления](http://humbio.ru/humbio/immunology/imm-gal/00061b26.htm) .

Комплекс белков комплемента формирует каскадные системы, обнаруженные в плазме крови. Для этих систем характерно формирование быстрого, многократно усиленного ответа на первичный сигнал за счет каскадного процесса. В этом случае продукт одной реакции служит катализатором последующей, что в конечном итоге приводит к лизису клетки или микроорганизма.

Существует два главных пути (механизма) активации комплемента **- классический и альтернативный.**

**[Классический путь](http://humbio.ru/humbio/immunology/imm-gal/000a8845.htm)** [активации комплемента](http://humbio.ru/humbio/immunology/imm-gal/000a8845.htm) инициируется взаимодействием компонента комплемента [С1q](http://humbio.ru/humbio/immunology/imm-gal/001599e0.htm) с [иммунными комплексами](http://humbio.ru/humbio/har/00287cc6.htm) ([антителами](http://humbio.ru/humbio/immunology/imm-gal/00049f5d.htm), связанными с поверхностными антигенами бактериальной клетки); в результате последующего развития каскада реакций образуются белки с цитолитической (киллерной) активностью, [опсонины](http://humbio.ru/humbio/immunology/imm-gal/000d69d4.htm), [хемоаттрактанты](http://humbio.ru/humbio/immunology/imm-gal/00140e92.htm) . Такой механизм соединяет [приобретенный иммунитет](http://humbio.ru/humbio/immunology/imm-gal/00081c1f.htm) (антитела) с [врожденным иммунитетом](http://humbio.ru/humbio/immunology/imm-gal/00080755.htm)(комплемент).

**[Альтернативный путь](http://humbio.ru/humbio/immunology/imm-gal/0003c8a3.htm)** [активации комплемента](http://humbio.ru/humbio/immunology/imm-gal/0003c8a3.htm) инициируется взаимодействием компонента комплемента [С3b](http://humbio.ru/humbio/immunology/imm-gal/001599e0.htm) с поверхностью бактериальной клетки; активация происходит без участия антител. Данный путь активации комплемента относится к факторам врожденного иммунитета.

В целом система комплемента относится к основным системам [врожденного иммунитета](http://humbio.ru/humbio/immunology/imm-gal/00080755.htm), функция которых состоит в том, чтобы отличить "свое" от "не своего". Эта дифференциация в системе комплемента осуществляется благодаря присутствию на собственных клетках организма регуляторных молекул, подавляющих активацию комплемента.

**МЕТОДЫ ОЦЕНКИ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА**

Для выявления нарушений в системе комплемента и оценки ее функциональной целостности обычно проводится определение двух компонентов – С3 и С4.

**С4 –** это компонент классического пути активации комплемента (взаимодействия компонентов комплемента с комплексом антиген-антитело), имеющий важное значение в развитии аутоиммунных заболеваний.

**С3 –** ключевой компонент комплемента, участвующий в классическом и альтернативном пути активации системы комплемента. Он играет важную роль в реализации опсонизирующей функции крови, процессов хемотаксиса (движения микроорганизмов в ответ на химический раздражитель), фагоцитоза (захватывания клетками крови крупных частиц) и цитолиза (разрушения клеток).

**Метод исследования:** Иммуноферментный анализ (ИФА).

**Единицы измерения: Г**/л.

**Биоматериал:** Венозная кровь.

**Подготовка к исследованию:**

1. Не принимать пищу в течение 2-3 часов до анализа, можно пить чистую негазированную воду.
2. Исключить физическое и эмоциональное перенапряжение и не курить в течение 30 минут перед сдачей крови.

**С4-компонент** комплемента синтезируется преимущественно в печени, легких и костях и активируется только по классическому пути. Он участвует в обеспечении фагоцитоза, нейтрализации вирусов и увеличивает проницаемость сосудистой стенки. Его содержание уменьшается при активном потреблении вследствие активации по классическому пути, при этом может снижаться устойчивость к инфекционным заболеваниям. Кроме того, дефицит С4-компонента связан с предрасположенностью к системной красной волчанке. При иммунокомплексных заболеваниях С4 адсорбируется на иммунных комплексах, а его уровень в крови снижается.

**Цель анализа:**

* Для диагностики и мониторинга аутоиммунных (иммунокомплексных) заболеваний.
* Для контроля за эффективностью терапии вышеназванных заболеваний.
* Чтобы выявить предрасположенность к системной красной волчанке.
* ЧТобы оценить иммунный статус при инфекционных заболеваниях.

**Референсные значения:** 0,1 - 0,4 г/л.

Снижение С4-компонента наряду со снижением С3-компонента свидетельствует об активации классического пути (что может наблюдаться, например, при вирусном гепатите, начале формирования иммунных комплексов). Снижение в плазме крови С4 при нормальном уровне С3 указывает на дефицит С4 (как при врожденном ангионевротическом отеке и при некоторых формах системной красной волчанки).

**Причины повышения уровня С4:**

* злокачественные ново­образования, саркомы, лимфомы;
* рак;
* хроническая крапивница;
* дерматомиозит;
* ювенильный ревматоидный артрит; ревматоидный спондилит.

**Причины снижения уровня С4:**

* врожденная недостаточность С4;
* хронический бронхит;
* курение;
* криоглобулинемия;
* пурпура Шенляйн – Геноха;
* хронический активный гепатит;
* болезни иммунных комплексов;
* системная красная волчанка, волчаночный нефрит;
* отторжение почечного трансплантата;
* подострый бактериальный эндокардит;
* гломерулонефрит;
* наследственный ангионевротический отек;
* лечение цитостатиками и иммунодепрессантами.

**С3**-компонент синтезируется в различных тканях и органах и составляет до 70 % от всех белков комплемента. Он участвует как в классическом (активируется комплексами антигена с IgG, IgM), так и в альтернативном пути активации (активируется комплексами антигена с IgA, IgE, Fab-фрагментами Ig, полисахаридными антигенами бактерий).

**С3** – это ключевой компонент комплемента, участвующий в обеспечении неспецифической устойчивости (резистентности) организма к бактериальной инфекции. Под влиянием С3 повышается проницаемость сосудистой стенки и лейкоциты перемещаются к очагу воспаления, происходит их дегрануляция, в результате чего высвобождается большое количество биологически активных веществ. Фиксация С3-компонента комплемента на клеточной стенке бактерий (опсонизация) приводит к усилению фагоцитоза. Кроме того, С3-компонент играет важную роль в развитии аутоиммунных заболеваний: он входит в состав иммунных комплек­сов. Снижение уровня С3 может приводить к ослаблению опсонизирующей функции крови, фагоцитоза и цитолиза.

**Цель анализа:**

* Чтобы выявить активацию классического или альтернативного пути (в сочетании с определением С4).
* Для диагностики состояний, связанных с врожденным дефицитом белков системы комплемента (частых инфекционных заболеваний, аутоиммунных заболеваний и др.).
* Для мониторинга аутоиммунных заболеваний (снижение концентрации компонентов комплемента прямо пропорционально активности процесса).
* Для контроля за эффективностью терапии этих заболеваний.
* Для оценка иммунного статуса при инфекционных заболеваниях.

**Референсные значения:** 0,9 - 1,8 г/л.

Снижение уровня СЗ может быть связано с нарушением его синтеза или усилением катаболизма, а также адсорбцией на иммунных комплексах при аутоиммун­ных и иммунокомплексных заболеваниях. В остром периоде инфекции уровень СЗ повышается, а в период выздоровления – нормализуется, поэтому он может рассматриваться как острофазовый белок. Снижение С3 наряду со снижением С4 свидетельствует об активации классического пути (что может наблюдаться, например, при вирусном гепатите, начале формирования иммунных комплексов). Снижение С3 при нормальном С4 свидетельствует о врожденном дефиците С3 или инактиватора С3b либо об активации альтернативного пути.

**Причины повышения уровня C3:**

* острые и подострые бактериальные, грибковые, паразитарные или вирусные инфекции;
* холестаз;
* желчнокаменная болезнь;
* нефротический синдром;
* амилоидоз (в фазу ремиссии);
* ревматическая лихорадка и ревматоидный артрит;
* злокачественные новообразования с метастазами;
* лечение глюкокортикоидами.

**Причины снижения уровня C3:**

* врожденная недостаточность комплемента или нарушения в системе комплемента;
* аутоиммунные и иммунокомплексные заболевания (в том числе сывороточная болезнь, острый постстрептококковый и мембранозно-пролиферативный гломерулонефрит, хронический подострый бактериальный эндокардит, системная красная волчанка, синдром Шегрена, ревматоидный артрит, целиакия);
* рецидивирующие пиогенные инфекции;
* болезнь Рейно;
* рассеянный склероз;
* лимфогранулематоз, хронический лимфолейкоз, миеломная болезнь;
* герпетиформный дерматит;
* B12-дефицитная или фолиеводефицитная анемия;
* хронический гепатит и цирроз печени;
* белковое голодание;
* уремия;
* грамотрицательный сепсис;
* лечение цитостатиками и иммунодепрессантами;
* воздействие ионизирующего излучения;
* отторжение почечного трансплантата;
* ДВС-синдром (синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания);
* пароксизмальная ночная гемоглобинурия;
* обширные повреждения и неврозы тканей.



**3. Самостоятельная работа.**

1. Изучите теоретический материал, и анализируя прочитанное выполните предложенные задания.

2. Заполните сравнительную таблицу:

Таблица 1. Компоненты комплемента С4 и С3.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Компоненты комплемента** | **норма**  | **функция**  | **Локализация синтеза** | **повышение**  | **понижение**  |
| **С3** |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
| **С4** |  |  |  |  |  |

Таблица 2. Характеристика компонентов комплемента.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Компоненты комплемента**  | **Путь активации** | **Характеристика белков комплемента** |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |

**4. Итоговый контроль знаний.**

Тестирование.

**5. Подведение итогов.**

Итоговая оценка за занятие складывается из оценки за устный ответ, решения тестовых заданий, ситуационных задач, ведения рабочей тетради.

**6. Домашнее задание:** лекции №18,19,20

Самостоятельная работа: решение задач, тестовых заданий.

## Практическое занятие №15 Определение малонового диальдегида

**Значение темы**:

Малоновый альдегид в крови  – один из показателей антиоксидантного статуса организма (системы организма противостоящей токсическому действию ряда активных соединений кислорода). Основные показания к применению: заболевания сердечно-сосудистой системы, атеросклероз, диабет.
Одним из неблагоприятных последствий перекисного окисления липидов считается образование малонового альдегида в результате обусловленного радикалами разрыва полиеновых кислот.
По скорости образования малонового альдегида можно судить об активации ПОЛ. Активация ПОЛ наблюдается при различных заболевания: ишемия органов и тканей, диабет, атеросклероз и многих других.

На основе теоретических знаний и практических умений обучающийся должен

**знать**: основные методики современных исследований молекулярной биологии, используемые в лабораторной диагностике.

**уметь:** применять основные методики современных исследований молекулярной биологии, используемые в лабораторной диагностике;

Студент должен овладеть **общими компетенциями**:

OK 1. Понимать сущность и социальную значимость своей будущей профессии, проявлять к ней устойчивый интерес.

ОК 2. Организовывать собственную деятельность, определять методы и способы выполнения профессиональных задач, оценивать их эффективность и качество.

ОК 4. Осуществлять поиск и использование информации, необходимой для эффективного выполнения профессиональных задач, профессионального и личностного развития.

ОК 13. Организовывать рабочее место с соблюдением требований охраны труда, производственной санитарии, инфекционной и противопожарной безопасности.

ПК 7.2. Осуществлять высокотехнологичные клинические лабораторные исследования биологических материалов.

ПК 7.4. Дифференцировать результаты проведенных исследований с позиции «норма - патология».

**План изучения темы:**

**1.Контроль исходного уровня знаний.**

1. Основные механизмы нарушения барьерных свойств липидного слоя
2. Свободные радикалы, образующиеся в клетках нашего организма
3. Стадии ПОЛ
4. Биологические последствия пероксидации липидов
5. Уровни регуляции скорости свободнорадикального окисления.
6. Связь развития заболеваний с повреждающим действием свободных радикалов
7. Свободные радикалы в неспецифическом иммунитете и воспалении
8. Свободные радикалы в сердечно-сосудистой патологии
9. Свободные радикалы в процессах канцерогенеза

## 2. Содержание темы:

**Малоновыйдиальдегид (MDA)** – эндогенный альдегид, являющийся клинико-лабораторным маркером оксидативного стресса и используемый для прогноза и контроля лечения ишемической болезни сердца, а также широкого спектра других заболеваний.

**Метод исследования:** Высокоэффективная жидкостная хроматография.

**Единицы измерения:** Нмоль/мл

**Биоматериал:** Венозную кровь.

**Общая информация об исследовании:**

Малоновыйдиальдегид (MDA) – это эндогенный альдегид, образующийся в результате метаболизма арахидоновой и других полиненасыщенных жирных кислот. Вследствие дальнейших биохимических превращений он окисляется до диоксида углерода или вступает во взаимодействие с фосфолипидами, аминокислотами и нуклеиновыми кислотами. В настоящее время малоновыйдиальдегид рассматривается в качестве маркера оксидативного стресса.

Уровень MDA важен для диагностики широкого спектра заболеваний. Наиболее убедительные данные получены при изучении роли MDA в прогнозе и контроля лечения ишемической болезни сердца (ИБС). Так, было показано, что концентрация MDAсоотносится с некоторыми клиническими признаками ИБС (функциональный класс заболевания, данные ЭКГ). Она может быть использована для [прогноза инфаркта миокарда](http://www.helix.ru/kb/item/757) без зубца q и нестабильной [стенокардии](http://www.helix.ru/kb/item/1304) как в раннем, так и в отдаленном периоде заболевания. Уровень малоновогодиальдегида выше 100 нмоль/мл является неблагоприятным прогностическим маркером. Медикаментозное лечение ИБС сопровождается значительным (более 20 %) снижением MDAвне зависимости от клинической формы заболевания.

Высокие уровни MDA отмечены при тяжелом течении [псориаза](http://www.helix.ru/kb/item/924), [рассеянного склероза](http://www.helix.ru/kb/item/885), [инсульта](http://www.helix.ru/kb/item/725), хронических патологий почек, а также некоторых инфекций (сифилис, стрептококковая инфекция) и онкологий ([рак желудка](http://www.helix.ru/kb/item/735), [рак легкого](http://www.helix.ru/kb/item/1298)). На этом основании MDA может быть использован в качестве вспомогательного прогностического маркера при обследовании пациентов с указанными заболеваниями. В последнее время возросло значение определения уровня MDA, а также некоторых других эндогенных альдегидов в клинике антивозрастной медицины.

Концентрация малоновогодиальдегида в крови связана с некоторыми клинико-лабораторными показателями [липидограммы](http://www.helix.ru/kb/item/40-039). Наиболее значимая связь выявлена между MDA и концентрацией [липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП)](http://www.helix.ru/kb/item/30-001), а также [триглицеридов](http://www.helix.ru/kb/item/06-041) и [общего холестерина](http://www.helix.ru/kb/item/06-048).

При интерпретации уровня MDA и оценке оксидативного стресса у конкретного больного целесообразно проводить дополнительные исследования, в первую очередь на маркеры антиоксидантной системы крови (глутатион, [ретинол](http://www.helix.ru/kb/item/06-101), ?-токоферол, [аскорбиновую кислоту](http://www.helix.ru/kb/item/06-105) и некоторые другие микроэлементы).

**Назначение теста:**

* оценкаоксидативного стресса;
* прогноз и контроль лечения ишемической болезни сердца, а также (псориаза, рассеянного склероза, инсульта, хронических заболеваний почек, сифилиса, стрепткокковой инфекции, рака желудка, рака легкого).

**Референсные значения**: 0,45 - 1,7 нмоль/мл.

**Причины повышения уровня малоновогодиальдегида**:

* ишемическая болезнь сердца;
* псориаз;
* рассеянный склероз;
* инсульт;
* хронические заболевания почек;
* инфекционные заболевания (сифилис, рожа);
* онкологические заболевания (рак желудка, рак легкого).

**Причины понижения уровня малоновогодиальдегида:**

* снижение интенсивности перекисного окисления липидов на фоне лечения.

**3. Самостоятельная работа.**

1. Изучите теоретический материал, и, анализируя прочитанное, заполните таблицу:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Продукты ПОЛ** | **норма** | **источник** | **Значение повышения** | **Значение понижения** |
| МДА |  |  |  |  |
| Диеновые коньюгаты |  |  |  |  |

2.Изучить методику определения малонового альдегида, и провести определение МДА в предложенном образце:

**Метод определения малоновогодиальдегида в крови**

**Принцип метода:** при высокой температуре в кислой среде малоновыйдиальдегид (МДА) реагирует с 2-тиобарбитуровой кислотой с образованием окрашенного триметипового комплекса (ТМК), имеющего максимум поглощения при 532 нм.

**Реактивы:**

1. 10% водный раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ).

2. 0.8% водный раствор 2-тиобарбитуровой кислоты (2-ТБК). Готовится при нагревании в кипящей водяной бане в день исследования.

3. Вода дистиллированная.

**Оборудование и аппаратура.**

1. Спектрофотометр.

2. Центрифуга лабораторная.

3. Водяная баня.

4. Весы аналитические.

5. Пробирки химические и центрифужные.

6. Колбы мерные.

7. Пипетки измерительные.

**Материал для исследования.**

Материалом для исследования служит гепаринизированная кровь.

**Ход определения.**

1. К 2,5 мл гепаринизированной крови, помещенной в центрифужную пробирку приливают 2,5 мл 10% раствора трихлоруксусной кислоты, хорошо перемешивают стеклянной палочкой.

2. Пробы центрифугирую: в течение 15 минут при 3000 об/мин.

3. 3,0 мл надосадочной жидкости переносят в чистые центрифужные пробирки и прибавляют 1,5 мл 0,8% раствора 2-тиобарбитуровой кислоты и хорошо перемешивают.

4. Пробы помещают в кипящую водяную баню на 15 минут. В ходе реакции развивается розовое окрашивание.

5. Пробы вынимают из кипящей водяной бани и охлаждают под струей холодной водопроводной воды. После охлаждения их центрифугируют в течение 5 минут при 3000 об/мин.

6. Одновременно с опытными ставят контрольную пробу, содержащую 2,5 мл дистиллированной воды, 2,5 мл 10% трихлоруксусной кислоты, 1,5 мл 0,8% раствора 2-тиобарбитуровой кислоты и обрабатывают аналогично опытной пробе.

7. Полученный центрифугат осторожно, не встряхивая, переносят в химические пробирки и измеряют оптическую плотность опытных проб при 532 нм против контрольной пробы в 10 мм-вых кюветах

**Расчет результатов.**

Содержание малонового диальдегида рассчитывают по формуле:

где

С - концентрация малонового диальдегида, мкМ/л;

Е - оптическая плотность пробы;

106 - коэффициент пересчета в мкМ;

1,56\*105 - коэффициент молярной экстинкции ТМК МДА с 2-ТБК;

3 - фактор разведения.

**4. Итоговый контроль знаний.**

Тестирование.

**5. Подведение итогов.**

Итоговая оценка за занятие складывается из оценки за устный ответ, решения тестовых заданий, ситуационных задач, ведения рабочей тетради.

**6. Домашнее задание:** №21

Самостоятельная работа: решение задач, тестовых заданий.

## Практическое занятие №16 Определение цитокинов

**Значение темы**:

В настоящий момент диагностическая значимость оценки уровня цитокинов заключается в констатации самого факта повышения или понижения их концентрации у данного больного с конкретным заболеванием. Для оценки тяжести и прогнозирования течения заболевания целесообразно определять концентрацию как противо-, так и провоспалительных цитокинов в динамике развития патологии.

На основе теоретических знаний и практических умений обучающийся должен **знать**:

- основные методики современных исследований молекулярной биологии, используемые в лабораторной диагностике (ИФА)

**уметь:** применять основные методики современных исследований молекулярной биологии, используемые в лабораторной диагностике;

Студент должен овладеть **общими компетенциями**:

ОК 2. Организовывать собственную деятельность, выбирать типовые методы и способы выполнения профессиональных задач, оценивать их эффективность и качество.

ОК 4. Осуществлять поиск и использование информации, необходимой для эффективного выполнения профессиональных задач, профессионального и личностного развития.

ОК 9. Быть готовым к смене технологий в профессиональной деятельности.

ПК 7.4.Дифференцировать результаты проведенных исследований с позиции норма - патология.

**План изучения темы:**

**1.Контроль исходного уровня знаний.**

Ответьте на вопросы:

1. Дайте определение термину «цитокины»
2. Назовите функции цитокинов.
3. Перечислите общие свойства цитокинов.
4. Приведите классификацию цитокинов.
5. Перечислите основные компоненты системы цитокинов.
6. Перечислите клетки-продуценты цитокинов.
7. Охарактеризуйте семейства рецепторов цитокинов.
8. Каковы механизмы функционирования сети цитокинов?

## 2. Содержание темы:

**МЕТОДЫ ОЦЕНКИ СИСТЕМЫ ЦИТОКИНОВ**

**Цитокины** - белковопептидные молекулы, продуцируемые различными клетками организма и осуществляющие межклеточные и межсистемные взаимодействия. Цитокины - универсальные регуляторы жизненного цикла клеток, они контролируют процессы дифференцировки, пролиферации, функциональной активации и апоптоза последних.

Являясь регуляторными молекулами, цитокины играют важную роль в осуществлении реакций врожденного и адаптивного иммунитета, обеспечивают их взаимосвязь, контролируют гемопоэз, воспаление, заживление ран, образование новых кровеносных сосудов (ангиогенез) и многие другие жизненно важные процессы.

**Комплексный анализ системы цитокинов включает:**

**I. Оценка клеток-продуцентов.**

1. Определение экспрессии:

• рецепторов, распознающих патоген или антиген (TКР, TLR) на уровне генов и молекулы белка (ПЦР, метод проточной цитофлуориметрии);

• адаптерных молекул, проводящих сигнал, запускающий транскрипцию цитокиновых генов (ПЦР и др.);

• генов цитокинов (ПЦР);

* белковых молекул цитокинов (оценка цитокинсинтезирующей функции мононуклеарных клеток человека).

2. Количественное определение субпопуляций клеток, содержащих те или иные цитокины: Th1, Th2 Th17 (метод внутриклеточного окрашивания цитокинов); определение количества клеток, секретирующих определенные цитокины (метод ELISPOT, ИФА).

**II. Оценка цитокинов и их антагонистов в биологических средах организма.**

1. Tестирование биологической активности цитокинов.

2. Количественное определение цитокинов с помощью ИФА.

3. Иммуногистохимическое окрашивание цитокинов в тканях.

4. Определение соотношения оппозитных цитокинов (про- и противовоспалительных), цитокинов и антагонистов рецепторов цитокинов.

**III. Оценка клеток-мишеней.**

1. Определение экспрессии рецепторов цитокинов на уровне генов и белковой молекулы (ПЦР, метод проточной цитофлуориметрии).

2. Определение сигнальных молекул во внутриклеточном содержимом.

3. Определение функциональной активности клеток-мишеней.

В настоящее время разработаны многочисленные методы оценки системы цитокинов, которые дают разноплановую информацию:

1) молекулярно-биологические методы;

2) методы количественного определения цитокинов с помощью иммуноанализа (ИФА);

3) тестирование биологической активности цитокинов;

4) внутриклеточное окрашивание цитокинов;

5) метод ELISPOT, позволяющий выявить цитокины вокруг единичной цитокинпродуцирующей клетки;

6) иммунофлюоресценцию.

**Характеристика методов:**

1.С помощью молекулярно-биологических методов можно исследовать экспрессию генов цитокинов, их рецепторов, сигнальных молекул, изучать полиморфизм указанных генов.

2.Количественное определение цитокинов в биологических жидкостях и в культурах мононуклеарных клеток периферической крови методом ИФА можно охарактеризовать следующим образом. Уровни цитокинов в сыворотке или других биологических жидкостях отражают текущее состояние иммунной системы.

Определение уровней продукции цитокинов мононуклеарами периферической крови (МНК) показывает функциональное состояние клеток. Спонтанная продукция цитокинов МНК в культуре свидетельствует, что клетки уже активированы invivo. Индуцированный синтез цитокинов отражает потенциальную, резервную способность клеток отвечать на антигенный стимул. Сниженная индуцированная продукция цитокинов может служить одним из признаков иммунодефицитного состояния. Оценка уровней цитокинов позволяет получить данные о тяжести воспалительного процесса, его переходе на системный уровень и прогнозе, функциональной активности клеток иммунной системы.

3.Биологическое тестирование проводят на основе знания основных свойств цитокинов, их действия на клетки-мишени. Изучение биологических эффектов цитокинов позволило разработать четыре разновидности тестирования цитокинов:

1) по индукции пролиферации клеток-мишеней;

2) по цитотоксическому эффекту;

3) по индукции дифференцировки костно-мозговых предшественников;

4) по противовирусному действию.

В настоящий момент диагностическая значимость оценки уровня цитокинов заключается в констатации самого факта повышения или понижения их концентрации у данного больного с конкретным заболеванием. Для оценки тяжести и прогнозирования течения заболевания целесообразно определять концентрацию как противо-, так и провоспалительных цитокинов в динамике развития патологии.

В ЗАО «Вектор-Бест» в настоящий момент разработаны и серийно производятся наборы реагентов для количественного определения:

- фактора некроза опухолей-альфа (чувствительность — 2 пг/мл, 0–250 пг/мл);

- гамма-интерферона (чувствительность — 5 пг/мл, 0–2000 пг/мл);

 - интерлейкина-4 (чувствительность — 2 пг/мл, 0–400 пг/мл);

- интерлейкина-8 (чувствительность — 2 пг/мл, 0–250 пг/мл);

 - рецепторного антагониста интерлейкина-1 (ИЛ-1РА) (чувствительность — 20 пг/мл, 0–2500 пг/мл);

- альфа-интерферона (чувствительность — 10 пг/мл, 0–1000 пг/мл);

Все наборы предназначены для определения концентрации указанных цитокинов в биологических жидкостях человека.

**Принцип анализа** — «sandwich»-вариант твердофазного трехстадийного либо двухстадийного иммуноферментного анализа на планшетах.

Для анализа **требуется 100 мкл** биологической жидкости или культуральногосупернатанта на одну лунку.

**Учёт результатов** — спектрофотометрически на длине волны 450 нм. Во всех наборах хромоген — тетраметилбензидин.

**Срок хранения** наборов увеличен до 18 месяцев со дня выпуска и 1 месяца после начала использования.

**Клинико-диагностическая характеристика некоторых цитокинов**

1. **Фактор некроза опухолей-альфа**

Альфа-ФНО — это плейотропныйпровоспалительный цитокин, состоящий из двух вытянутых b-цепей с молекулярной массой 17 кД и выполняющий регуляторные и эффекторные функции в иммунном ответе и воспалении.

**Основные продуценты** альфа-ФНО — моноциты и макрофаги. Этот цитокин выделяется также лимфоцитами и гранулоцитами крови, естественными киллерами, Т-лимфоцитарными клеточными линиями.

**Главные индукторы** альфа-ФНО — вирусы, микроорганизмы и продукты их метаболизма, в том числе бактериальный липополисахарид. Кроме того, роль индукторов могут выполнять и некоторые цитокины, такие как ИЛ-1, ИЛ-2, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, альфа- и бета-ИНФ.

**Основные направлениябиологической активности** альфа-ФНО: проявляет избирательную цитотоксичность в отношении некоторых опухолевых клеток; активирует гранулоциты, макрофаги, эндотелиальные клетки, гепатоциты, остеокласты и хондроциты, синтез других провоспалительных цитокинов; стимулирует пролиферацию и дифференцировку: нейтрофилов, фибробластов, эндотелиальных клеток (ангиогенез), гемопоэтических клеток, Т- и В-лимфоцитов; усиливает поступление нейтрофилов из костного мозга в кровь; обладает противоопухолевой и противовирусной; участвует в процессах деструкции и репарации, сопутствующих воспалению; служит одним из медиаторов деструкции тканей, обычной при длительном, хроническом воспалении.

 **Повышенный уровень** альфа-ФНО наблюдается в сыворотке крови в период посттравматического состояния, при легочных дисфункциях, нарушениях нормального течения беременности, онкологических заболеваниях, бронхиальной астме. Уровень альфа-ФНО в 5–10 раз выше нормы наблюдается при обострении хронической формы вирусного гепатита С. В период обострения заболеваний желудочно-кишечного тракта концентрация альфа-ФНО в сыворотке превышает норму в среднем в 10 раз, а у отдельных больных — в 75–80 раз. Высокие концентрации альфа-ФНО обнаруживаются в цереброспинальной жидкости у больных рассеянным склерозом и цереброспинальным менингитом, а у больных ревматоидным артритом — в синовиальной жидкости. Это позволяет предполагать участие альфа-ФНО в патогенезе ряда аутоиммунных заболеваний. Частота выявления альфа-ФНО в сыворотке крови даже при тяжелом воспалении не превышает 50%, при индуцированной и спонтанной продукции — до 100%. **Диапазон нормы 0 — 1,5 пг/мл.**

1. **Гамма-интерферон**

Гамма-ИНФ представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 21 кД. **Продуцентами** гамма-ИНФ являются активированные ТН-1-лимфоциты и натуральные клетки-киллеры.

**Индукторами** синтеза эндогенного гамма-ИНФ являются вирусы, бактерии, токсины, метаболиты, некоторые белки растительного происхождения, митогены.

**Основные направления биологической активности** гамма-ИНФ: обладает противовирусной активностью; активирует моноциты и макрофаги, пролиферацию и дифференцировку Т-cyt-лимфоцитов; стимулирует созревание костномозговых клеток — предшественников моноцитов; подавляет опухолевый рост, размножение вирусов в клетках, продукцию и секрецию цитокинов ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-10 ТH-2-лимфоцитами, пролиферацию В-лимфоцитов и синтез IgE, пролиферацию соматических клеток, секрецию IgG1, IgG2, эффект ИЛ-3, ИЛ-4 и альфа-ФНО в отношении костномозговых клеток; усиливает дифференцировку опухолевых клеток, противовирусную, противомикробную и антипаразитарную резистентность, включает синтез IgА В-лимфоцитами.

**Повышение уровня** концентрации гамма-ИНФ может наблюдаться при острых вирусных, бактериальных и паразитарных инфекциях, в период обострения заболеваний желудочно-кишечного тракта, таких как язвенная болезнь желудка или двенадцатиперстной кишки, желчнокаменная болезнь, гепатоцеребральная дистрофия, хронический панкреатит, глютеноваяэнтеропатия, неспецифический язвенный колит и др.. В крови больных бронхиальной астмой атопической и инфекционно-аллергической форм обнаружено повышение гамма-ИНФ в 28 раз по сравнению с нормой. Обнаружено повышение содержания гамма-ИНФ в крови больных рассеянным склерозом. При активации вирусной инфекции во время беременности уровень гамма-ИНФ в околоплодных водах снижается в 2,5 раза по сравнению со здоровыми женщинами. **Диапазон в норме — 0–25 пг/мл.**

1. **Интерлейкин-4**

ИЛ-4 — гликопротеин с молекулярной массой 18–20 кД, естественный ингибитор воспаления. Наряду с гамма-ИНФ ИЛ-4 является ключевым цитокином, продуцируемым Т-клетками. Он поддерживает баланс TH-1/TH-2.

**Главныенаправления биологической активности** ИЛ-4: усиливает эозинофилию, накопление тучных клеток, секрецию IgG4, опосредованный ТН-2-клетками гуморальный иммунный ответ; обладает местной противоопухолевой активностью, стимулируя популяцию цитотоксических Т-лимфоцитов и инфильтрацию опухоли эозинофилами; подавляет освобождение цитокинов воспаления (альфа-ФНО, ИЛ-1, ИЛ-8) и простагландинов из активированных моноцитов, продукцию цитокинов ТН-1-лимфоцитами (ИЛ-2, гамма-ИНФ и др.).

 **Повышенный уровень** содержания ИЛ-4 как в сыворотке, так и в стимулированных лимфоцитах может наблюдаться при аллергических заболеваниях (бронхиальная астма, аллергический ринит, поллиноз, атопический дерматит), при заболеваниях желудочно-кишечного тракта. Уровень ИЛ-4 также заметно повышается у больных хроническим гепатитом С (ХГС). В периоды обострения ХГС его количество увеличивается почти в 3 раза по сравнению с нормой, а во время ремиссии ХГС уровень ИЛ-4 снижается, особенно на фоне проводимого лечения рекомбинантным ИЛ-2. **Диапазон в норме — 0–20 пг/мл.**

1. **Интерлейкин-8**

ИЛ-8 относится к хемокинам, представляет собой протеин с молекулярной массой 8 кД. **ИЛ-8 продуцируется**мононуклеарными фагоцитами, полиморфноядерными лейкоцитами, эндотелиальными клетками и другими типами клеток в ответ на различные **стимулы**, включая бактерии и вирусы и продукты их метаболизма, в том числе провоспалительные цитокины (например, ИЛ-1, альфа-ФНО).

**Основная роль** интерлейкина-8 — усиление хемотаксиса лейкоцитов. Он играет важную роль как при остром, так и при хроническом воспалении.

**Повышенный уровень** ИЛ-8 наблюдается у пациентов с бактериальными заражениями, хроническими заболеваниями лёгких, заболеваниями желудочно-кишечного тракта [5]. Уровень ИЛ-8 в плазме увеличен у пациентов с сепсисом, а его высокие концентрации коррелируют с повышенной смертностью.

Результаты измерения содержания ИЛ-8 могут быть использованы для контроля за ходом лечения и прогнозирования исхода заболевания.

 У здоровых людей в сыворотке крови ИЛ-8 выявляется крайне редко; спонтанная продукция ИЛ-8 мононуклеарами крови наблюдается у 62%, а индуцированная — у 100% здоровых доноров.

**Диапазон в норме — 0–10 пг/мл.**

1. **Рецепторный антагонист интерлейкина-1**

ИЛ-1РА относится к цитокинам, представляет собой олигопептид с молекулярной массой 18–22 кД. ИЛ-1РА является эндогенным ингибитором ИЛ-1, **продуцируетс**я макрофагами, моноцитами, нейтрофилами, фибробластами и эпителиальными клетками. ИЛ-1РА подавляет биологическую активность интерлейкинов ИЛ-1альфа и ИЛ-1бета, конкурируя с ними за связывание с клеточным рецептором [3].

 **Продукцию ИЛ-1РА стимулируют** многие цитокины, вирусные продукты и белки острой фазы.

ИЛ-1РА может активно экспрессироваться в воспалительных очагах при множестве хронических заболеваний: при ревматоидном и ювенильном хронических артритах, системной красной волчанке, ишемических поражениях головного мозга, воспалительных заболеваниях кишечника, бронхиальной астме, пиелонефрите, псориазе и других. При сепсисе отмечается наиболее высокое повышение ИЛ-1РА — до 55 нг/мл в отдельных случаях, причем обнаружено, что повышенные концентрации ИЛ-1РА коррелируют с благоприятным прогнозом.

**Диапазон в норме — 50–1000 пг/мл.**

1. **Альфа-интерферон**

Альфа-ИНФ представляет собой мономерныйнегликозилированный белок с молекулярной массой 18 кД.

С**интезируется** преимущественно лейкоцитами (В-лимфоцитами, моноцитами). Этот цитокин может также продуцироваться фактически любым типом клеток в ответ на соответствующее возбуждение, мощными стимуляторами синтеза альфа-ИНФ могут быть внутриклеточные вирусные инфекции.

**К индукторам** альфа-ИНФ относятся: вирусы и их продукты, среди которых ведущее место занимают двухцепочечные РНК, продуцируемые во время вирусной репликации, а также бактерии, микоплазмы и протозои, цитокины и ростовые.

Первоначальная защитная реакция неспецифического противобактериального иммунного ответа организма включает индукцию альфа- и бета-ИНФ. В этом случае он продуцируется антигенпрезентирующими клетками (макрофагами), захватившими бактерии.

Интерфероны **играют немаловажную роль** в неспецифическом звене противовирусного иммунного ответа. Они усиливают противовирусную резистентность, индуцируя в клетках синтез ферментов, подавляющих образование нуклеиновых кислот и белков вирусов. Кроме этого они оказывают иммуномодулирующее действие, усиливают в клетках экспрессию антигенов главного комплекса гистосовместимости.

Изменение содержания альфа-ИНФ выявлено при гепатитах и циррозах печени вирусной этиологии. В момент обострения вирусных инфекций концентрация этого цитокина значительно возрастает у большинства пациентов, а в период реконвалесценции падает до нормального уровня. Показана зависимость между сывороточным уровнем альфа-ИНФ и степенью тяжести и продолжительностью

**Повышение концентрации** альфа-ИНФ отмечают в сыворотке большинства пациентов, страдающих аутоиммунными заболеваниями, такими как полиартрит, ревматоидный артрит, спондилёз, псориатический артрит, ревматическая полимиалгия и склеродермия, системная красная волчанка и системный васкулит. Высокий уровень этого интерферона наблюдается также у отдельных больных в период обострения язвенной и желчнокаменной болезн.

**Диапазон в норме — до 45 пг/мл.**

**3. Самостоятельная работа.**

1. Изучите теоретический материал, и анализируя прочитанное выполните предложенные задания.

2. Заполните сравнительную таблицу:

Таблица 1 - Характеристика цитокинов.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Цитокин** | **Строение**  | **Продуценты**  | **Индукторы**  | **Биологическая роль**  | **Норма**  | **Патология**  |
| Фактор некроза опухолей |  |  |  |  |  |  |
| Гамма-интерферон |  |  |  |  |  |  |
| Интерлейкин-4 |  |  |  |  |  |  |
| Интерлейкин-8 |  |  |  |  |  |  |
| Рецепторный антагонист интерлейкина-1 |  |  |  |  |  |  |
| Альфа-интерферон |  |  |  |  |  |  |

Таблица 2 - Классификация цитокинов.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Тип классификации** | **Классы** | **Представители** |
| 1.Видовая классификация |  |  |
| 2.Функциональная классификация |  |  |
| 3.Классификация по строению |  |  |

Таблица 3 - Характеристика методов определения цитокинов

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Метод**  | **Сущность метода**  | **Объект определения** |
|  |  |  |

Таблица 4 - Характеристика проведения определения цитокинов с помощью наборов АО «Вектор-Бест»

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Определяемые интрлейкины | норма | Метод определения | Хромоген  | Количество биоматериала для анализа | Прибор учета результатов | Условия детекции |
|  |  |  |  |  |  |  |

**4. Итоговый контроль знаний.**

Тестирование.

**5. Подведение итогов.**

Итоговая оценка за занятие складывается из оценки за устный ответ, решения тестовых заданий, ситуационных задач, ведения рабочей тетради.

**6. Домашнее задание:** лекция №23,24,25

Самостоятельная работа: решение задач, тестовых заданий.

## Практическое занятие №17 Изучение активности ферментов антиперекисной защиты

**Значение темы**:

Образование АФК, известных как прооксиданты, наблюдается во многих метаболических процессах и является обязательным атрибутом нормальной аэробной жизни. Функционирование и развитие клеток, а так же организма в целом, в кислородсодержащем окружении не могло бы быть возможным без существования защитных систем, основу которых составляют ферментативные и неферментативные антиоксиданты.

Постоянное образование прооксидантов в живых организмах уравновешено их дезактивацией антиоксидантами, поэтому для поддержания гомеостаза необходима непрерывная регенерация антиоксидантной способности. Отсутствие или сбои этой непрерывности сопровождаются накоплением окислительных повреждений и приводят к возникновению окислительного стресса.

Основными функциями антиоксидантной системы являются: ограничение интенсивности реакции свободнорадикального и перекисного окисления; защита чувствительных к окислительным повреждениям биомолекул мембран, внутри - и внеклеточных структур от действия свободных радикалов и перекисных соединений; восстановление окислительных молекулярных поврежден]. В целом основная задача системы антиоксидантной защиты состоит в предотвращении и ограничении развития патологических состояний, вызываемых окислительными повреждениями структур организма

К числу энзимных антиоксидантов относят прежде всего супероксидредуктазу (СОР), восстанавливающую О2- в пероксид водорода, СОД, катализирующую реакцию дисмутации О2- с образованием пероксида водорода и молекулярного кислорода, каталазу, восстанавливающую Н2О2, глутатионзависимыепероксидазы и трансферазы (ГТ).

На основе теоретических знаний и практических умений обучающийся должен

**знать**: основные методики современных исследований молекулярной биологии, используемые в лабораторной диагностике.

**уметь:** применять основные методики современных исследований молекулярной биологии, используемые в лабораторной диагностике;

Студент должен овладеть **общими компетенциями**:

OK 1. Понимать сущность и социальную значимость своей будущей профессии, проявлять к ней устойчивый интерес.

ОК 2. Организовывать собственную деятельность, определять методы и способы выполнения профессиональных задач, оценивать их эффективность и качество.

ОК 13. Организовывать рабочее место с соблюдением требований охраны труда, производственной санитарии, инфекционной и противопожарной безопасности.

ПК 7.1. Готовить рабочее место и аппаратуру для проведения клинических лабораторных исследований.

ПК 7.2. Осуществлять высокотехнологичные клинические лабораторные исследования биологических материалов.

ПК 7.4. Дифференцировать результаты проведенных исследований с позиции «норма - патология».

ПК 7.5. Регистрировать результаты проведенных исследований.

**План изучения темы:**

**1.Контроль исходного уровня знаний.**

Ответьте на вопросы:

1. Стадии ПОЛ
2. Биологические последствия пероксидации липидов
3. Уровни регуляции скорости свободнорадикального окисления.
4. Классификации антиоксидантов по химической природе
5. Классификации антиоксидантов помолекулярной массе
6. Классификации антиоксидантов по растворимости

## 2. Содержание темы:

Общепринятой номенклатуры антиоксидантов в настоящее время нет.

**По химической природе**биоантиокислители представляют собой широкий класс соединений:

- ферменты (СОД, каталаза, глутатионпероксидаза (ГПО))

-фенолы и полифенолы (токоферолы, эвгенол)

- флавоноиды (рутин, кверцетин)

- стероидные гормоны

**В зависимости от растворимости различают:**

- жирорастворимые (витамин Е, А, К, убихинон)

- водорастворимые (витамин С, SH-содержащие соединения)

 **по молекулярной массе выделяют:**

 группу низкомолекулярных антиоксидантов (глутатион, α-токоферол, мочевая кислота);

- высокомолекулярных ( ферритин, каталаза).

**Антиокислительные ферменты**

Детоксикация АФК посредством ферментативных процессов возможна, если константа реакции с АФК при физиологических условиях достаточно низкая. Поэтому катализируемая ферментами детоксикация касается главным образом супероксида, пероксидов и эпоксидов, как более или менее «стабильных» восстановленных форм кислорода.

Ферментативные антиоксиданты характеризуются высокой специфичностью действия, направленной против определенных АФК, специфичностью клеточной и органоидной локализацией, использованием в качестве катализаторов металлов (Сu, Zn, Мn, Fе).

***Супероксиддисмутаза***(СОД; КФ 1.15.1.1) – один из ключевых ферментов антиоксидантной защиты. Она существенно ускоряет реакцию дисмутации супероксида с образованием пероксида водорода и молекулярного кислорода.

СОД имеет несколько изомерных форм, различающихся по первичной структуре, молекулярной массе и природе металлов, входящих в активный центр. Ее медь-цинковая форма (Сu-Zn-СОД; мол. м. 30-33 кД) содержится в цитозоле, межмембранном пространстве митохондрий, пероксисомах; Мn-СОД (мол. м. 75-94 кД) – в матриксе митохондрий, пероксисомах, обнаруживается также у бактерий; Fе-СОД (мол. м. 36-48 кДа), характерна для микроорганизмов, зафиксирована в пероксисомах и митохондрия. Фермент термостабилен и выдерживает нагревание при 100°С в течение 1 мин, а также устойчив к колебаниям рН в диапазоне от 2 до 12.

Механизм взаимодействия СОД с супероксидным радикалом:

Сначала одна молекула супероксида взаимодействует с активным центром фермента, при этом металл, входящий в активный центр, восстанавливается, а супероксидный радикал окисляется до молекулярного кислорода:

Cu2+ + O2**·**- → Cu+ + O2

Затем при участии второй молекулы супероксидного радикала происходит обратное окисление металла, при этом супероксид восстанавливается до пероксида водорода:

Cu+ +O2**·**- + 2H+ → Cu2+ + H2O2

***Каталаза***(КФ 1.11.1.6) – оксидоредуктаза с молекулярной массой около 250 кД. Это двухкомпонентный фермент, состоящий из белкаи соединенной с ним простетической группы, последняя содержит гематин. Установлено, что каталаза содержит 0,09% железа, т.е. 4 атома железа на 1 молекулу фермента. Оптимум действия каталазы при рН 6,5; в более кислых и щелочных средах активность уменьшается.

Каталаза катализирует дисмутаци: 2Н2О2→2Н2О+О2

Процесс осуществляется в 2 этапа:

Fе2+-каталаза + 2Н2О2 → окисленная каталаза;

окисленная каталаза + Н2О2 → Fе3+-каталаза + 2Н2О + О2.

Один фермент способен вызывать распад 6∙106 молекул пероксида водорода в секунду (Островская, 1953).

Каталаза локализована преимущественно в пероксисомах и глиокисомах, специфическая изоформа обнаружена также в митохондриях. В окисленном состоянии каталаза может работать и как пероксидаза, катализируя окисление спиртов или альдегидов. Биологическая роль каталазы тесным образом связана с нормальной функцией цитохромной системы.

***Пероксидазы***(КФ 1.11.1.7) – двухкомпонентный фермент класса оксидоредуктаз, состоящий из гематина С34Н32О4N4Fе(III)ОН (низкомолекулярного кофермента, содержащего железо) и апофермента (белковой частицы, составляющей основную часть фермента).

Гематин составляет 1,48% этого веса. По аминокислотному составу белок пероксидазы обнаруживает некоторые особенности: в нем отсутствуют триптофан и оксипролинГеминовая часть молекулы – железопротопорфирин IХ.

Пероксидаза – обширная группа ферментов, катализирующих реакции окисления органического и неорганического субстрата с использованием пероксида водорода или органических пероксидов в качестве акцепторов электронов:

2ХН + Н2О2 → 2Х + 2Н2О;

2ХН + ROOH → 2X + Н2О + ROH,

где ХН – восстановленный субстрат, Х – окисленный субстрат.

Пероксидаза может быть классифицирована в зависимости от биологических источников их получения либовзависимости от природы субстратов, на которые они действуют. К субстратам, окисляемым пероксидазой в присутствии перекиси, могут быть отнесены следующие соединения:

1) практически все фенолы (пирокатехин, пирогаллол, галловая кислота, бензидин, фенилендиамин, билирубин и др.);

2) ароматические амины (аланин, диметилаланин, паратоллуидин и др.);

3) йодистый водород;

4) легкоокисляемые вещества (аскорбиновая кислота, нитриты и др.)

Фермент представляет собойодно из звеньев цепи переноса электронов в митохондриальной альтернативной дыхательной цепи.

Ингибиторами пероксидазы могут служить все вещества, которые способны образовать с железом соединения, разрывающие хотя бы одну из связей в гемпротеиновом комплексе.

Антиоксидантную защиту, связанную с восстановлением пероксида водорода, осуществляют главным образом аскорбатпероксидаза и глутатионпероксидаза.

***Глутатионпероксидаза***(ГПО, КФ 1.11.1.9) – селенсодержащий фермент, локализованный в цитоплазме, плазмалемме и в матриксе митохондрий, утилизирует как органические, так и неорганические пероксиды свободных жирных кислот, нуклеотидов, нуклеиновых кислот, белков:

2ГSН + Н2О2 → ГSSГ + Н2О

2ГSН + RООН → 4ГSSГ + RОН + Н2О

Значение ***глутатионредуктазы***(ГР; КФ 1.6.4.2) заключается в сопряжении детоксикации пероксида с промежуточным редокс-метаболизмом при использовании НАДФН, восстанавливаяокисленныйглутатион:

ГSSГ + НАДФН+Н+ → 2ГSН + НАДФ+

Эта реакция уменьшает или даже предупреждает прогрессирование ПОЛ и окислительный распад нуклеиновых кислот и белков.

ГР – флавиновый фермент, обладающий высокой специфичностью к глутатиону, однако с низкой скоростью он может катализировать восстановление ряда других соединений, содержащих дисульфидную связь.

***Глутатионтрансфераза***(ГТ; КФ 2.5.1.18),- важнейшие антиоксиданты, обнаруженными у широкого ряда видов от растений до насекомых и млекопитающих,которые защищают от гидрофобных продуктов ПОЛ посредством их восстановления, присоединения молекулы ГSН или нуклеофильного замещения гидрофобных групп:

RООН + 2ГSН → RОН + ГSSГ + Н2О

Глутатионтрансферазы выполняют и другие функции в клетке: участвуют в реакциях изомеризации, играют центральную роль в детоксикацииксенобиотиков и различных токсичных молекул.. ГТ представлены целым семейством изоферментов, обычно активных в качестве димеров с молекулярной массой субъединиц 25-29 кДа. Охарактеризовано по крайней мере 6 изоформ ферментов. Глугатионтрансферазы локализованы преимущественно в цитозоле, после соединения с ГSН токсичные соединения экспортируются в вакуоль с помощью АТФ-зависимой помпы.

**3. Самостоятельная работа.**

1. Изучите теоретический материал, и, анализируя прочитанное, выполните предложенные задания.

2. Заполните таблицу:

Характеристика ферментов антиоксидантной защиты:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Антиоксидант (фермент)** | **номенклатура** | **строение** | **локализация** | **Катализируемая реакция** |
|  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |

**4. Итоговый контроль знаний.**

Тестирование.

**5. Подведение итогов.**

Итоговая оценка за занятие складывается из оценки за устный ответ, решения тестовых заданий, ситуационных задач, ведения рабочей тетради.

**6. Домашнее задание:** подготовка к зачетному занятию

Самостоятельная работа: решение тестовых заданий.

## Практическое занятие №18 Зачетное занятие

**Значение темы**:

Молекулярная биология использует широкий арсенал биологических, физических и химических методов, одни из которых достались ей «в наследство» от наук-предшественниц (биохимии, цитологии, генетики), а другие были созданы в процессе ее собственного развития специально для работы с молекулярными объектами.

Благодаря техническому прогрессу и научным изысканиям в области химии, физики, биологии и информатики современное оборудование позволяет выделять, изучать и изменять отдельные гены и процессы, в которые они вовлечены.

На основе теоретических знаний и практических умений обучающийся должен

**знать**: основные методики современных исследований молекулярной биологии, используемые в лабораторной диагностике.

**уметь:** применять основные методики современных исследований молекулярной биологии, используемые в лабораторной диагностике;

Студент должен овладеть **общими компетенциями**:

OK 1. Понимать сущность и социальную значимость своей будущей профессии, проявлять к ней устойчивый интерес.

ОК 2. Организовывать собственную деятельность, определять методы и способы выполнения профессиональных задач, оценивать их эффективность и качество.

ОК 3. Принимать решения в стандартных и нестандартных ситуациях и нести за них ответственность.

ПК 7.4. Дифференцировать результаты проведенных исследований с позиции норма - патология.

ПК 7.5. Регистрировать результаты проведенных исследований.

**План изучения темы**

**1.Контроль уровня знаний.**

Дифференцированный зачет проводится в комбинированной форме: тестирование в АСТ (каждый студент решает 50 ТЗ в АСТ) и индивидуальной беседы по билетам.

Всего 15 билетов. Билет включает одну ситуационную задачу. В ходе дифференцированного зачета можно пользоваться нормами лабораторных показателей. Использование каких-либо литературных источников не разрешается.

 Каждый студент получает один из 15 билетов. Время подготовки к ответу каждого студента - 45 минут, на ответ студенту отводится 3 - 5 минут. Решение ситуационных задач предполагает объяснение задания и формулировку ответа.

**2. Итоговый контроль знаний.**

Защита презентаций по темам:

- Генные мутации;

- Онкомаркеры.

- Наследственные болезни

- Иммуноферментный анализ;

- Радиоиммунный анализ;

-Метод иммуноблотинга.

- метод ПЦР

Итоговая оценка за занятие складывается из оценки за устный ответ, решения тестовых заданий, ситуационных задач, ведения рабочей тетради.

**3. Подведение итогов.** Выставление итоговых оценок за семестр.

## Рекомендуемая литература

**Основная литература**

|  |  |
| --- | --- |
|  | **Кол-во экземпляров** |
| № п/п | **Наименование, вид издания** | **Автор(-ы),составитель(-и),редактор(-ы)** | **Место издания, издательство, год** | **В библиотеке** | **На кафедре** |
| **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** |
| 1 | [Клиническая лабораторная диагностика](http://krasgmu.ru/index.php?page%5bcommon%5d=elib&cat=catalog&res_id=52966) [Электронный ресурс] : учеб. пособие для мед. сестер. - Режим доступа: http://www.medcollegelib.ru/book/ISBN9785970427620.html | А. А. Кишкун | М. : ГЭОТАР-Медиа, 2014. | ЭБС Консультант студента (Фармколледж) |  |
| 2 | [Медицинская лабораторная диагностика: программы и алгоритмы](http://krasgmu.ru/index.php?page%5bcommon%5d=elib&cat=catalog&res_id=61016) : рук. для врачей | ред. А. И. Карпищенко | М. : ГЭОТАР-Медиа, 2014. | 35 |  |

**Дополнительная литература**

|  |  |
| --- | --- |
|  | **Кол-во экземпляров** |
| № п/п | **Наименование, вид издания** | **Автор(-ы),составитель(-и),редактор(-ы)** | **Место издания, издательство, год** | **В библиотеке** | **На кафедре** |
| **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** |
| 1 | [Медицинская лабораторная диагностика: программы и алгоритмы](http://krasgmu.ru/index.php?page%5bcommon%5d=elib&cat=catalog&res_id=51187) [Электронный ресурс] : рук. для врачей. - Режим доступа: http://www.rosmedlib.ru/book/ISBN9785970429587.html | ред. А. И. Карпищенко | М. : ГЭОТАР-Медиа, 2014. | ЭМБ Консультант врача |  |
| 2 | [Руководство по лабораторным методам диагностики](http://krasgmu.ru/index.php?page%5bcommon%5d=elib&cat=catalog&res_id=52965) [Электронный ресурс]. - Режим доступа: http://www.medcollegelib.ru/book/ISBN9785970426593.html | А. А. Кишкун | М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. | ЭБС Консультант студента (Фармколледж) |  |

**Электронные ресурсы:**

ЭБС КрасГМУ «Colibris»;

ЭБС Консультант студента ВУЗ

ЭБС Консультант студента Колледж

ЭМБ Консультант врача

ЭБС Айбукс

ЭБС Букап

ЭБС Лань

ЭБС Юрайт

СПС КонсультантПлюс

НЭБ eLibrary