

КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ
И БИОЛОГИИ

Кафедра биохимии

**УЧЕБНО-ПРАКТИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ
К ЛАБОРАТОРНЫМ ЗАНЯТИЯМ ПО ТЕМЕ:**

«ВВЕДЕНИЕ В БИОХИМИЮ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ И ФИБРИНОЛИЗА»

Автор: профессор Р. И. Литвинов

Казань - 2013

ПРАВИЛА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С КРОВЬЮ

Биологические жидкости человека, в том числе кровь, могут содержать патогенные вирусы (ВИЧ, гепатит В, гепатит С) и, хотя вероятность заражения даже при порезе инфицированными инструментами ничтожно мала (<0,3%), необходимо помнить об этом и придерживаться следующих правил инфекционной безопасности.

- Правильно организовать рабочее место для обеспечения максимальной безопасности при работе с острыми инструментами, образцами крови, отработанным материалом.
- Все манипуляции с кровью и ее компонентами проводить в защитных перчатках, используя ручные полуавтоматические дозаторы.
- При наличии на коже рук микротравм или других повреждений перед началом работы заклеить повреждения лейкопластырем.
- Очень осторожно обращаться с острыми режущими и колющими инструментами.
- Утилизировать кровь, ее компоненты и все материалы после контакта с кровью в специальные биоконтейнеры.

Что делать в неотложной ситуации

Кровь попала в глаз

Сразу промыть глаза проточной водой, закапать антисептик (например, 1%-ный водный раствор борной кислоты) и тщательно промыть водой.

Кровь попала на неповрежденную кожу

Немедленно обработать кожу тампоном с антисептиком (например, хлоргексидином, 70%-ным этанолом и др.), промыть двукратно теплой проточной водой с мылом.

Кожа повреждена через перчатки

Немедленно обработать перчатки дезинфицирующим раствором или антисептиком, снять обе перчатки, обработать руки кожным антисептиком (70%-ным этанолом), выдавить кровь из ранки или дать стечь каплям крови, тщательно вымыть руки водой с мылом. Обработать рану 5% спиртовым раствором йода или другим антисептиком.

Кровь попала на одежду или обувь

Халат перед стиркой замочить в дезинфицирующем растворе на 1 час, пятно крови с личной одежды, обуви снять тампоном, пропитанным дезинфицирующим раствором или 70%-ным этанолом.

Занятие 1

ОСНОВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ КРОВИ И ИХ ПОЛУЧЕНИЕ

Кровь – это биологическая жидкость, состоящая примерно пополам из плазмы и взвешенных в ней клеток: эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов.

Плазма крови – это водный раствор белков, солей и низкомолекулярных органических соединений. Вода составляет примерно 90% массы плазмы, содержание белков – 6-8%. Сравнительно постоянная концентрация белков и солей определяет физиологическую ионную силу крови, а буферные системы крови фиксируют рН на уровне 7,36-7,44 и препятствуют его изменениям.

При контакте с чужеродной поверхностью кровь свертывается и образует желеобразный *сгусток*. Вскоре после образования сгусток начнет уменьшаться в объеме, сжиматься. Это процесс называется *ретракцией кровяного сгустка*. В процессе ретракции сгустка из него «отжимается» прозрачная желтоватая жидкость – *сыворотка крови*.

Чтобы предотвратить образование сгустка и получить жидкую цельную кровь, в момент взятия крови ее надо смешать с раствором вещества, которое препятствует свертыванию (коагуляции) крови. Такие вещества называются *антикоагулянтами* или *стабилизаторами крови*. Чаще всего в качестве стабилизатора крови используют цитрат натрия, антикоагулянтное действие которого основано на способности связывать ионы кальция, необходимые для свертывания крови. Жидкую кровь, смешанную с цитратом натрия, называют *цитратной кровью*. Чтобы вернуть стабилизированной крови свертываемость, нужно добавить ионы кальция, т.е. *рекальцифицировать* ее.

При стоянии цитратная кровь делится на две части: красный осадок из эритроцитов (с примесью белых лейкоцитов поверх осадка) и мутную желтоватую плазму крови, в которой взвешены более мелкие и легкие тромбоциты. Чтобы осадить тромбоциты, плазму крови нужно центрифугировать, силы тяжести для этого не достаточно.

Цельная кровь (стабилизированная или нестабилизированная), сыворотка крови, плазма крови (содержащая или не содержащая тромбоциты) – это основной материал, который используется в диагностических и научных лабораториях для биохимических и гематологических анализов, включая исследования гемостаза.

Оборудование и реагенты

- 0,124 М (3,2%-ный) водный раствор цитрата натрия
- 70%-ный этанол
- Стерильные шприцы на 5 мл или 10 мл с иглами (0,55-0,65 мм)
- Перчатки
- Мерные пробирки на 5 мл или 10 мл
- Сухие чистые стеклянные пробирки (10 x 75 мм)
- Ватные или марлевые тампоны
- Лейкопластырь
- Дозаторы на 100/200 мкл и 1 мл с наконечниками
- Пробирки центрифужные на 1-2 мл
- Центрифуга лабораторная
- Термостат или водяная баня на 37°C
- Емкость с окрашенной жидкостью, соединенная с пластиковой или резиновой трубкой диаметром 2-5 мм, которая заполнена этой жидкостью и плотно пережата с противоположного конца (модель кровеносного сосуда для имитации венепункции)

Описание лабораторных работ

1. Взятие (забор) венозной крови со стабилизатором (антикоагулянтом)

Подготовительная процедура:

- В шприц или мерную пробирку залить 1/10 объема стабилизатора (3,2%-ного цитрата натрия)

Ход работы:

- Кожа над местом прокола обрабатывается спиртом и высушивается. Кровь из локтевой вены желательнее брать широкой иглой и без наложения жгута, т. к. перетяжка конечности активизирует свертывание крови и искажает результаты исследования. Пункция вены должна быть по возможности малотравматичной. Первые 5-6 капель крови выпускаются на тампон и для исследования не берутся, т. к. в них может быть примесь тканевого фактора. Кровь либо насасывают в шприц, содержащий антикоагулянт, либо набирают «самотеком» в специальные мерные пробирки (вакутейнеры), тщательно и быстро перемешивая ее с антикоагулянтом осторожным покачиванием, без образования пены. Соотношение крови и стабилизатора 9:1 по объему. Если кровь берется шприцем, отсоединяют иглу и осторожно, по стенке выдавливают кровь в сухую чистую пробирку, которую несколько раз покачивают для полного смешивания крови и стабилизатора. Пробирку с цитратной кровью маркируют. Для исследования гемостаза кровь должна быть использована не позднее 3-х часов после взятия.

Примечания:

- Взятие крови – важнейший этап, от которого зависит достоверность результатов исследования. Кровь для исследования гемостаза берется натощак.
- Поскольку нет возможности взять кровь из вены непосредственно на занятии, то методика имитируется с использованием в качестве модели кровеносного сосуда пластиковой или резиновой трубки, заполненной окрашенной жидкостью вместо крови.

2. Получение плазмы, богатой тромбоцитами (PRP)

Ход работы:

- Цитратную кровь перенести в центрифужную пробирку и уравновесить на центрифужных весах.
- Центрифугировать при 200g 10 минут при комнатной температуре.
- Аккуратно, не взмучивая осадка, отсосать плазму и перенести в сухую чистую пробирку.
- Промаркировать пробирку – PRP (platelet-rich plasma).

Примечания:

- При нормальном гематокрите (40-45%) из 2 мл крови получается порядка 1 мл PRP.
- Если при отсасывании плазмы осадок эритроцитов был взмучен, повторить центрифугирование.

3. Получение плазмы, бедной тромбоцитами (PPP)

Ход работы:

- 0,5 мл PRP перенести в центрифужную пробирку и уравновесить на центрифужных весах.
- Центрифугировать при 2000g 10 минут при комнатной температуре.
- Аккуратно, не взмучивая осадка, отсосать плазму и перенести в сухую чистую пробирку.
- Промаркировать пробирку – PPP (platelet-poor plasma).

Примечания:

- При визуальном сравнении PPP прозрачная, т.к. содержит мало клеток, тогда как PRP мутная из-за большого количества тромбоцитов (нормальное содержание тромбоцитов в цельной крови 200 000-400 000/мкл, следовательно, в PRP их примерно в 2 раза больше).

4. Объединение («пулирование») и замораживание плазмы крови

Примечания:

- В отличие от цельной крови и PRP, которые всегда исследуются индивидуально, PPP, полученная от разных доноров, может быть объединена («пулирована» от слова pool - объединение) без риска иммунного повреждения и разрушения клеток.

- Объединенная плазма от нескольких доноров может быть разлита на порции (аликвоты) и заморожена.

- В зависимости от температуры замороженная плазма может храниться от нескольких недель (-20°C) до нескольких лет (-80°C) без видимых изменений коагуляционных параметров.

- Объединенная (не менее 10 доноров) замороженная PPP может использоваться в ряде лабораторных тестов как стандарт, т.к. имеет усредненный состав и стабильные характеристики.

Вопросы для обсуждения

1. Каков состав крови?
2. Как можно предотвратить свертывание крови?
3. Какие компоненты крови используются для биохимических и гематологических анализов?
4. Какие компоненты крови используются для исследования гемостаза?
5. Как можно восстановить свертываемость цитратной крови?
6. Как получить плазму, богатую и бедную тромбоцитами?
7. Как получить сыворотку крови?
8. Чем отличается плазма крови от сыворотки крови?
9. Какие компоненты крови можно пулировать, а какие исследуются индивидуально?
10. Какие компоненты крови можно, а какие нельзя замораживать и почему?

Занятие 2

ОБРАЗОВАНИЕ СГУСТКА. АНТИКОАГУЛЯНТЫ. ФИБРИНОЛИЗ

Оборудование и реагенты

- Цитратная плазма крови
- 5%-ный раствор хлорида кальция
- 1М раствор йодоацетамида
- 5М раствор мочевины
- Препарат тромбопластина
- Препарат стрептокиназы
- Раствор гепарина
- Тонкие стеклянные палочки
- Перчатки
- Сухие чистые стеклянные пробирки (10 x 75 мм)
- Дозаторы на 100/200 мкл и 1 мл с наконечниками

Описание лабораторных работ

1. Свертывание цитратной плазмы в отсутствие и в присутствии ингибитора фактора XIIIa

Принцип:

• В активном центре транслугутиназы находится сульфгидрильная группа, ее можно заблокировать алкилирующими агентами, например, йодацетамидом, который является необратимым ингибитором фактора XIIIa. Сгусток, полученный из плазмы крови в присутствии йодацетамида, не будет стабилизирован ковалентными связями.

Ход работы:

- В 2 пробирки наливают по 0,5 мл цитратной плазмы крови.
- В одну из них добавляют 0,05 мл 1М раствора йодацетамида и маркируют как не содержащую фактор XIII.
- В каждую пробирку добавляют по 0,1 мл 5%-ного хлорида кальция и 0,1 мл тромбопластина. Перемешивают стеклянной палочкой и оставляют вместе с палочкой на 15-20 минут.

• Намотать сгустки на стеклянные палочки.

Примечания:

• Сгустки формируются в обеих пробирках, т.к. отсутствие активности фактора XIIIa не препятствует превращению фибриногена в фибрин.

2. Растворимость «сшитого» и «несшитого» сгустков в мочевины или уксусной кислоте

Ход работы:

- В две пробирки налить по 1 мл 5М мочевины.
- В пробирки с мочевиной перенести по одному сгустку, образованному в отсутствие или в присутствии йодацетамида (см. работу 1).
- Периодически интенсивно встряхивать пробирки.
- Наблюдать растворение сгустка, образованного в присутствии йодацетамида, и нерастворимость сгустка из нормальной плазмы крови.

Примечание:

• Тот факт, что сгустки, образованные в отсутствие йодацетамида, не растворимы в мочевины, указывает на ковалентную прошивку фибрина фактором XIIIa. Сгустки, образованные в присутствии йодацетамида, т.е. при подавленной активности фактора XIIIa, в растворах мочевины деполимеризуются и растворяются, благодаря разрыву нековалентных связей между мономерами фибрина.

3. Фибринолиз сгустка под действием стрептокиназы

Принцип работы:

• При добавлении активатора пламиногена (стрептокиназы) происходит образование активного пламина, который расщепляет фибрин до растворимых фрагментов.

Ход работы:

- В пробирку наливают 0,5 мл цитратной плазмы крови, 0,2 мл раствора стрептокиназы, 0,1 мл 5% хлорида кальция и 0,1 мл тромбопластина.
- Наблюдают образование сгустка и его последующее растворение, т.е. переход из желеобразного в жидкое состояние..

Примечание:

• Этот опыт имитирует растворение тромба в процессе лечения стрептокиназой (тромболитическая терапия).

4. Влияние гепарина на время свертывания плазмы крови

Принцип:

• Гепарин – это широко применяемый в клинике антикоагулянт, который реализует свою активность через активацию антитромбина III. Обладая большим суммарным отрицательным зарядом (сульфо группы), он связывается с катионными участками антитромбина III, в результате чего антитромбин III меняет конформацию и начинает инактивировать сериновые протеазы - факторы свертывания IIa, IXa, Xa, XIa, и XIIIa.

Ход работы:

• Сделать ряд серийных 2-кратных разведений гепарина на физрастворе (0,85% хлорида натрия) из расчета 10, 5, 2,5 и 1,25 ЕД/мл. Для этого берут 4 пронумерованные пробирки, в 3 из которых (##2-4) наливают по 0,2 мл физраствора. В пустую (первую) пробирку наливают 0,4 мл гепарина, разбавленного физраствором до концентрации 10 ЕД/мл. Из этой пробирки отбирают 0,2 мл и переносят во вторую, содержащую 0,2 мл физраствора, тщательно перемешивают, т. е. разбавляют в 2 раза до 5 ЕД/мл. Отбирают 0,2 мл и переносят в третью пробирку, т.е. разбавляют еще в 2 раза до 2,5 ЕД/мл. Из третьей пробирки отбирают 0,2 мл и переносят в четвертую пробирку, т.е. разбавляют еще в 2 раза до 1,25 ЕД/мл.

- Внести в пять пустых пробирок по 0,2 мл цитратной плазмы.
- Добавить в четыре пробирки с плазмой по 0,1 мл соответствующего раствора гепарина, а в пятую – 0,1 мл физраствора.
- Добавить в первую пробирку 0,2 мл раствора тромбoplastина, включить секундомер и наблюдать свертывание, наклоняя пробирку каждые 3-4 секунды. В момент образования сгустка остановить секундомер и зафиксировать время свертывания.
- Прodelать то же самое с остальными четырьмя образцами плазмы с разной концентрацией гепарина, т.е. определить время свертывания для каждого из них.
- Рассчитать конечную концентрацию гепарина в образцах плазмы. Построить график зависимости скорости свертывания плазмы (величины, обратной времени свертывания – ось Y) от концентрации гепарина в плазме по пяти точкам.

Вопросы для обсуждения

1. Какова функция и механизм действия фактора XIIIa?
2. Чем отличается по структуре нестабилизированный и стабилизированный фибрин?
3. Какие свойства приобретает фибрин после воздействия фактора XIIIa?
4. Каковы последствия недостаточности фактора XIIIa?
5. Как можно получить нестабилизированный фибрин?
6. Что такое время свертывания крови и для чего оно используется?
7. Чем отличается время свертывания крови от времени кровотока?
8. Какие компоненты крови пригодны для определения времени свертывания?
9. Что такое протромбиновое время свертывания и от чего оно зависит?
10. Как влияет на свертывание крови гепарин? Для чего и как он применяется?
11. Что такое фибринолиз и каково его физиологическое значение?