# Лекция №9

# БИОХИМИЯ КРОВИ

Кровь − жидкая ткань. Она представляет собой непрозрачную жид- кость красного цвета со слабощелочными свойствами (рН 7,3−7,5), своео- бразного запаха и солоноватого вкуса. Кровь состоит из плазмы (50−55%) и форменных элементов: эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов (45−50%). В состав крови входят: белки, жиры, углеводы, различные промежуточные и конечные продукты обмена, а также гормоны, витамины, минеральные соединения.

Основные функции крови заключаются в доставке молекулярного кисло- рода и питательных веществ к клеткам животного организма и освобождении тканей от углекислоты и конечных продуктов распада. Ткани организма весь- ма чувствительны к изменению состава крови, и даже небольшие изменения в соотношении ее составных частей отражаются на состоянии непрерывно протекающих обменных реакций организма. Всякие нарушения характера метаболических процессов в тканях отражаются на составе крови, поэтому определение количественного содержания ряда составных частей крови име- ет исключительно важное значение для оценки состояния организма.

## Техника получения сыворотки, плазмы и дефибринированной крови

#### Получение сыворотки крови

Для получения сыворотки кровь набирают обычно из яремной вены крупных животных в сухую стерильную пробирку. Следует следить за тем, чтобы кровь текла равномерно и не разбивалась о стенки пробирки. Затем кровь ставят в термостат при температуре 37 °С. Через 1 час ее переносят на холод. Для лучшего отделения сгустка крови от сыворотки необходимо обвести сгусток по краям пробирки стеклянной палочкой. Через 4−5 часов стояния на холоде сыворотка в виде прозрачной желтоватой жидкости отде- ляется от кровяного сгустка и может быть использована для исследования. Отстоявшаяся сыворотка отсасывается пипеткой.

97

Для более быстрого получения сыворотки свернувшуюся кровь цен- трифугируют при 2500−3000 об/мин. В этом случае кровь можно набирать сразу в центрифужную пробирку. Прозрачную сыворотку сливают в сухую стерильную посуду и хранят в холодильнике при +4−7 °С.

Свертывание крови − чрезвычайно сложный ферментативный процесс, в котором принимает участие ряд факторов. Исходным моментом является разрушение тромбоцитов и выделение тромбокиназы (тромбопластина). Под ее воздействием в присутствии ионов Са2+ плазменный белок протром- бин превращается в тромбин. Последний вызывает переход растворенного фибриногена в фибрин (в присутствии ионов Са2+), нити которого состав- ляют основу тромба. Через несколько часов сгусток фибрина сжимается (ретракция) и из него выдавливается сыворотка.

#### Получение плазмы крови

Плазма крови отличается от сыворотки наличием фибриногена. Для того чтобы получить плазму крови, нужно предупредить процесс ее сверты- вания. С этой целью к крови прибавляют различные вещества, нарушающие ту или иную фазу процесса свертывания. Чаще всего используемыми про- тивосвертывающими веществами являются щавелево-кислый натрий или калий, лимонно-кислый натрий, фтористый натрий, гепарин, гирудин и др.

Щавелево-кислые, лимонно-кислые и фтористые соли осаждают ионы кальция в виде нерастворимых солей. Гепарин − вещество, получаемое из печени, препятствует взаимодействию ионов кальция и протромбина и та- ким образом нарушает фазу образования активного фермента тромбина. Гирудин − вещество, вырабатываемое пиявками, тормозит действие тром- бина на фибриноген и тем самым нарушает последнюю фазу свертывания крови.

Для получения плазмы в пробирки предварительно вносят одно из про- тивосвертывающих средств (антикоагулянт). В расчете на 15−20 мл крови берут следующее количество антикоагулянта: 2−3 капли 1%-ного раствора гепарина или 3−4 капли трилона Б, 15−20 мг натрия лимоннокислого или щавелево-кислого. В бóльших количествах добавлять эти средства нель- зя, т.к. высокая их концентрация вызывает в крови различные изменения вплоть до гемолиза.

Цельную кровь, сыворотку и плазму можно длительное время хранить в холодильнике.

#### Получение дефибринированной крови

Вытекающую из сосуда кровь собирают в стакан и осторожно помеши- вают стеклянной палочкой, не касаясь при этом стенок стакана, чтобы не травмировать эритроциты и избежать гемолиза. Фибрин наматывается на па- лочку и удаляется вместе с последней. Дефибринирование крови можно про- извести с помощью другого метода. В стакан или колбу кладутся стеклянные

98

шарики (бусы), на которые и собирают кровь, вытекающую из кровеносного сосуда. В процессе взятия крови содержимое стакана (колбы) помешивают круговыми движениями, при этом фибрин оседает на шариках. Жидкую кровь сливают через двойной слой марли и центрифугируют. Форменные элементы крови оседают на дно, а сыворотка отсасывается пипеткой.

## Свертывание крови

#### Значение ионов кальция для свертывания крови

Для этой работы можно воспользоваться оксалатной кровью, плазмой и сывороткой. Щавелево-кислые соли препятствуют свертыванию крови, так как осаждают ионы кальция, необходимые для превращения протромбина в тромбин − фермент, вызывающий свертывание крови. Если появятся ионы кальция, то восстанавливается способность крови к свертыванию − выпа- дает фибрин.

**Ход работы**. Берут четыре пробирки. В пробирку № 1 помещают 2−3 мл оксалатной крови; в пробирку № 2 − столько же оксалатной крови и 5−6 капель 3%-ного хлористого кальция; в пробирку № 3 − столько же ок- салатной плазмы и 5−6 капель хлористого кальция; в пробирку № 4 − такое же количество сыворотки крови и 5−6 капель хлористого кальция.

Пробирки слегка встряхивают и ставят в водяную баню при 37 °С. Через 10−15 мин их вынимают и отмечают, где произошло свертывание. Результаты опыта заносят в следующую таблицу. Делают соответствующие выводы.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| № пробирки | Субстрат | Условия опыта |
| добавлено | температ. | результат опыта |
| 1 | Оксалатная кровь |  | 37° |  |
| 2 | Оксалатная кровь |  | 37° |  |
| 3 | Оксалатная плазма |  | 37° |  |
| 4 | Сыворотка |  | 37° |  |

#### Определение скорости свертывания крови

Скорость свертывания крови может изменяться при ряде заболеваний в связи с изменением ее состава. Поэтому определение скорости ее сверты- вания имеет большое практическое значение.

99

*Реактивы: этиловый спирт, диэтиловый эфир.*

**Ход работы.** Кровь берется из тщательно выстриженной и обезжирен- ной при помощи спирта и эфира поверхности уха животного. Взятую ка- плю крови помещают на часовое стекло, которое как можно быстрее ставят на водяную баню (30 °С). Время взятия крови регистрируют с помощью секундомера с точностью до секунды.

Через 1 мин в капле крови с помощью стеклянной палочки производят спиралеобразные движения, стремясь как бы захватить эту каплю. Затем палочку быстро извлекают из капли, обмывают и высушивают. Спустя 30 с операцию, описанную выше, вновь повторяют, и так до тех пор, пока на вы- тянутой из крови палочке не появятся ниточки фибрина. Это время и будет началом свертывания крови.

Отмечается время образования сплошного сгустка, что считается окон- чанием процесса свертывания крови.

## Электрофорез белков на бумаге

Белки сыворотки крови и отдельных тканей представлены набором специфических белков, гетерогенных по своему составу, строению и функ- циям. Для разделения этих белков на отдельные фракции используют раз- личные методы, в том числе и такой метод, как электрофорез на бумаге.

В основу этого метода положен следующий принцип. Каждый белок несет на себе свободный электрический заряд и может перемещаться с различной скоростью в электрическом поле. Величина электрического заряда является индивидуальной характеристикой каждого белка, но она зависит и от окружающей среды, в первую очередь от рН и ионной силы раствора.

Если полоску фильтровальной бумаги смочить буферным раствором и укрепить между полюсами электрического поля, после чего на нее нане- сти смесь белков и подключить источник электрического тока, то молекулы белка будут мигрировать по фильтровальной бумаге в сторону полюса, за- ряд которого противоположен заряду белка. Скорость миграции молекул белка пропорциональна величине их свободного заряда и градиенту потен- циала электрического поля.

Картина, полученная в результате разделения белков на бумаге, обычно выявляется при помощи красителей, специфически соединяющихся с бел- ками (кислый, сине-черный, бромфеноловый синий и др.).

*Приборы. Камера для электрофореза на бумаге. Источник постоянно- го тока силой до 20 мА и напряжением до 300 В. Электрофотоколориметр. Штатив с пробирками. Микропипетка. Сушильный шкаф. Кювета 25×30 см. Пинцет.*

100

*Реактивы. Хроматографическая бумага (полосы 3×26−30 см). Буфер- ные растворы: 1) вероналовый буфер рН 8,6 (10,32 г мединала растворяют в 300 мл дистиллированной воды, добавляют 1,84 г веронала и нагревают на водяной бане до полного растворения веронала, после чего объем рас- твора доводят дистиллированной водой до 1 л); 2) борно-боратный буфер рН 8,6 (5,57 г борной кислоты и 10,49 г буры растворяют в 700 мг дистил- лированной воды и доводят водой до 1 л); 3) трисбуфер рН 8,9 (80,5 г три- оксиметиламинометана, 6,02 г этилендиамино-четырехуксусной кислоты и 4,6 г борной кислоты растворяют в 1 л дистиллированной воды); 4) кра- ситель для обработки электропротеинограмм: а) кислый сине-черный краситель (0,2 г), ледяная уксусная кислота (100 мл), метиловый спирт (900 мл); б) бромфенол синий (0,5 г), сулема (10 г; ледяная уксусная кисло- та (20 мл), дистиллированная вода − 980 мл; в) бромфенол синий (0,1 г), серно-кислый цинк водный (50 г), ледяная уксусная кислота (50 мл), вода дистиллированная (900 мл); 5) растворы для отмывания избытка краски, не связавшейся с белком: а) уксусная кислота, 2%-ный раствор; б) уксус- ная кислота, 10%-ная с 4% расплавленного фенола; в) спирт этиловый, 50%-ный; 6) растворы для элюции краски: а) едкий натрий, 0,01 н раствор (для бромфенолового синего); б) едкий натр 0,1 н раствор (для кислого сине-черного).*

**Ход работы**. Электродные кюветы камеры заполняют буферным рас- твором и их отделения соединяют между собой кусочками фильтровальной бумаги. Смачивают полосы хроматографической бумаги в буфере и оста- ток буфера удаляют путем промокания между листами фильтровальной бумаги, после чего концы полос хроматографической бумаги опускают в противоположные электродные камеры. Укрепляют их при помощи грузи- ков в строго горизонтальном положении. Бумажные полосы можно уста- навливать также и сухими, которые затем должны пропитаться буферным раствором.

На установленные полосы хроматографической бумаги при помощи микропипетки наносят 0,01−0,03 мл сыворотки, отступив на 8−9 см от катодного конца полосы. После этого камеру герметически закрывают и подключают к источнику постоянного тока. Электрофорез осуществляется при градиенте потенциала от 3 до 8 В на 1 см полосы. При длине полос 26−30 см это составляет 180−200 В. Сила тока при этом не должна превы- шать 0,3 мА на каждый сантиметр поперечного разреза бумажной полосы. В зависимости от вида камеры, избранного буфера, вида и возраста живот- ного, от которого бралась сыворотка, электрофорез продолжается от 6−7 до 16−18 часов. Так, в камерах ЭФА-1 при использовании борно-боратного бу- фера электрофорез длится 6−8 часов. По окончании электрофореза полосы хроматографической бумаги извлекают из камеры и высушивают в сушиль-

101

ном шкафу 20 мин при 105 °С. После высушивания электропротеинограм- мы окрашивают, погружая их на 30 мин в бромфеноловый синий краситель с сулемой или на 8−20 ч в бромфеноловый синий с серно-кислым цинком. Избыток краски отмывают 2%-ным раствором уксусной кислоты, сменяя ее 4−5 раз. Для определения соотношения между фракциями белков по- лосу разрезают на отдельные участки по границам окрашенных участков, каждую фракцию помещают в отдельную пробирку и заливают раствором щелочи. Через 30 мин элюаты колориметрируют в электрофотоколориме- тре. Контролем при этом служит экстракт из неокрашенного участка спек- тропротеинограммы. Значения экстинций по каждой фракции суммируют и их сумму принимают за 100%, после чего вычисляют, какой процент со- ставляет каждая из фракций.