



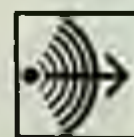
УЧЕБНИК ДЛЯ МЕДИЦИНСКИХ УЧИЛИЩ И КОЛЛЕДЖЕЙ

А.А. Кишкун  
Л.А. Беганская

# КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Том 2

2-е издание,  
переработанное и дополненное



ИЗДАТЕЛЬСКАЯ ГРУППА  
«ГЭОТАР-Медиа»

УЧЕБНИК ДЛЯ МЕДИЦИНСКИХ УЧИЛИЩ И КОЛЛЕДЖЕЙ

А.А. Кишкун, Л.А. Беганская

# **КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА**

В 3 томах

УЧЕБНИК ДЛЯ МЕДИЦИНСКИХ УЧИЛИЩ И КОЛЛЕДЖЕЙ

А.А. Кишкун, Л.А. Беганская

# КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Том 2

2-е издание, переработанное и дополненное

Рекомендовано в качестве учебника для студентов учреждений среднего профессионального образования, обучающихся по специальности 31.02.03 «Лабораторная диагностика» по ПМ.01 «Проведение лабораторных общеклинических исследований», ПМ.02 «Проведение лабораторных гематологических исследований», ПМ.03 «Проведение лабораторных биохимических исследований», ПМ.04 «Проведение лабораторных микробиологических и иммунологических исследований», ПМ.05 «Проведение лабораторных гистологических исследований», ПМ.06 «Проведение лабораторных санитарно-гигиенических исследований»



Москва  
ИЗДАТЕЛЬСКАЯ ГРУППА  
«ГЭОТАР-Медиа»  
2023

SamDTU  
axborot-resurs markaz

УДК 616-071(075.32)

ББК 53.45я723-1

К46

01-УЧБ-3575

**Авторы:**

*Кишкун Алексей Алексеевич* — д-р мед. наук, заслуженный врач РФ;

*Беганская Людмила Алексеевна* — канд. мед. наук, врач клинической лабораторной диагностики.

**Рецензент:**

*Шарапов Геннадий Николаевич* — д-р мед. наук, начальник Центра клинической лабораторной диагностики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр высоких медицинских технологий им. А.А. Вишневского» Минобороны России.

**Кишкун, А. А.**

**К46** Клиническая лабораторная диагностика : учебник : в 3 т. / А. А. Кишкун, Л. А. Беганская. — 2-е изд., перераб. и доп. — Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2023. — 624 с. : ил. — Т. 2. — DOI: 10.33029/9704-7342-9-CLD2-2023-1-624.

ISBN 978-5-9704-7342-9 (т. 2)

ISBN 978-5-9704-7340-5 (общ.)

Учебник подготовлен в соответствии с государственным образовательным стандартом среднего профессионального образования по специальности «Лабораторная диагностика». Основная цель данного учебника — дать будущему специалисту лаборатории системное представление о современной клинической лабораторной диагностике, ее методах, технологиях и их связях с клинической практикой. Во втором томе в доступной форме изложены основы паразитологических, цитологических, биохимических, иммунологических, серологических, гормональных и бактериологических исследований, а также исследований при проведении переливания крови. Достаточно подробно описаны устройство и принципы работы различных типов автоматических анализаторов.

Издание предназначено студентам медицинских колледжей, преподавателям специальности 31.02.03 «Лабораторная диагностика», интернам и клиническим ординаторам, обучающимся по специальности «Клиническая лабораторная диагностика», а также начинающим врачам и специалистам лабораторий.

УДК 616-071(075.32)

ББК 53.45я723-1

*Права на данное издание принадлежат ООО Издательская группа «ГЭОТАР-Медиа». Воспроизведение и распространение в каком бы то ни было виде части или целого издания не могут быть осуществлены без письменного разрешения ООО Издательская группа «ГЭОТАР-Медиа».*

© Кишкун А.А., Беганская Л.А., 2021

© ООО Издательская группа «ГЭОТАР-Медиа», 2023

© ООО Издательская группа «ГЭОТАР-Медиа»,  
оформление, 2023

ISBN 978-5-9704-7342-9 (т. 2)

ISBN 978-5-9704-7340-5 (общ.)

# ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений и условных обозначений .....	15
<b>Глава 10. Теория и практика лабораторных паразитологических исследований .....</b>	<b>18</b>
10.1. Протозойные заболевания .....	18
10.1.1. Малярия .....	19
10.1.1.1. Приготовление и окраска мазков крови «толстая капля» .....	24
10.1.1.2. Микроскопическое исследование «толстой капли» .....	27
10.1.2. Заболевания, вызываемые простейшими .....	28
10.1.2.1. Амебиаз .....	30
10.1.2.2. Лямблиоз .....	31
10.1.2.3. Балантидиаз .....	32
10.1.2.4. Методы обнаружения простейших в кале .....	33
10.1.2.4.1. Микроскопическое исследование нативного и окрашенного мазка кала .....	33
10.1.2.4.2. Метод формалин-эфирной седиментации .....	34
10.1.2.4.3. Метод седиментации с применением одноразовых концентраторов .....	35
10.1.2.4.4. Метод влажного мазка .....	37
10.1.3. Гельминтозы .....	37
10.1.3.1. Аскаридоз .....	39
10.1.3.2. Энтеробиоз .....	41
10.1.3.3. Методы обнаружения яиц гельминтов в кале .....	43
10.1.3.3.1. Микроскопическое исследование нативного мазка .....	44
10.1.3.3.2. Метод толстого мазка под целлофаном по Като .....	44
10.1.3.3.3. Метод исследования перианального отпечатка с применением липкой ленты по Грэхэму .....	45
10.1.3.3.4. Метод формалин-эфирной седиментации .....	45
10.1.3.3.5. Метод исследования кала с применением флотационных растворов .....	47
Контрольные вопросы и задания .....	48
<b>Глава 11. Теория и практика лабораторных цитологических исследований .....</b>	<b>49</b>
11.1. Общие принципы цитологической диагностики опухолей .....	49
11.2. Цитологическое исследование мазков из шейки матки .....	51
11.2.1. Анатомия и эпителий шейки матки .....	51
11.2.2. Рак шейки матки .....	54
11.2.3. Особенности взятия мазков из шейки матки .....	55
11.3. Цитологический анализ мокроты .....	59

11.4. Цитологический анализ мочи . . . . .	60
11.5. Аппараты, устройства и приспособления для приготовления и окраски мазков-препаратов для цитологических исследований. . . . .	61
11.5.1. Приготовление мазков . . . . .	62
11.5.2. Фиксация и окраска мазков . . . . .	65
Контрольные вопросы и задания. . . . .	72
<b>Глава 12. Теория и практика лабораторных биохимических исследований . . . . .</b>	<b>73</b>
12.1. Белки и белковые фракции . . . . .	73
12.1.1. Синтез и метаболизм белков . . . . .	74
12.1.2. Исследование общего белка . . . . .	77
12.1.3. Исследование альбумина . . . . .	78
12.1.4. Белковые фракции сыворотки крови (электрофорез белков). . . . .	79
12.1.5. Специфические белки . . . . .	84
12.1.6. С-реактивный белок . . . . .	88
12.2. Показатели азотистого обмена . . . . .	90
12.2.1. Мочевина и креатинин . . . . .	92
12.2.2. Регуляция почками уровня мочевины и креатинина в крови . . . . .	92
12.2.2.1. Причины изменения концентрации мочевины . . . . .	96
12.2.2.2. Причины изменения концентрации креатинина . . . . .	100
12.2.3. Клиренс эндогенного креатинина (проба Реберга—Тареева). . . . .	102
12.2.4. Мочевая кислота. . . . .	108
Контрольные вопросы и задания. . . . .	111
12.3. Методы исследования обмена белков . . . . .	112
12.3.1. Методы определения общего белка . . . . .	112
12.3.2. Методы определения альбумина . . . . .	114
12.3.3. Электрофоретические методы . . . . .	115
12.3.4. Методы определения специфических белков . . . . .	119
12.3.5. Методы определения мочевины . . . . .	120
12.3.6. Методы определения креатинина . . . . .	121
Контрольные вопросы и задания. . . . .	122
12.4. Глюкоза и метаболиты углеводного обмена . . . . .	122
12.4.1. Метаболизм глюкозы. . . . .	122
12.4.1.1. Основные механизмы поддержания нормального уровня глюкозы в крови . . . . .	125
12.4.1.2. Причины патологических изменений уровня глюкозы в крови . . . . .	130
12.4.1.2.1. Сахарный диабет . . . . .	131
12.4.1.2.2. Диагностика сахарного диабета . . . . .	133

12.4.1.2.3. Критерии диагностики сахарного диабета . . . . .	138
12.4.1.2.4. Гипогликемия . . . . .	142
12.4.1.2.5. Осложнения сахарного диабета и их мониторинг . . . . .	143
12.4.1.2.6. Мониторинг глюкозы в крови самим пациентом . . . . .	147
Контрольные вопросы и задания . . . . .	149
12.4.2. Методы определения концентрации глюкозы и метаболитов углеводного обмена . . . . .	150
12.4.2.1. Методы определения концентрации глюкозы. . . . .	150
12.4.2.2. Методы определения концентрации гликозилированного гемоглобина . . . . .	154
Контрольные вопросы и задания . . . . .	157
12.5. Холестерин, триглицериды и липопротеины . . . . .	157
12.5.1. Функции холестерина, триглицеридов и липопротеинов. . . . .	157
12.5.2. Транспорт холестерина и триглицеридов . . . . .	159
12.5.3. Рекомендуемые величины уровня холестерина и триглицеридов в крови. . . . .	161
12.5.4. Последствия повышения уровня холестерина и/или триглицеридов в крови. . . . .	163
12.5.5. Причины повышения уровня холестерина и/или триглицеридов в крови. . . . .	166
12.5.6. Методы определения уровня холестерина и триглицеридов . . . . .	167
12.5.6.1. Методы определения холестерина. . . . .	167
12.5.6.2. Методы определения триглицеридов . . . . .	168
Контрольные вопросы и задания . . . . .	170
12.6. Исследование ферментов . . . . .	170
12.6.1. Структура и функции ферментов . . . . .	171
12.6.2. Клиническое значение определения активности ферментов . . . . .	172
12.6.3. Методы определения активности ферментов . . . . .	174
12.6.3.1. Конечноточечные методы . . . . .	176
12.6.3.2. Кинетические методы . . . . .	177
12.6.3.3. Методы определения концентрации продукта реакции или субстрата. . . . .	179
12.6.3.4. Способы расчета активности ферментов . . . . .	181
Контрольные вопросы и задания . . . . .	182
12.6.4. Маркеры повреждения поджелудочной железы . . . . .	182
12.6.4.1. Структура и функции поджелудочной железы . . . . .	183
12.6.4.2. Ферменты поджелудочной железы . . . . .	186
12.6.4.2.1. $\alpha$ -Амилаза . . . . .	187
12.6.4.2.2. Липаза . . . . .	187

12.6.4.3. Причины и клиническое значение повышения уровня ферментов поджелудочной железы . . . . .	188
Контрольные вопросы и задания . . . . .	192
12.6.5. Маркеры повреждения миокарда . . . . .	192
12.6.5.1. Аспартатаминотрансфераза . . . . .	193
12.6.5.2. Креатинкиназа. . . . .	193
12.6.5.3. Лактатдегидрогеназа. . . . .	194
12.6.5.4. Миоглобин. . . . .	195
12.6.5.5. Тропонины. . . . .	195
12.6.5.6. Динамика изменений миокардиальных маркеров при инфаркте миокарда . . . . .	196
12.6.5.7. Роль миокардиальных маркеров в диагностике инфаркта миокарда . . . . .	199
12.6.5.8. Изменения активности ферментов при других заболеваниях. . . . .	201
Контрольные вопросы . . . . .	203
12.7. Маркеры нарушений функций печени (функциональные пробы печени) . . . . .	204
12.7.1. Функции печени. . . . .	204
12.7.2. Билирубин . . . . .	206
12.7.2.1. Методы определения билирубина . . . . .	209
12.7.3. Альбумин . . . . .	214
12.7.4. Гамма-глутамилтраспептидаза, аланинаминотрансфераза и щелочная фосфатаза . . . . .	214
12.7.5. Причины изменения концентрации билирубина в крови . . . . .	216
12.7.6. Причины изменения концентрации альбумина в крови . . . . .	219
12.7.7. Причины изменения активности ферментов в крови . . . . .	219
Контрольные вопросы и задания. . . . .	224
12.8. Исследование водно-электролитного баланса . . . . .	227
12.8.1. Баланс воды в организме. . . . .	227
12.8.2. Регуляция обмена воды и натрия . . . . .	232
12.8.3. Регуляция обмена натрия . . . . .	235
12.8.4. Взаимосвязь гомеостаза натрия и воды . . . . .	239
12.8.5. Исследование водного баланса . . . . .	239
12.8.6. Синдромы нарушений водного гомеостаза . . . . .	241
12.8.6.1. Синдромы дегидратации . . . . .	242
12.8.6.2. Синдромы гипергидратации . . . . .	244
Контрольные вопросы и задания . . . . .	245
12.8.7. Синдромы нарушений электролитного гомеостаза . . . . .	246
12.8.7.1. Гомеостаз натрия . . . . .	246



12.8.7.1.1. Гипонатриемия	248
12.8.7.1.2. Гипернатриемия	250
Контрольные вопросы и задания	252
12.8.8. Гомеостаз калия	252
12.8.8.1. Гипокалиемия	253
12.8.8.2. Гиперкалиемия	255
Контрольные вопросы и задания	257
12.8.9. Гомеостаз кальция	257
12.8.9.1. Гипокальциемия	260
12.8.9.2. Гиперкальциемия	262
12.8.10. Методы определения электролитов	263
Контрольные вопросы и задания	268
12.8.11. Кислотно-основное состояние	268
12.8.11.1. Газы крови	269
12.8.11.2. Регуляция кислотно-основного состояния	271
12.8.11.3. Показатели кислотно-основного состояния	280
12.8.11.4. Формы нарушений кислотно-основного состояния	281
12.8.11.4.1. Дыхательный (респираторный) ацидоз	282
12.8.11.4.2. Дыхательный (респираторный) алкалоз	283
12.8.11.4.3. Метаболический ацидоз	283
12.8.11.4.4. Метаболический алкалоз	284
Контрольные вопросы и задания	285
12.8.11.5. Анализаторы кислотно-основного состояния	285
12.9. Исследование обмена железа и витаминов	294
12.9.1. Обмен железа	295
12.9.2. Лабораторные показатели, характеризующие обмен железа	298
12.9.2.1. Концентрация железа в сыворотке крови	298
12.9.2.2. Общая железосвязывающая способность сыворотки	299
12.9.2.3. Трансферрин в сыворотке	300
12.9.2.4. Ферритин в сыворотке	301
12.9.3. Состояния, связанные с недостатком и избытком железа в организме	302
12.9.3.1. Железодефицитная анемия	303
12.9.3.2. Анемия при хронических заболеваниях	305
12.9.3.3. Избыточное накопление железа	306
12.9.4. Функции и метаболизм витамина В <sub>12</sub> и фолиевой кислоты	308
12.9.5. Состояния, связанные с недостаточностью витамина В <sub>12</sub> и фолиевой кислоты в организме	310
12.9.5.1. Мегалобластная анемия	311

12.9.6. Методы определения железа и витаминов. . . . .	314
12.9.6.1. Методы определения железа. . . . .	314
12.9.6.2. Методы определения трансферрина и ферритина . . . . .	316
12.9.6.3. Методы определения витамина В <sub>12</sub> и фолиевой кислоты . . . . .	317
Контрольные вопросы и задания . . . . .	317
12.10. Биохимические анализаторы . . . . .	318
12.10.1. Типы биохимических анализаторов . . . . .	318
12.10.2. Устройство автоматических биохимических анализаторов . . . . .	321
12.10.3. Калибровка биохимических анализаторов . . . . .	328
Контрольные вопросы и задания. . . . .	330
<b>Глава 13. Исследование системы гемостаза . . . . .</b>	<b>331</b>
13.1. Компоненты системы свертывания крови . . . . .	331
13.1.1. Сосудисто-тромбоцитарный гемостаз . . . . .	333
13.1.2. Плазменный (коагуляционный) гемостаз . . . . .	334
13.2. Лабораторные тесты, используемые для оценки свертывающей системы крови . . . . .	338
13.2.1. Тесты, характеризующие сосудистый компонент гемостаза . . . . .	339
13.2.2. Тесты, характеризующие тромбоцитарный компонент гемостаза . . . . .	339
13.2.3. Тесты, используемые для оценки коагуляционного гемостаза . . . . .	341
13.2.3.1. Время свертывания крови . . . . .	342
13.2.3.2. Протромбиновое время . . . . .	343
13.2.3.3. Активированное частичное тромбопластиновое время . . . . .	345
13.2.3.4. Тромбиновое время . . . . .	346
13.2.3.5. Фибриноген . . . . .	346
13.3. Тесты для диагностики тромбозов глубоких вен и тромбоэмболии легочной артерии . . . . .	347
13.4. Тесты для контроля антикоагулянтной терапии . . . . .	349
13.4.1. Прямые антикоагулянты (гепаринотерапия) . . . . .	349
13.4.2. Непрямые антикоагулянты, протромбиновое время, международное нормализованное отношение . . . . .	350
13.5. Практические аспекты коагулологии. . . . .	351
13.5.1. Методы исследования системы гемостаза . . . . .	352
13.5.2. Коагулометры . . . . .	356
13.5.2.1. Классификация коагулометров по принципу действия . . . . .	357

13.5.2.2. Классификация коагулометров по уровню автоматизации .....	360
Контрольные вопросы и задания .....	363
<b>Глава 14. Иммунологические исследования .....</b>	<b>364</b>
14.1. Общие представления о структуре и функции иммунной системы .....	364
14.1.1. Клеточные факторы иммунитета .....	368
14.1.2. Гуморальные факторы иммунитета .....	370
14.1.3. Фагоцитоз и другие механизмы неспецифической защиты .....	372
14.2. Алгоритм иммунного ответа организма .....	373
14.3. Проточная цитофлуориметрия .....	378
14.4. Клиническое значение иммунологических исследований ..	381
14.4.1. Лабораторные показатели, используемые для оценки иммунного статуса .....	381
14.4.1.1. Лабораторные показатели клеточного иммунитета .....	382
14.4.1.2. Лабораторные показатели гуморального иммунитета .....	385
14.4.1.3. Лабораторные показатели для оценки неспецифической защиты .....	388
14.4.2. Оценка результатов исследования иммунного статуса .....	389
14.5. Основные лабораторные исследования, используемые для диагностики ревматических заболеваний .....	391
14.5.1. Клетки красной волчанки (LE-клетки) крови .....	393
14.5.2. Ревматоидный фактор .....	394
14.5.3. Антистрептолизин-О .....	395
14.5.4. Антинуклеарный фактор .....	396
Контрольные вопросы и задания .....	397
14.6. Исследование опухолевых маркеров .....	397
14.6.1. $\alpha$ -Фетопротейн .....	400
14.6.2. Раково-эмбриональный антиген .....	401
14.6.3. Раковый антиген СА-125 .....	402
14.6.4. Простатический специфический антиген .....	403
Контрольные вопросы и задания .....	404
<b>Глава 15. Исследования при проведении операции переливания крови .....</b>	<b>405</b>
15.1. Антигены эритроцитов и группы крови .....	406
15.1.1. Группы крови АВ0 .....	406
15.1.2. Антигены эритроцитов системы резус (резус-фактора) .....	407

15.1.3. Антигены системы Келл . . . . .	408
15.1.4. Другие, менее значимые антигены эритроцитов . . . . .	409
15.2. Антитела к антигенам эритроцитов . . . . .	409
15.3. Определение группы крови, резус-фактора, титра антител и совместимости крови донора и реципиента . . . . .	411
15.3.1. Методы исследования в иммуногематологии . . . . .	413
15.3.2. Современные технологии в иммуногематологии . . . . .	415
15.4. Осложнения после гемотрансфузий . . . . .	418
15.4.1. Иммунные гемолитические трансфузионные реакции . . . . .	419
15.4.2. Другие трансфузионные реакции . . . . .	421
15.5. Гемолитическая болезнь новорожденных . . . . .	422
Контрольные вопросы и задания . . . . .	424
<b>Глава 16. Теория и практика лабораторных серологических исследований . . . . .</b>	<b>425</b>
16.1. Серологические методы диагностики . . . . .	429
16.2. Диагностика сифилиса . . . . .	438
16.3. Диагностика ВИЧ-инфекции . . . . .	442
16.4. Диагностика вирусных гепатитов . . . . .	446
16.4.1. Вирусный гепатит А . . . . .	446
16.4.2. Вирусный гепатит В . . . . .	447
16.4.3. Вирусный гепатит С . . . . .	452
16.4.4. Вирусный гепатит D . . . . .	455
16.4.5. Вирусный гепатит E . . . . .	455
16.4.6. Вирусный гепатит G . . . . .	457
16.5. Серологическая диагностика перинатальных инфекций . . . . .	457
16.6. Полимеразная цепная реакция в диагностике инфекционных заболеваний . . . . .	459
16.6.1. Обнаружение вируса гепатита С . . . . .	460
16.6.2. Обнаружение вируса гепатита В . . . . .	461
16.6.3. Обнаружение ВИЧ . . . . .	462
Контрольные вопросы и задания . . . . .	463
<b>Глава 17. Гормональные исследования . . . . .</b>	<b>464</b>
17.1. Функционирование эндокринной системы . . . . .	464
17.2. Гормоны гипоталамуса и гипофиза . . . . .	467
17.3. Нарушение секреции гормонов гипоталамуса и гипофиза . . . . .	468
17.4. Функциональное состояние щитовидной железы . . . . .	471
17.4.1. Биосинтез гормонов щитовидной железы . . . . .	471
17.4.2. Метаболические эффекты гормонов щитовидной железы . . . . .	473
17.4.3. Регуляция функции щитовидной железы . . . . .	474

17.4.4. Причины нарушений функции щитовидной железы . . .	476
17.4.5. Оценка функционального состояния щитовидной железы. . . . .	477
17.4.5.1. Эутиреоидный (нетоксический) зоб . . . . .	478
17.4.5.2. Гипертиреоз (тиреотоксикоз) . . . . .	479
17.4.5.3. Гипотиреоз . . . . .	481
17.5. Функциональное состояние надпочечников . . . . .	484
17.5.1. Биосинтез гормонов надпочечников . . . . .	485
17.5.2. Метаболические эффекты гормонов надпочечников . . .	486
17.5.4. Регуляция функции надпочечников . . . . .	487
17.5.5. Причины нарушений функции надпочечников . . . . .	488
17.5.5.1. Болезнь Иценко—Кушинга . . . . .	489
17.5.5.2. Недостаточность коры надпочечников . . . . .	490
17.5.5.3. Аденогенитальный синдром . . . . .	492
17.6. Функциональное состояние репродуктивной системы . . . . .	493
17.6.1. Гормоны репродуктивной системы . . . . .	494
17.6.1.1. Гонадотропин-рилизинг гормон и гонадотропины . . . . .	494
17.6.1.2. Половые стероиды . . . . .	498
17.6.2. Гормональная регуляция менструального цикла . . . . .	504
17.6.3. Гормональная регуляция сперматогенеза . . . . .	505
17.6.4. Причины нарушения репродуктивной функции у женщин . . . . .	506
17.6.5. Климактерический синдром . . . . .	511
17.6.6. Причины нарушения репродуктивной функции у мужчин . . . . .	512
17.7. Иммунохимические анализаторы . . . . .	514
<b>Глава 18. Теория и практика бактериологических исследований . . . . .</b>	<b>522</b>
18.1. Посев крови (гемокультура) . . . . .	524
18.1.1. Сепсис . . . . .	525
18.1.1.1. Этиология сепсиса . . . . .	527
18.1.1.2. Бактериологическая диагностика сепсиса . . . . .	528
18.1.1.3. Оценка результатов бактериологического исследования крови . . . . .	531
18.2. Бактериологическое исследование мочи . . . . .	532
18.2.1. Строение и функционирование мочевой системы . . . . .	532
18.2.2. Инфекции мочевыводящих путей . . . . .	534
18.2.3. Оценка результатов бактериологического исследования мочи . . . . .	536
18.3. Бактериологическое исследование кала при кишечных инфекциях . . . . .	539
18.3.1. Сальмонеллезная инфекция . . . . .	540
18.3.2. Дисбактериоз кишечника . . . . .	541

15.1.3. Антигены системы Келл . . . . .	408
15.1.4. Другие, менее значимые антигены эритроцитов . . . . .	409
15.2. Антитела к антигенам эритроцитов . . . . .	409
15.3. Определение группы крови, резус-фактора, титра антител и совместимости крови донора и реципиента . . . . .	411
15.3.1. Методы исследования в иммуногематологии . . . . .	413
15.3.2. Современные технологии в иммуногематологии . . . . .	415
15.4. Осложнения после гемотрансфузий . . . . .	418
15.4.1. Иммунные гемолитические трансфузионные реакции . . . . .	419
15.4.2. Другие трансфузионные реакции . . . . .	421
15.5. Гемолитическая болезнь новорожденных . . . . .	422
Контрольные вопросы и задания . . . . .	424
<b>Глава 16. Теория и практика лабораторных серологических исследований . . . . .</b>	<b>425</b>
16.1. Серологические методы диагностики . . . . .	429
16.2. Диагностика сифилиса . . . . .	438
16.3. Диагностика ВИЧ-инфекции . . . . .	442
16.4. Диагностика вирусных гепатитов . . . . .	446
16.4.1. Вирусный гепатит А . . . . .	446
16.4.2. Вирусный гепатит В . . . . .	447
16.4.3. Вирусный гепатит С . . . . .	452
16.4.4. Вирусный гепатит D . . . . .	455
16.4.5. Вирусный гепатит E . . . . .	455
16.4.6. Вирусный гепатит G . . . . .	457
16.5. Серологическая диагностика перинатальных инфекций . . . . .	457
16.6. Полимеразная цепная реакция в диагностике инфекционных заболеваний . . . . .	459
16.6.1. Обнаружение вируса гепатита С . . . . .	460
16.6.2. Обнаружение вируса гепатита В . . . . .	461
16.6.3. Обнаружение ВИЧ . . . . .	462
Контрольные вопросы и задания . . . . .	463
<b>Глава 17. Гормональные исследования . . . . .</b>	<b>464</b>
17.1. Функционирование эндокринной системы . . . . .	464
17.2. Гормоны гипоталамуса и гипофиза . . . . .	467
17.3. Нарушение секреции гормонов гипоталамуса и гипофиза . . . . .	468
17.4. Функциональное состояние щитовидной железы . . . . .	471
17.4.1. Биосинтез гормонов щитовидной железы . . . . .	471
17.4.2. Метаболические эффекты гормонов щитовидной железы . . . . .	473
17.4.3. Регуляция функции щитовидной железы . . . . .	474

17.4.4. Причины нарушений функции щитовидной железы . . .	476
17.4.5. Оценка функционального состояния щитовидной железы. . . . .	477
17.4.5.1. Эутиреоидный (нетоксический) зоб . . . . .	478
17.4.5.2. Гипертиреоз (тиреотоксикоз) . . . . .	479
17.4.5.3. Гипотиреоз . . . . .	481
17.5. Функциональное состояние надпочечников . . . . .	484
17.5.1. Биосинтез гормонов надпочечников . . . . .	485
17.5.2. Метаболические эффекты гормонов надпочечников . . .	486
17.5.4. Регуляция функции надпочечников . . . . .	487
17.5.5. Причины нарушений функции надпочечников . . . . .	488
17.5.5.1. Болезнь Иценко—Кушинга . . . . .	489
17.5.5.2. Недостаточность коры надпочечников . . . . .	490
17.5.5.3. Адреногенитальный синдром . . . . .	492
17.6. Функциональное состояние репродуктивной системы . . . . .	493
17.6.1. Гормоны репродуктивной системы . . . . .	494
17.6.1.1. Гонадотропин-рилизинг гормон и гонадотропины . . . . .	494
17.6.1.2. Половые стероиды . . . . .	498
17.6.2. Гормональная регуляция менструального цикла . . . . .	504
17.6.3. Гормональная регуляция сперматогенеза . . . . .	505
17.6.4. Причины нарушения репродуктивной функции у женщин . . . . .	506
17.6.5. Климактерический синдром . . . . .	511
17.6.6. Причины нарушения репродуктивной функции у мужчин . . . . .	512
17.7. Иммунохимические анализаторы . . . . .	514
<b>Глава 18. Теория и практика бактериологических исследований . . . . .</b>	<b>522</b>
18.1. Посев крови (гемокультура) . . . . .	524
18.1.1. Сепсис . . . . .	525
18.1.1.1. Этиология сепсиса . . . . .	527
18.1.1.2. Бактериологическая диагностика сепсиса . . . . .	528
18.1.1.3. Оценка результатов бактериологического исследования крови . . . . .	531
18.2. Бактериологическое исследование мочи . . . . .	532
18.2.1. Строение и функционирование мочевой системы . . . . .	532
18.2.2. Инфекции мочевыводящих путей . . . . .	534
18.2.3. Оценка результатов бактериологического исследования мочи . . . . .	536
18.3. Бактериологическое исследование кала при кишечных инфекциях . . . . .	539
18.3.1. Сальмонеллезная инфекция . . . . .	540
18.3.2. Дисбактериоз кишечника . . . . .	541

18.4. Бактериологическое исследование отделяемого женских половых органов . . . . .	544
18.4.1. Нормальная микрофлора влагалища и шейки матки . . .	544
18.4.2. Воспалительные заболевания влагалища и шейки матки. . . . .	547
18.4.3. Особенности взятия отделяемого женских половых органов для бактериологического исследования . . . . .	550
18.5. Бактериологическое исследование мокроты . . . . .	551
Контрольные вопросы и задания . . . . .	553
18.6. Практические аспекты бактериологических исследований . . . . .	554
18.6.1. Приготовление, фиксация и окраска мазков-препаратов для бактериоскопии . . . . .	554
18.6.1.1. Приготовление препаратов и мазков . . . . .	555
18.6.1.2. Фиксация мазков . . . . .	558
18.6.1.3. Окраска мазков . . . . .	559
18.6.1.3.1. Окраска мазков по Граму. . . . .	560
18.6.1.3.2. Окраска мазков по Цилю—Нильсену. . . . .	562
18.6.1.3.3. Аппараты, устройства и приспособления для окраски мазков . . . . .	565
18.6.2. Микроскопическое исследование мазка . . . . .	566
18.6.3. Посев и культивирование микроорганизмов . . . . .	569
18.6.3.1. Техника проведения посевов . . . . .	570
18.6.3.2. Культивирование . . . . .	578
18.6.4. Идентификация . . . . .	579
18.6.4.1. Культуральная идентификация . . . . .	581
18.6.4.2. Биохимическая идентификация. . . . .	585
18.6.4.3. Масс-спектрометрическая идентификация. . . . .	591
18.6.4.4. Оценка результатов исследования . . . . .	592
18.6.5. Определение чувствительности к антибактериальным лекарственным средствам . . . . .	593
18.6.6. Бактериологические анализаторы. . . . .	597
18.6.6.1. Анализаторы для исследования крови на стерильность . . . . .	597
18.6.6.2. Анализаторы для идентификации и определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам . . . . .	600
Контрольные вопросы и задания . . . . .	606
Рекомендуемая литература . . . . .	608
Предметный указатель . . . . .	609



# СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- торговое название лекарственного средства и/или фармацевтическая субстанция
- лекарственное средство не зарегистрировано в Российской Федерации
- АБС — антибактериальные лекарственные средства
- АД — артериальное давление
- АДГ — антидиуретический гормон
- АДФ — аденозиндифосфат
- АКТГ — адренокортикотропный гормон
- АЛТ — аланинаминотрансфераза
- АНП — атриальный натрийуретический пептид
- АСЛО — антитела против стрептококкового гемолизина-О
- АСТ — аспартатаминотрансфераза
- АТФ — аденозинтрифосфорная кислота, аденозинтрифосфат
- АФП —  $\alpha$ -фетопротеин
- АЧТВ — активированное частичное тромбопластиновое время
- ВГD — вирус гепатита D
- ВГС — вирус гепатита С
- ВИЧ — вирус иммунодефицита человека
- ВКК — внутрилабораторный контроль качества
- ВОЗ — Всемирная организация здравоохранения
- ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография
- ГГТП — гамма-глутамилтраспептидаза
- ГРГ — гонадотропин-рилизинг гормон
- ДВС — диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови
- ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИБС — ишемическая болезнь сердца
- ИМ — инфаркт миокарда
- КДЛ — клинико-диагностическая лаборатория
- КК — креатинкиназа
- КОЕ — колониеобразующие единицы
- КОС — кислотно-основное состояние
- КРГ — кортикотропин-рилизинг гормон
- ЛГ — лютеинизирующий гормон
- ЛДГ — лактатдегидрогеназа
- ЛИС — лабораторная информационная система
- ЛПВП — липопротеины высокой плотности
- ЛПНП — липопротеины низкой плотности

ЛПОНП	— липопротеины очень низкой плотности
ЛПУ	— лечебно-профилактическое учреждение
МИЧ	— международный индекс чувствительности
МНО	— международное нормализованное отношение
МПА	— мясопептонный агар
МПК	— минимальная подавляющая концентрация
м-РНК	— матричная рибонуклеиновая кислота
НАДН	— никотинамидадениндинуклеотид
НАДФ	— никотинамидадениндинуклеотидфосфат
НЖСС	— ненасыщенная железосвязывающая способность сыворотки
ОЖСС	— общая железосвязывающая способность сыворотки
ОПН	— острая почечная недостаточность
ОЦК	— объем циркулирующей крови
ПБА	— патогенные биологические агенты
ПВ	— протромбиновое время
ПСА	— простатический специфический антиген
ПТГ	— паратиреоидный гормон
ПЦР	— полимеразная цепная реакция
РМП	— реакция микропреципитации
РНК	— рибонуклеиновая кислота
РПГА	— реакция пассивной гемагглютинации
РЭА	— раково-эмбриональный антиген
СИ	— Международная система единиц
СКФ	— скорость клубочковой фильтрации
СМЖ	— спинномозговая жидкость
СОЭ	— скорость оседания эритроцитов
СПИД	— синдром приобретенного иммунодефицита
СРБ	— С-реактивный белок
СТГ	— соматотропный гормон
ТРГ	— тиреотропин-рилизинг гормон
ТТГ	— тиреотропный гормон
УФ	— ультрафиолет
ФСВОК	— Федеральная система внешней оценки качества
ФСГ	— фолликулостимулирующий гормон
ФЭК	— фотоэлектроколориметр
ЦИК	— циркулирующие иммунные комплексы
ЦНС	— центральная нервная система
ч.д.а.	— чистые для анализа
ЭДТА	— этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭКГ	— электрокардиография

- BE (Base Excess) — сдвиг буферных оснований  
MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) — матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация  
MCH (mean corpuscular hemoglobin) — среднее содержание гемоглобина в эритроците  
MCV (mean corpuscular volume) — средний объем эритроцита  
 $pCO_2$  — парциальное давление углекислого газа  
 $pO_2$  — парциальное давление кислорода  
TOF (Time of Flight) — времяпролетный



# ТЕОРИЯ И ПРАКТИКА ЛАБОРАТОРНЫХ ПАРАЗИТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Паразитарные заболевания — группа разных по этиологии болезней, общей чертой которых служит то, что их вызывают паразиты внутри организма или на его поверхности. Паразиты — организмы, которые живут за счет других хозяев, необходимых им для нормального существования. Некоторые из них никак не влияют на жизнь хозяев, другие — растут, размножаются или вторгаются в системы органов, приводя к развитию различных заболеваний.

Паразитарные заболевания имеют широкое распространение. По данным ВОЗ, каждый четвертый житель Земли служит носителем того или иного паразита.

Паразитарные заболевания вызывают микроорганизмы, имеющие в строении одно либо несколько клеточных ядер:

- протозойные или простейшие организмы, среди которых амебы, лямблии, малярийные плазмодии, токсоплазмы, трихомонады и пр.;
- черви или гельминты;
- эктопаразиты, среди которых вши (лобковая, головная и платяная), клопы и клещи.

## 10.1. ПРОТОЗОЙНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Возбудителями протозойных инфекций служат одноклеточные микроорганизмы, которые выделены в отдельный класс — простейшие (микроорганизмы, содержащие одно или несколько клеточных ядер). Для их размножения не нужен половой путь, они способны увеличить

свое количество в организме человека путем деления. Паразиты состоят из одной клетки, которая содержит все необходимое для жизнедеятельности и размножения. Некоторые виды способны к передвижению с помощью жгутиков, ресничек, псевдоподий. В переводе с греческого *protozoa* означает «первые животные».

Эти микроорганизмы способны вызывать серьезные заболевания и могут проникать в различные органы и ткани: кровь, кишечник, печень, легкие.

Возбудители протозойных инфекций проходят в организме человека определенные этапы развития. Жизненный цикл паразитов состоит из трех стадий:

- заражение человека (попадание возбудителя в организм);
- размножение, в результате которого создается большое количество паразитов;
- откладывание паразитом цист (временная форма существования простейших с наличием защитной оболочки) и выведение их из организма с фекалиями.

Большинство протозойных заболеваний у человека распространяют животные. Паразиты могут проникать в организм человека через продукты питания, воду, почву, источником болезни может служить инфицированный человек.

Малярийные плазмодии — наиболее распространенные представители кровепаразитов-простейших.

### 10.1.1. МАЛЯРИЯ

Малярия, или болотная лихорадка, — группа заболеваний, вызываемых простейшим паразитом (малярийным плазмодием) и передающихся через кровь (трансмиссивный путь) при укусах самки малярийного комара.

Течение заболевания сопровождается высокой температурой тела, приступами лихорадки, снижением уровня гемоглобина в крови, увеличением селезенки и печени. Причиной малярии служат паразитирующие микроорганизмы — несколько разновидностей малярийных плазмодиев. Клинические проявления заболевания отличаются в зависимости от вида плазмодиев.

Различают четыре вида плазмодиев.

- *P. falciparum* — *Malaria tropica*, возбудитель тропической лихорадки, наиболее опасной формы малярии, требующей срочного лечения. При тропической малярии у пациента выраженная бессонница, тошнота, судороги, спутанное сознание.

# ТЕОРИЯ И ПРАКТИКА ЛАБОРАТОРНЫХ ПАРАЗИТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Паразитарные заболевания — группа разных по этиологии болезней, общей чертой которых служит то, что их вызывают паразиты внутри организма или на его поверхности. Паразиты — организмы, которые живут за счет других хозяев, необходимых им для нормального существования. Некоторые из них никак не влияют на жизнь хозяев, другие — растут, размножаются или вторгаются в системы органов, приводя к развитию различных заболеваний.

Паразитарные заболевания имеют широкое распространение. По данным ВОЗ, каждый четвертый житель Земли служит носителем того или иного паразита.

Паразитарные заболевания вызывают микроорганизмы, имеющие в строении одно либо несколько клеточных ядер:

- протозойные или простейшие организмы, среди которых амебы, лямблии, малярийные плазмодии, токсоплазмы, трихомонады и пр.;
- черви или гельминты;
- эктопаразиты, среди которых вши (лобковая, головная и платяная), клопы и клещи.

## 10.1. ПРОТОЗОЙНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Возбудителями протозойных инфекций служат одноклеточные микроорганизмы, которые выделены в отдельный класс — простейшие (микроорганизмы, содержащие одно или несколько клеточных ядер). Для их размножения не нужен половой путь, они способны увеличить

свое количество в организме человека путем деления. Паразиты состоят из одной клетки, которая содержит все необходимое для жизнедеятельности и размножения. Некоторые виды способны к передвижению с помощью жгутиков, ресничек, псевдоподий. В переводе с греческого *protozoa* означает «первые животные».

Эти микроорганизмы способны вызывать серьезные заболевания и могут проникать в различные органы и ткани: кровь, кишечник, печень, легкие.

Возбудители протозойных инфекций проходят в организме человека определенные этапы развития. Жизненный цикл паразитов состоит из трех стадий:

- заражение человека (попадание возбудителя в организм);
- размножение, в результате которого создается большое количество паразитов;
- откладывание паразитом цист (временная форма существования простейших с наличием защитной оболочки) и выведение их из организма с фекалиями.

Большинство протозойных заболеваний у человека распространяют животные. Паразиты могут проникать в организм человека через продукты питания, воду, почву, источником болезни может служить инфицированный человек.

Малярийные плазмодии — наиболее распространенные представители кровепаразитов-простейших.

### 10.1.1. МАЛЯРИЯ

Малярия, или болотная лихорадка, — группа заболеваний, вызываемых простейшим паразитом (малярийным плазмодием) и передающихся через кровь (трансмиссивный путь) при укусах самки малярийного комара.

Течение заболевания сопровождается высокой температурой тела, приступами лихорадки, снижением уровня гемоглобина в крови, увеличением селезенки и печени. Причиной малярии служат паразитирующие микроорганизмы — несколько разновидностей малярийных плазмодиев. Клинические проявления заболевания отличаются в зависимости от вида плазмодиев.

Различают четыре вида плазмодиев.

- *P. falciparum* — *Malaria tropica*, возбудитель тропической лихорадки, наиболее опасной формы малярии, требующей срочного лечения. При тропической малярии у пациента выраженная бессонница, тошнота, судороги, спутанное сознание.

- *P. vivax* — *Malaria tertiana*, возбудитель трехдневной лихорадки. У больного появляются приступы, которые сопровождаются головными болями, ознобом, тошнотой. Постоянно чувствуется усталость. Болезнь считают быстротекущей. Для нее характерно частое чередование приступов жара и озноба, усиленное выделение пота. Обычно приступы возникают утром либо до обеда, и за несколько недель развивается анемия.
- *P. malariae* — *Malaria quartana*, возбудитель четырехдневной лихорадки. У больных каждые 2 дня возникают приступы лихорадки.
- *P. ovale* — типа *Malaria tertiana*, вызывает трехдневную лихорадку. По клиническим проявлениям схожа с малярией, вызываемой *P. vivax*. Для данной формы характерно чередование через день приступов лихорадки. Обычно они приходятся на вечернее время.

Источником инфекции при малярии служат больные или паразитоносители, в крови которых имеются половые формы малярийных плазмодиев (гамонты). Механизм передачи малярии — трансмиссивный (через зараженную кровь). Переносчиком являются самки комара *Anopheles*.

Малярийные плазмодии — наиболее распространенные представители кровепаразитов-простейших. Они поочередно паразитируют в двух хозяевах: в организме самки комара рода *Anopheles*, в котором осуществляется половое размножение (спорогония), и организме человека — бесполое размножение (шизогония). Начальная фаза размножения паразитов в организме человека происходит в клетках печени — гепатоцитах (экстраэритроцитарная шизогония), последующая — в эритроцитах (эритроцитарная шизогония). Развиваясь в эритроцитах, плазмодии питаются гемоглобином и разрушают пораженные эритроциты. Все патологические проявления малярии (приступы лихорадки, анемия, спленомегалия, поражение ЦНС при тропической форме малярии) целиком связаны с массовым разрушением эритроцитов.

**Спорогония.** Комары из рода *Anopheles* заражаются при сосании крови больного малярией или носителя плазмодиев. При этом в желудок комара попадают мужские и женские половые формы плазмодиев (микро- и макрогаметоциты), которые превращаются в зрелые микро- и макрогаметы. После слияния зрелых гамет (оплодотворение) образуется зигота, которая позже превращается в оокинет. Последняя проникает во внешнюю оболочку желудка комара и превращается в ооцист. В дальнейшем ооциста растет, содержание ее многократно делится, в результате чего образуется большое количество инвазионных форм — спорозоитов. Спорозоиты концентрируются в слюнных железах комара, где могут храниться в течение 2 мес. Продолжительность



спорогонии зависит от вида плазмодиев и температуры окружающей среды. Так, у *P. vivax* при оптимальной температуре (25 °С) спорогония длится 10 дней. Если температура окружающей среды не превышает 15 °С, спорогония прекращается.

**Шизогония** происходит в организме человека после заражения через укус комара и имеет две фазы: тканевую (пре-, или внеэритроцитарную) и эритроцитарную.

**Тканевая шизогония** происходит в гепатоцитах, где из спорозоитов последовательно образуются тканевые трофозоиты, шизонты и обилье тканевых мерозоитов (у *P. vivax* — до 10 тыс. с одного спорозоита, у *P. falciparum* — до 50 тыс.). Наименьшую продолжительность тканевой шизогонии отмечают у *P. falciparum*, она составляет 6 сут, у *P. vivax* — 8 сут, *P. ovale* — 9 сут и у *P. malariae* — 15 сут. При четырехдневной и тропической малярии после окончания тканевой шизогонии мерозоиты полностью выходят из печени в кровь, а при трехдневной и малярии *P. ovale* тканевая шизогония может происходить как непосредственно после заражения, так и через 1,5–2 года после него, что служит причиной длительной инкубации и отдаленных рецидивов болезни.

**Эритроцитарная шизогония.** После окончания тканевой шизогонии мерозоиты поступают в кровь, проникают в эритроциты. Развиваясь в эритроцитах, плазмодии питаются гемоглобином и разрушают пораженные эритроциты. Все патологические проявления малярии (приступы лихорадки, анемия, спленомегалия, поражение ЦНС при тропической форме малярии) целиком связаны с эритроцитарной шизогонией. При исследовании пораженных эритроцитов под микроскопом обнаруживают три стадии трансформации паразита.

- Кольцо-мерозоит. По мере увеличения мерозоита у его ядра образуется вакуоль, которая выжимает ядро на периферию, и паразит по форме напоминает перстень.
- Амебовидный шизонт (взрослая форма).
- Морулы — при достижении больших размеров шизонт принимает овальную форму, ядро и цитоплазма его начинают делиться, в результате чего образуется от 6 до 24 эритроцитарных мерозоитов.

Эритроциты разрушаются, и мерозоиты попадают в плазму крови, где одна часть из них погибает, а вторая проникает в другие эритроциты, и цикл эритроцитарной шизогонии повторяется. Длительность одного цикла эритроцитарной шизогонии у *P. falciparum*, *P. vivax* и *P. ovale* составляет 48 ч, у *P. malariae* — 72 ч. Малярийные приступы развиваются на той фазе цикла эритроцитарной шизогонии, когда основная масса пораженных эритроцитов разрушается, и вышедшие

из них дочерние особи плазмодиев (мерозоиты) инвазируют интактные эритроциты.

У *P. falciparum* эритроцитарная шизогония начинается в периферическом русле крови, а заканчивается в центральном вследствие задержки пораженных эритроцитов в капиллярах внутренних органов. В результате этого в начале инфекции в препаратах крови присутствуют только молодые трофозоиты («кольца»). Гаметоциты после созревания в капиллярах внутренних органов обнаруживают в периферической крови на 10–12-е сутки заболевания. Выявление в периферической крови взрослых трофозоитов или шизонтов любого возраста свидетельствует о начале злокачественного течения тропической малярии и близком летальном исходе, если не будут проведены неотложные мероприятия. Гаметоциты *P. falciparum*, в отличие от других видов плазмодиев, имеют не круглую, а продолговатую форму и отличаются длительным периодом жизни.

У *P. vivax*, *P. ovale* и *P. malariae* эритроцитарная шизогония целиком протекает в эритроцитах циркулирующей крови, поэтому в ее в мазках можно обнаружить все стадии развития паразита.

При острых приступах малярии имеется определенная закономерность изменений крови. Во время озноба появляется нейтрофильный лейкоцитоз со сдвигом влево. В период лихорадки количество лейкоцитов несколько уменьшается. При появлении пота и апирексии нарастает моноцитоз. В дальнейшем после 2–4 приступов развивается анемия, которая особенно рано и быстро возникает при тропической лихорадке. Анемия носит в основном гемолитический характер и сопровождается повышением содержания ретикулоцитов. В мазках крови обнаруживают пойкилоцитоз, анизоцитоз, полихроматофилию эритроцитов. При присоединении угнетения костного мозга количество ретикулоцитов уменьшается. Иногда отмечают картину пернициозоподобной анемии. СОЭ при малярии значительно повышается.

В межприступном (безлихорадочном) периоде в крови при всех формах малярии, кроме тропической, преобладают взрослые трофозоиты. В этот период болезни те или иные стадии плазмодиев присутствуют в крови постоянно, вплоть до полного прекращения эритроцитарной шизогонии. В связи с этим нет необходимости брать кровь на исследование только на высоте малярийного приступа, а можно исследовать ее в любое время.

Паразитологическая диагностика малярии основана на обнаружении бесполой и половой форм возбудителя при микроскопическом исследовании крови, что возможно только в период его развития в эритроците. Для обнаружения плазмодиев и определения их вида используют препараты крови, приготовленные методом «тонкого мазка»

и «толстой капли», окрашенные по Романовскому—Гимзе. Оба метода, имеющие свои преимущества и недостатки, являются взаимодополняющими. Обнаружение в мазке крови или толстой капле любых стадий плазмодиев (даже 1 паразита), развивающихся в эритроцитах, служит единственным бесспорным доказательством наличия малярии. Следует иметь в виду, что объем исследуемой крови в толстой капле в 20—40 раз больше, чем в тонком мазке, поэтому положительный ответ можно дать даже после исследования мазка, а отрицательный — только после исследования толстой капли с иммерсионным объективом в течение минимум 5 мин, с просмотром не менее 100 полей зрения (стандарт ВОЗ). Если при подозрении на малярию при однократном исследовании плазмодиев в крови обнаружить не удастся, то необходимо проведение многократных исследований (при *Malaria tropica* мазки крови следует брать каждые 6 ч на протяжении всего приступа).

#### **Взятие проб крови для исследования на выявление малярии**

- Кровь для паразитологического исследования берут из пальца руки (у взрослых обычно из безымянного, у детей — из большого), у новорожденных — из большого пальца ноги (но не мочки уха).
- Периферическую кровь для исследования берут вне зависимости от температуры тела и клинических проявлений.
- Для прокола кожи пальца используют стерильные одноразовые скарификаторы или специальные стерильные иглы разового использования.
- В целях безопасности пациента взятие крови на малярию производят на стерильные предметные стекла, так как возможно их касание к месту прокола.
- Перед проколом кожу пальца тщательно протирают ватным тампоном, смоченным в 70% этаноле (Спирте этиловом<sup>®</sup>), чем достигают не только предупреждения инфицирования места прокола, но и попадания с кожи пальца бактерий, различных посторонних частиц на препарат крови, которые могут затруднить диагностику при микроскопии.
- Первую каплю крови, выступившую после прокола, вытирают сухим стерильным ватным тампоном, чтобы избежать фиксации эритроцитов остатками спирта, которым дезинфицировали кожу.
- Последующие капли (выступающие самостоятельно или при надавливании на палец массирующими движениями) используют для приготовления препаратов крови. При этом кровь забирают в стерильный сухой гематологический капилляр, из которого быстро переносят на предметное стекло, либо выступившую кровь непосредственно из прокола пальца наносят на предмет-

ные стекла. Если кровь набирают в капилляр, то можно использовать нестерильные предметные стекла.

- От одного пациента готовят не менее 2–3 стекол с «толстыми каплями» и 2–3 «тонких мазка» крови. Рекомендуют первоначально окрасить по одному стеклу с тем, чтобы иметь возможность исправить дефекты окраски.

### 10.1.1.1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ОКРАСКА МАЗКОВ КРОВИ «ТОЛСТАЯ КАПЛЯ»

К выступающим каплям крови прикасаются предметным стеклом, на которое берут 2–3 капли крови, и затем иглой или углом другого предметного стекла кровь размазывают, чтобы получить на стекле овал диаметром около 1 см или полосу длиной 2–3 см.

Если кровь доставляют в лабораторию в вакуумной пробирке, то с помощью капилляра на предметное стекло наносят 2–3 капли крови на небольшом расстоянии друг от друга. Стеклопалочкой или углом другого предметного стекла смешивают их. Смешивать надо легко, чтобы образовалось пятно диаметром 1,5 см. Слой крови не должен быть слишком толстым, иначе при высыхании образуется просто корка, которая отвалится.

От одного пациента готовят не менее 2–3 стекол с «толстыми каплями» и 2–3 «тонких мазка» крови. Рекомендуют первоначально окрасить по одному стеклу с тем, чтобы иметь возможность исправить дефекты окраски.

«Тонкий мазок» — обычный мазок крови. Для приготовления «толстой капли» при обследовании пациентов с подозрением на малярию используют несколько методик.

**Методика приготовления «толстых капель» на предметном стекле без мазка.** На предметное стекло наносят каплю крови диаметром около 5 мм, кровь распределяют в равномерный диск или прямоугольник размером 1–1,5 см (рис. 10.1). На краю предметного стекла делают мазок в виде полоски крови для маркировки препарата, а при массовых обследованиях — две полоски, где наносят маркировку.

**Методика приготовления «толстых капель» на мазке.** На предметном стекле готовят мазок крови более толстый, чем обычный. Сразу после приготовления мазка, пока он не высох, на его влажную поверхность наносят каплю крови. Кровь на влажном мазке распределится в равномерный диск при осторожных наклонах предметного стекла под небольшим углом в разные стороны; чем больше взятая капля крови, тем больше площадь, по которой она распределится (рис. 10.2).



рис. 10.1. «Толстые капли» на предметном стекле в виде диска и прямоугольника



Рис. 10.2. «Толстые капли» на мазке

Капля крови, нанесенная на мазок, более прочно прикрепляется, чем нанесенная непосредственно на предметное стекло. Толщина «толстой капли» должна быть такой, чтобы через нее просматривался печатный текст. Слишком толстая капля может оторваться от стекла при высушивании; такой препарат непригоден для исследования.

Независимо от методики приготовления, показателем достаточного содержания крови в «толстой капле» считают обнаружение в одном поле зрения микроскопа в среднем 10–15 лейкоцитов (увеличение: объектив 90–100×, окуляр 7×).

**Методика комбинированного приготовления мазков крови.** В целях экономии стекол, особенно при массовых обследованиях, на предметном стекле одновременно готовят «тонкий мазок» и «толстую каплю» (рис. 10.3).

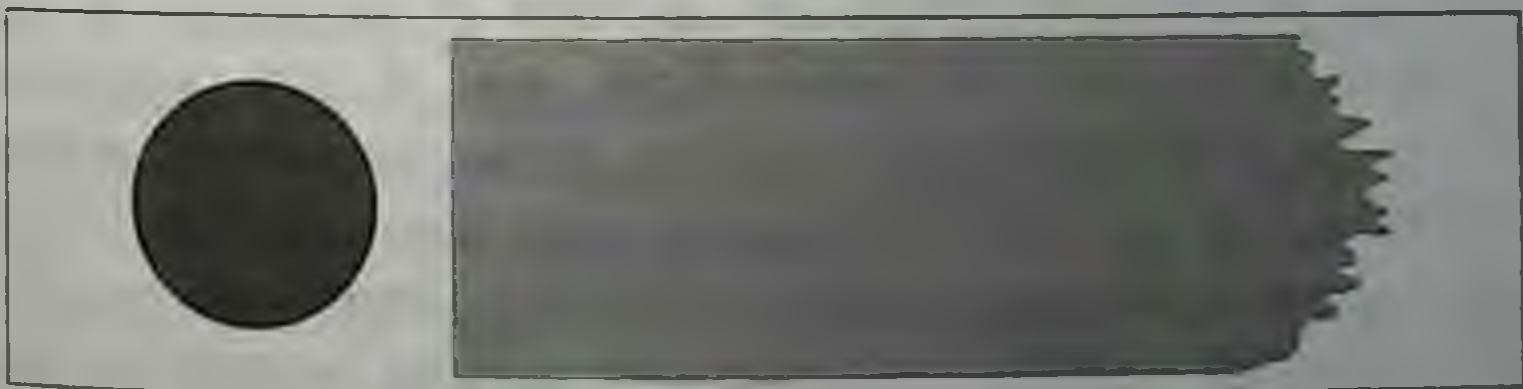


Рис. 10.3. «Тонкий мазок» и «толстая капля» на одном предметном стекле

Этот метод, однако, требует ряда предосторожностей. Для того чтобы оба препарата были пригодны для исследования, необходима четкая последовательность их обработки. Важно начинать с окраски «толстой капли» погружением соответствующего участка предметного

стекла в раствор краски. Затем фиксируют «тонкий мазок» и окрашивают его. Нельзя начинать с фиксации «тонкого мазка», так как даже при очень аккуратном погружении в фиксирующую жидкость участка предметного стекла, на который нанесен «тонкий мазок», в «толстой капле» эритроциты могут подвергнуться фиксации парами фиксатора. При последующей окраске такая капля станет непригодной для исследования, даже если фиксация была неполной.

Маркируют препарат карандашом по стеклу или специальными чернилами. Затем подсушивают на воздухе в течение 1–2 ч, положив стекла на горизонтальную поверхность. Для ускорения высыхания «толстых капель» можно использовать обычный комнатный вентилятор или поместить их в термостат (30–35 °С).

Высушивание на солнце, огне или любом другом источнике тепла исключается, так как препарат становится непригодным для исследования. Особенно это относится к «толстой капле», которая под действием тепла подвергается аутофиксации, и необходимый гемолиз при окраске не наступает.

При длительном хранении (особенно в жарком климате) неокрашенных «толстых капель» может произойти их аутофиксация. При необходимости хранения «толстых капель» для предотвращения аутофиксации препараты до окраски следует обработать забуференным раствором метиленового синего (1 г метиленового синего + 3 г  $\text{NaHPO}_4$  + 1 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 300 мл дистиллированной воды). «Толстую каплю» после высыхания погружают в этот раствор на 1 с, промывают водой и высушивают. В таком виде каплю можно хранить длительное время. Перед исследованием ее окрашивают по Романовскому более короткое, чем обычно, время — в течение 6–10 мин.

Мазки «толстая капля» не фиксируют. Предметные стекла с хорошо просушенными толстыми каплями располагают на мостике на некотором расстоянии одно от другого и наливают на них краску Романовского (того же разведения, что и для окраски мазков крови) на срок 8–10 мин. Происходит выщелачивание эритроцитов. Затем краску сливают и на препараты наливают новую порцию разведенной краски Романовского на 20–30 мин. Затем осторожно, чтобы не смыть «толстые капли», предметные стекла ополаскивают водой и высушивают.

Правильное окрашивание характеризуется тем, что середина препарата окрашивается в синеватый или голубой цвет, в то время как края получают красновато-фиолетовый оттенок. Перекрашенные препараты характеризуются грязно-фиолетовым окрашиванием. Такое же окрашивание получают при использовании воды щелочной реакции.

Хранят окрашенные препараты завернутыми в бумагу, небольшими пачками, а лучше — в специальных папках с гнездами для каждого препарата. После микроскопирования иммерсионное масло с «толстой капли» удаляют мягкой фланелевой тряпочкой.

Большой объем крови, чем в мазках, при исследовании «толстой капли» и гемолиз эритроцитов позволяют легче обнаружить в крови малярийные плазмодии, спирохеты возвратного тифа, а также эозинофилы и полихроматофилы.

### 10.1.1.2. МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ «ТОЛСТОЙ КАПЛИ»

Обнаружение в мазке крови или «толстой капле» любых стадий плазмодиев (даже 1 паразита), развивающихся в эритроцитах (трофозоитов — молодых и взрослых, шизонтов — незрелых и зрелых, а также половых форм гаметоцитов — мужских и женских), считают единственным бесспорным доказательством наличия малярии. Следует иметь в виду, что объем исследуемой крови в «толстой капле» в 20–40 раз больше, чем в «тонком мазке», поэтому положительный ответ можно дать даже после исследования мазка, а отрицательный — только после исследования «толстой капли» с иммерсионным объективом в течение минимум 5 мин, с просмотром не менее 100 полей зрения. Чувствительность метода «толстой капли» такова, что при просмотре 100–150 полей зрения можно обнаружить около 8 паразитов в 1 мкл крови. Необходимо осторожно относиться к обнаружению единственного образования, похожего на кольцевидного трофозои́та в «толстой капле», так как внешний вид этой стадии паразита может быть симулирован различными артефактами.

Для установления видовой принадлежности малярийных паразитов имеет значение оценка следующих признаков:

- наличие полиморфизма возрастных стадий или одной ведущей, их сочетание с гаметоцитами;
- морфология разных возрастных стадий, их размеры по отношению к пораженному эритроциту;
- характер, размер ядра и цитоплазмы, интенсивность пигмента, его форма, размеры зерен/гранул;
- количество мерозоитов в зрелых шизонтах, их размеры и расположение по отношению к скоплению пигмента;
- склонность паразита к поражению эритроцитов определенного возраста (тропизм);
- склонность к множественному поражению отдельных эритроцитов несколькими особями паразитов и его интенсивность;

- размеры пораженных эритроцитов по отношению к непораженным, форма пораженных эритроцитов, наличие азурофильной зернистости в пораженных эритроцитах;
- форма гаметоцитов.

При оценке интенсивности паразитемии учитывают суммарно бесполое и половые формы, за исключением *P. falciparum*. Интенсивность паразитемии оценивают по «толстой капле» в расчете на 1 мкл крови. Подсчитывают количество паразитов по отношению к определенному количеству лейкоцитов. При обнаружении 10 паразитов и более на 200 лейкоцитов подсчет заканчивают. При обнаружении 9 паразитов и менее на 200 лейкоцитов подсчет продолжают для определения количества паразитов на 500 лейкоцитов. При обнаружении единичных паразитов в «толстой капле» крови подсчитывают их количество на 1000 лейкоцитов. Определение количества паразитов в 1 мкл крови проводят по следующей формуле:

$$X = A \times B/C,$$

где  $X$  — количество паразитов в 1 мкл крови;  $A$  — подсчитанное количество паразитов;  $B$  — количество лейкоцитов в 1 мкл крови данного больного;  $C$  — подсчитанное количество лейкоцитов.

В тех случаях, когда нет возможности определить количество лейкоцитов у данного больного, их число в 1 мкл условно принимают равным 8000.

Контроль эффективности лечения проводят путем исследования «толстой капли» крови с подсчетом паразитов в 1 мкл крови. Исследование необходимо выполнять ежедневно с 1-го по 7-й день от начала химиотерапии. При исчезновении паразитов в течение этого периода дальнейшее исследование крови проводят на 14, 21 и 28-й день от начала лечения.

За больными, перенесшими тропическую малярию, устанавливают диспансерное наблюдение в течение 1–2 мес, при этом с интервалом 1–2 нед проводят паразитологическое исследование крови. Диспансеризацию больных, перенесших малярию, вызванную *P. vivax*, *P. ovale* и *P. malariae*, следует проводить в течение 2 лет. Любое повышение температуры тела у этих больных требует лабораторного исследования крови с целью обнаружения малярийных плазмодиев.

### 10.1.2. ЗАБОЛЕВАНИЯ, ВЫЗЫВАЕМЫЕ ПРОСТЕЙШИМИ

Простейшие — одноклеточные организмы, паразитирующие в кишечнике человека и вызывающие различные заболева-



ния. Заражение происходит через загрязненную воду, пищу, предметы быта.

В жизненном цикле у большинства простейших наблюдают две формы.

- Вегетативная форма или трофозоит (название, принятое в зарубежной литературе) — активная форма, приспособленная к осуществлению жизненных функций (питание, размножение) в организме хозяина, но мало устойчивая во внешней среде; в вегетативной форме паразиты активны и подвижны.
- Циста, которая образуется из вегетативных форм в дистальных отделах кишечника. Она характеризуется наличием защитной оболочки, что обеспечивает ей устойчивость в неблагоприятных условиях внешней среды и позволяет легче выявлять паразитов при проведении микроскопического исследования кала. Основная функция цист — распространение паразитов.

Особенности жизненного цикла простейших:

- единственная форма существования — вегетативная, размножение ее приводит к увеличению численности паразитов;
- жизненный цикл простейших связан со сменой хозяев;
- чередование вегетативных форм и стадий цисты.

Для диагностики заболеваний, вызываемых простейшими паразитами, применяют множество методов. Одним из самых распространенных служит микроскопическое исследование кала на наличие вегетативных форм и цист простейших.

Обнаружение и дифференцирование простейших (отличие патогенных форм от непатогенных) — довольно сложная задача. Большинство одноклеточных организмов встречаются в кале в двух формах:

- вегетативной, легко поддающейся вредным воздействиям (в частности, охлаждению) и потому быстро погибающей после выделения из кишечника;
- в виде устойчивых к внешним воздействиям цист.

В оформленном кале простейших, как правило, встречают лишь в инцистированном состоянии; для обнаружения вегетативных форм необходимо исследовать кал еще в теплом состоянии. Это обусловлено тем, что в остывшем кале вегетативные формы простейших быстро гибнут и подвергаются действию протеолитических ферментов, вследствие чего теряют характерные особенности своей структуры. Кроме того, при остывании снижается, а затем исчезает подвижность простейших — важный вспомогательный фактор при их дифференцировании.

В фекалиях могут быть обнаружены 20 видов простейших (8 патогенных и условно-патогенных и 12 комменсалов). Постейшие кишеч-

ника обитают в тонкой или толстой кишке в стадии трофозои́та и/или цисты. Их относят к одной из четырех групп: амёб, жгутиковых, реснитчатых или кокцидий.

Основными и наиболее значимыми простейшими, вызывающими заболевания у человека, считают лямблии, дизентерийную амёбу и балантидий.

### 10.1.2.1. АМЕБИАЗ

Дизентерийная амёба (*Entamoeba histolytica*) поражает толстый кишечник и вызывает у человека заболевание амёбиаз. Относят к классу корненожек, паразитирует в толстом кишечнике, выделяется в форме трофозои́та (с жидкими фекалиями) и/или цисты (в оформленном стуле).

Дизентерийная амёба существует в организме человека в виде различных форм.

**Большая вегетативная форма** (*forma magna*) — клетки крупной формы (20–60 мкм) с четко различимой экто- и эндоплазмой. Для нее характерны толчкообразные поступательные движения, при движении образует пальцеобразные псевдоподии (рис. 10.4, см. цв. вклейку). У живых особей ядро не видно, у погибших визуализируют в виде кольцевидных скоплений блестящих зерен. Большую вегетативную форму обнаруживают в свежих каловых массах при остром амёбиазе. В цитоплазме паразитов иногда определяют поглощенные эритроциты.

**Тканевая форма** — мелкая (20–25 мкм) патогенная, способна инвазировать стенку толстой кишки с развитием язвенных поражений. Такие формы паразитов определяют в жидком кале при распаде язв. Все инвазивные формы дизентерийной амёбы очень часто содержат эритроциты на разных стадиях переваривания.

**Мелкая вегетативная форма** (*forma minuta*) — основная форма существования дизентерийной амёбы в организме больного. Она может быть обнаружена у больных хроническим амёбиазом или выздоравливающих. Для данной формы амёб характерно замедленное движение, псевдоподии более мелкие.

**Цисты** — неподвижные круглой формы (диаметр 8–15 мкм) прозрачные образования, в которых иногда присутствуют блестящие палочковидные хроматоидные тельца (скопления РНК и белков). Для уточнения видовой принадлежности амёб препараты кала окрашивают раствором Люголя. При микроскопии выявляют 4 хорошо окрашенных ядра в виде колец (характерный признак *Entamoeba histolytica*).

Основной хозяин паразита — человек. Мелкие вегетативные формы дизентерийных амёб обитают в микроаэрофильных условиях верхнего

отдела толстой кишки, питаясь бактериями и клеточным детритом. Пассивно передвигаясь с кишечным содержимым, организмы проникают в дистальные отделы кишечника и при определенных условиях (обезвоживание, нарушение микробного биоценоза, изменение pH) образуют цисты. С калом цисты попадают в воду, на руки, пищу (переносятся мухами) и проникают в организм человека.

При заболевании амебы проникают в кровеносные и лимфатические капилляры, вызывая образование серозно-фибринозного экссудата в подслизистой оболочке и ишемию отдельных участков с последующим некрозом. Некротизированные ткани распадаются, и образуются характерные кратерообразные язвы с подрытыми краями. Проникнув в лимфатические и кровеносные сосуды, возбудитель может попадать в печень (через систему воротной вены), а также в другие органы.

Вследствие того что большинство видов амеб (кишечная, Гартмана, Бючли) непатогенные для человека, следует проявлять большую осторожность при оценке результатов исследования фекалий. Обнаружение только тканевой формы *E. histolytica forma magna* может служить достоверным признаком наличия у пациента амебной дизентерии и/или амебного язвенного колита. Наличие в цитоплазме амеб эритроцитов служит очень важным диагностическим признаком, так как непатогенные формы амеб никогда их не содержат. Во всех остальных случаях обнаружение *E. histolytica*-подобных форм трофозоитов, не содержащих эритроцитов, не считают основанием для диагноза амебиаза как болезни. Аналогичным образом оценивают и результаты выявления только цист *E. histolytica*, которые могут быть обнаружены у выздоравливающих от острого амебиаза пациентов, страдающих хронической формой амебиаза и носителей.

### 10.1.2.2. ЛЯМБЛИОЗ

Лямблии (*Lambliа intestinalis*) относят к классу жгутиковых. Лямблии паразитируют в тонком кишечнике, преимущественно в двенадцатиперстной кишке. Существование трофозоитов (вегетативная форма лямблий) требует жидкой среды, поэтому, попадая в толстый кишечник, лямблии инцистируются, и в кале находятся только цисты. Лишь при профузных поносах или после действия слабительных в испражнениях могут быть найдены вегетативные формы.

*Lambliа intestinalis* вызывает лямблиоз — паразитарную инвазию, протекающую в виде латентного паразитоносительства или с незначительными клиническими проявлениями, преимущественно в виде дисфункций кишечника.

Возбудители распространены повсеместно, особенно в регионах с низкой санитарной культурой и областях, где соблюдение правил гигиены затруднено. Основным механизмом заражения — фекально-оральный, через загрязненные руки, игрушки, пищу и воду.

В организме человека лямблии существуют в виде вегетативной формы (трофозои́та), способной образовывать цисты. Вегетативные формы представляют собой крупное грушевидной формы клеточное образование, длина которого составляет 9–21 мкм, ширина — 5–15 мкм, толщина — 2–4 мкм. Трофозоит содержит 2 ядра, что в сочетании с парабазальным телом придает паразиту вид «лица с гримасничающим ртом», особенно хорошо видимым на окрашенных препаратах (рис. 10.5, см. цв. вклейку).

Подвижность лямблий обеспечивают 4 пары жгутиков, расположенных сверху, снизу, сзади и на боковых поверхностях. Лямблиям свойственно характерное движение — постоянное переворачивание боком за счет вращательного движения вокруг оси тела, либо оно напоминает полет падающего листа. В переднем отделе лямблий имеется присасывательный диск, окруженный фибриллами, для прикрепления к кишечному эпителию. Лямблии всасывают пищу всей поверхностью тела, а размножаются продольным делением.

Цисты — неподвижные, овальные клетки длиной 10–14 мкм, имеют достаточно толстую оболочку. Зрелые цисты содержат 4 ядра, присасывательный диск, 4 парабазальных тела, особенно хорошо видимых при окраске раствором Люголя.

Вегетативные формы лямблий обитают в верхних отделах тонкой кишки, с помощью присасывательного диска прикрепляются к эпителию кишечных ворсинок. В желчных протоках быстро погибают под действием желчи. Частое их обнаружение при дуоденальном зондировании связано с попаданием лямблий из двенадцатиперстной кишки. Попадая в неблагоприятные условия нижних отделов кишечника, они образуют цисты, выделяемые с испражнениями.

### 10.1.2.3. БАЛАНТИДИАЗ

Балантидий (*Balantidium coli*) — единственная ресничная инфузория, паразитирующая в кишечнике человека и вызывающая заболевания различной тяжести — от легких колитов до тяжелых язвенных поражений толстого кишечника. Возбудитель обнаруживают в фекалиях в вегетативной форме или в виде цист. Встречают и носительство у здоровых людей.

Вегетативная форма ресничной инфузории имеет вытянутое, яйцообразное тело длиной 30–150 мкм, шириной 30–100 мкм (рис. 10.6,

см. цв. вклейку). Паразит передвигается с помощью ресничек, нередко вращаясь вокруг своей оси. Питание балантидий осуществляется через специальное образование цитостом (клеточный рот), который окружен длинными ресничками (4–6).

Цисты имеют округлую форму с толстой оболочкой, равномерно окрашиваются раствором Люголя в желто-коричневый цвет.

Основным хозяином для балантидий служат свиньи, для которых они малопатогенны. С испражнениями цисты попадают в окружающую среду, где могут сохраняться несколько недель. При попадании в организм человека в толстой кишке они дают начало вегетативной стадии. Источник заражения — загрязненная вода или продукты питания.

Лабораторная диагностика основана на микроскопическом исследовании препаратов кала. Для этого кусочек кала разводят в изотоническом растворе натрия хлорида и готовят нативный препарат на предметном стекле. Под малым увеличением микроскопа балантидии хорошо видны благодаря своим крупным размерам и активному движению.

Из-за низкой устойчивости вегетативных форм простейших к различным воздействиям, в том числе охлаждению, их обнаруживают в кале только до его остывания (при охлаждении погибают), то есть примерно в течение 20 мин после сбора материала. Если исследование проводят в более поздние сроки, то анализ выявит только цисты простейших.

#### 10.1.2.4. МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ ПРОСТЕЙШИХ В КАЛЕ

Для обнаружения простейших в кале используют различные методы. Наиболее простые следующие:

- микроскопическое исследование нативного и окрашенного раствором Люголя мазка кала;
- специальные методы микроскопического исследования препаратов кала.

##### 10.1.2.4.1. Микроскопическое исследование нативного и окрашенного мазка кала

Принцип данного метода состоит в микроскопическом обнаружении движущихся простейших в суспензии каловых масс в 0,9% растворе натрия хлорида. Препарат, приготовленный таким образом, служит прежде всего для выявления вегетативных форм простейших, которых распознают по характеру движения. Препарат суспензии каловых масс в растворе Люголя используют в основном для дифференциации цист простейших.

**Реактивы**

- Натрия хлорида 0,9% раствор.
- Раствор Люголя: кристаллический йод — 1,5 г, йодид калия — 3 г, дистиллированная вода — 100 мл.

**Ход определения**

- На предметное стекло наносят 0,1 мл (2 капли) 0,9% раствора натрия хлорида и на расстоянии 3 см — 0,1 мл раствора Люголя.
- На кончик деревянной палочки берут частицу кала из контейнера с доставленной в лабораторию пробой кала и эмульгируют ее в 0,9% растворе натрия хлорида. Эмульсия кала должна быть не слишком густой, так как тогда будет трудно исследовать препарат под микроскопом. Препарат считают правильно приготовленным, если через него четко виден печатный шрифт.
- Затем этой же палочкой берут другую частицу кала из пробы и эмульгируют ее в капле раствора Люголя. Требования к качеству эмульсии аналогичны изложенным выше.
- Обе капли накрывают покровным стеклом.
- Препарат микроскопируют сначала при малом увеличении микроскопа (окуляр 7×, объектив 20×), а затем при большом (окуляр 7×, объектив 40×).

**10.1.2.4.2. Метод формалин-эфирной седиментации**

Обработка кала формалин-эфирной смесью позволяет выделять и концентрировать цисты простейших паразитов.

**Реактивы**

- Раствор формалина: формалин концентрированный 10 мл, натрия хлорид 0,85 г, вода дистиллированная до 100 мл.
- Эфир серный.
- Раствор Люголя.

**Подготовка к исследованию препаратов нативного кала**

- Налить в центрифужную пробирку 9 мл 10% раствора формалина.
- В раствор формалина добавить пробу кала массой 1 г, в случае жидкого стула — не менее 3–4 мл кала.
- Содержимое пробирки перемешать.
- Содержимое пробирки профильтровать через 2 слоя марли или металлическое ситечко.
- Если требуется, то после фильтрации довести объем суспензии до 8 мл.
- Долить в пробирку с суспензией 2 мл эфира и заткнуть пробкой.
- Энергично встряхивать пробирку в течение не менее 30 с.

- Пробирку с суспензией центрифугировать со скоростью 1500 об./мин в течение 2 мин или 2000 об./мин в течение 1 мин.
- После центрифугирования образуются четыре слоя: осадок, раствор формалина, коагулированный белок и фекальный детрит — так называемая пробка, сверху эфир с растворенными в нем жирами.
- Верхние 3 слоя удалить резким опрокидыванием пробирки.
- Оставшийся осадок перемешать.
- На предметное стекло поместить каплю 2% раствора Люголя и добавить в нее 1–2 капли осадка из центрифужной пробирки.
- Накрыть препарат покровным стеклом.
- Микроскопировать при увеличении окуляра 10×, объектива 40×.

#### 10.1.2.4.3. Метод седиментации с применением одноразовых концентраторов

Использование одноразовых концентраторов существенно повышает вероятность обнаружения цист и ооцист простейших. По своей сути эти устройства служат современной модификацией эфир-формалинового метода седиментации. Наиболее часто в практике лабораторий используют одноразовые концентраторы Parasep.

Одноразовый концентратор Parasep представляет собой пластиковую пробирку из нескольких составляющих (рис. 10.7):

- пробирка для пробы, содержащая 2,4 мл 10% буферного раствора формалина, в которую заливают этилацетат, сюда же помещают образец пробы кала;
- фильтр;
- емкость для сбора отфильтрованного материала.

*Последовательность выполнения процедур при использовании одноразового концентратора Parasep.*

- Отсоединить камеру для забора образца от пробирки, внести туда 0,9 мл этилацетата и перемешать.
- Далее при помощи лопатки на фильтре-концентраторе отобрать необходимое количество анализируемого образца (0,5–1 г кала).
- Внести образец в камеру с буферной смесью (формалин, этилацетат) и тщательно перемешать, используя лопатку.
- Присоединить камеру с образцом к пробирке, проследив при этом, чтобы сработал герметичный замок, предупреждающий протекание содержимого.
- Тщательно встряхнуть пробирку до получения равномерно окрашенной взвеси. В таком виде образец может храниться до 24 ч при комнатной температуре. Структура и форма исследуемых объектов при этом не нарушаются.

Площадка для установки  
пробирки на стол

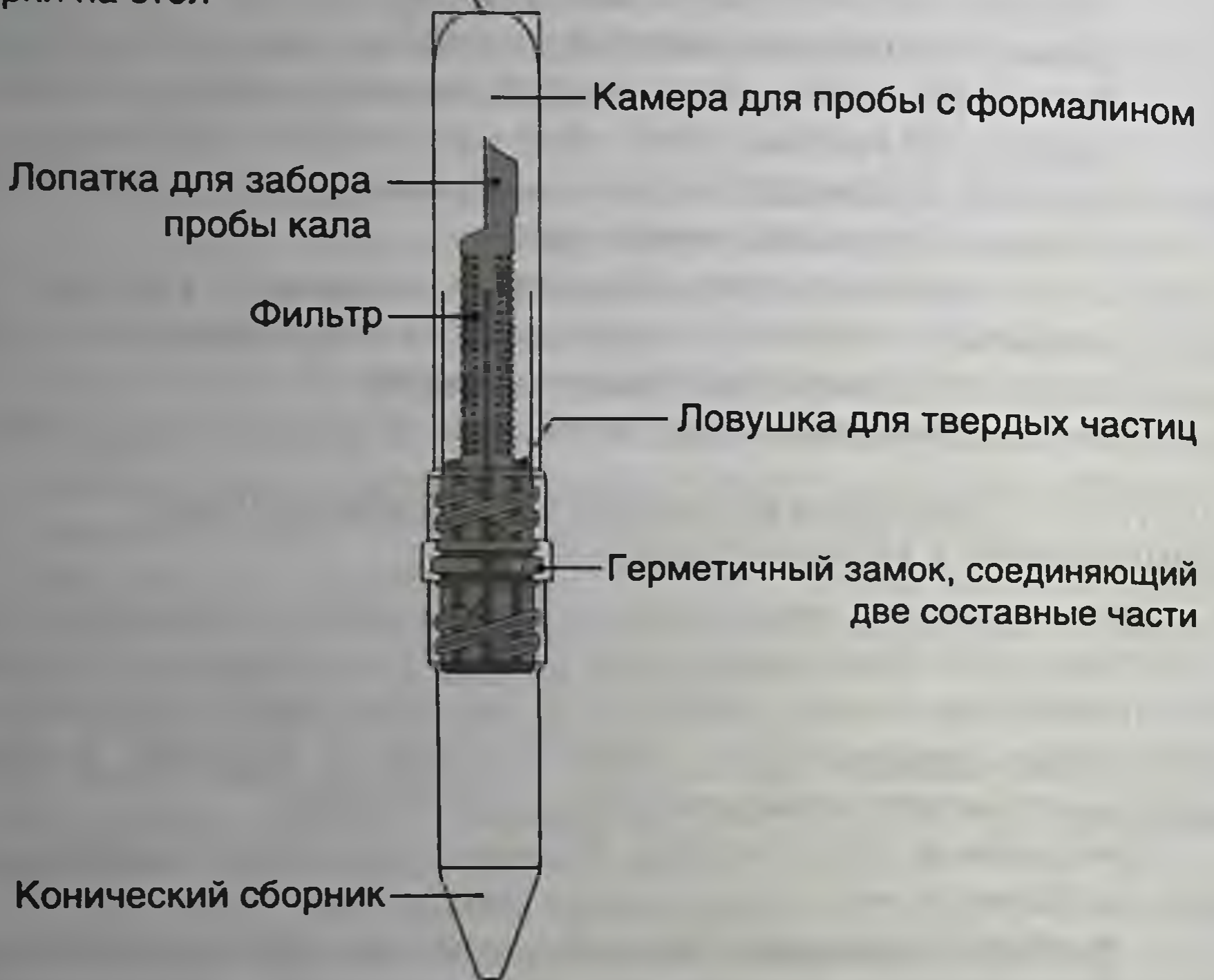


Рис. 10.7. Одноразовый концентратор Parasep

- Пробирку перевернуть и поместить в центрифугу. Центрифугировать при скорости 2200–2500 об./мин в течение 3 мин (в течение 1 мин при 3000 g или 5 мин при 1500 g).
- После центрифугирования пробирку вынуть из центрифуги, при этом в ней наблюдают 4 слоя: этилацетат, жиры, формалин и мелкодисперсный осадок.
- Держа пробирку строго вертикально, аккуратно отсоединить камеру для сбора продуктов фильтрации, стараясь при этом избежать перемешивания надосадочной жидкости и осадка.
- Удалить пробку из этилацетата, жировых частиц и формалина путем резкого переворачивания пробирки.
- С помощью пастеровской пипетки отобрать образец с поверхности осадка и нанести 1–2 капли на предметное стекло.
- Накрыть препарат покровным стеклом.
- Микроскопировать при увеличении окуляра 10×, объектива 40×.



#### 10.1.2.4.4. Метод влажного мазка

Методы влажного мазка с изотоническим раствором натрия хлорида, раствором Люголя или метилтиониния хлоридом (Метиленовым синим<sup>\*</sup>) применяют для выделения мелких (3–5 мкм) и плохо различимых даже при большом увеличении микроскопа простейших (криптоспоридии и некоторые формы бластоцист), а также для проведения дифференциальной диагностики четырехядерных цист энтамеб, то есть для видовой идентификации дизентерийной амебы.

##### Реактивы

- 0,9% раствор натрия хлорида.
- 2% раствор Люголя.

##### Ход исследования

- Предварительно нанести на предметные стекла 1–2 капли 0,9% раствора натрия хлорида и раствора Люголя.
- Из пробы кала выбрать порцию обычную и с патологическими признаками (слизь, кровь), смешать с каплей подготовленных на предметном стекле растворов, накрыть покровным стеклом.
- Препарат должен быть почти прозрачным, светопроницаемой плотности, чтобы можно было видеть печатный шрифт.
- Микроскопировать при увеличении: окуляр 10×, объектив 10×, а затем окуляр 10×, объектив 40×.

### 10.1.3. ГЕЛЬМИНТОЗЫ

Гельминтозами называют болезни, вызываемые паразитическими червями, или гельминтами. Гельминты (более распространенное название — глисты) используют в качестве среды обитания организм человека.

Человек, в кишечнике которого паразитируют самки и самцы гельминтов, служит единственным источником заражения для других людей. Зрелая самка способна отложить до 250 000 яиц/сут, причем откладываться могут как оплодотворенные, так и неоплодотворенные яйца. Неоплодотворенные яйца не могут вызвать инвазию. Во внешнюю среду с калом выделяются незрелые яйца гельминтов, и созревание их происходит только при благоприятных для развития температуре и влажности.

Паразитирующие у человека черви (гельминты) принадлежат к одному из двух подтипов — круглых (нематод) и плоских (платод). Последние, в свою очередь, делят на ленточных червей — цестод и сосальщиков — трематод.

В кале наиболее часто обнаруживают яйца следующих гельминтов.

- Нематоды (круглые черви): аскариды (*Ascaris lumbricoides*), власоглав (*Trichocephalus trichiurus*), томинкс (*Thominx aeropilus*), кривоголовка двенадцатиперстная (*Ancylostoma duodenale*), некатор (*Necator americanus*), трихостронгилида (*Trichostrongyloidea*).
- Трематоды (сосальщики): двуустка печеночная (*Fasciola hepatica*), двуустка кошачья (*Opisthorchis felineus*), двуустка ланцетовидная (*Dicrocoelium lanceatum*), шистосома (*Schistosoma mansoni end japonicum*).
- Ленточные черви (цестоды): цепень невооруженный (*Taeniarrhynchus saginatus*), цепень вооруженный (*Taenia solium*), лентец широкий (*Diphyllobothrium latum*), лентец малый (*Diphyllobothrium minus*).

Гельминты проходят последовательные стадии развития: яйца → личинки → половозрелые формы. На различных стадиях развития гельминты предъявляют разнообразные, иногда полярные требования к условиям среды. Например, взрослая аскарида — анаэроб, погибающий в присутствии кислорода, а яйца аскариды, наоборот, не могут развиваться в отсутствие кислорода.

Взрослые половозрелые особи паразитируют у человека (окончательный хозяин). Человек выделяет незрелые яйца и личинки в окружающую среду, где они проходят развитие (обычно в почве). Во внешней среде яйца и личинки дозревают и затем приобретают способность заражать здорового человека, проникая в его ЖКТ с овощами, ягодами, водой или при заносе грязными руками (аскаридоз, трихоцефалез, энтеробиоз). Заражение происходит при проглатывании зрелых яиц. Основное значение имеют овощи, на поверхности которых имеются частички почвы. В настоящее время большую опасность для распространения гельминтозов имеют садово-огородные участки, где используют необезвреженные фекалии человека для удобрения почвы.

Действие гельминтов на организм человека многообразно. Они могут вызывать токсические и токсико-аллергические симптомы (аскариды, трихинеллы), оказывать механическое воздействие, травмируя стенку кишечника. Паразиты (например, анкилостомы) могут вызывать кровотечения, приводящие к анемии, а также способствовать проникновению патогенных микроорганизмов из содержимого кишечника в кровь. Они могут закрывать просвет как кишки, так и выводных протоков печени и поджелудочной железы (аскариды), привести к различному нарушению обмена веществ и авитаминозу (авитаминоз В<sub>12</sub> при инвазии широким лентецом).

Наиболее общие клинические признаки гельминтоза — длительная интоксикация: слабость, вялость, снижение работоспособности,

аппетита, потеря интереса к радостям жизни, похудание, анемия. Периодически отмечают небольшое (не более 38 °С) повышение температуры тела, могут наблюдаться расстройства стула, неприятные ощущения, тяжесть в правом подреберье, непереносимость каких-либо пищевых продуктов.

Микроскопические паразитологические методы лабораторной диагностики служат прямыми методами обнаружения гельминтов, их фрагментов, яиц и личинок гельминтов, вегетативных и цистных форм патогенных простейших, для обнаружения и идентификации которых не требуются косвенные методы исследования.

**Особенности сбора кала.** Фекалии для исследования необходимо собирать в чистую стеклянную или пластиковую посуду и доставлять в лабораторию свежими (желательно еще в теплом виде). В настоящее время имеются различные одноразовые фирменные пластиковые контейнеры с ложечкой и завинчивающейся крышкой, которые позволяют легко собрать пробы кала. Объем фекалий должен быть не менее 1/4 пластикового контейнера, так как небольшие порции испражнений быстро высыхают и яйца гельминтов в них деформируются. Лаборатория должна исследовать кал в день доставки пробы.

При необходимости длительного хранения проб кала, а также с целью исключения влияния неблагоприятных условий при транспортировке, которые могут привести к деформации яиц гельминтов, рекомендуют использовать реагенты для их консервации. Хорошими консервирующими свойствами обладают 1–1,5% растворы стиральных порошков. При этом необходимо использовать растворы стиральных порошков и проб кала в соотношении 1:5.

### 10.1.3.1. АСКАРИДОЗ

Аскаридоз — глистная инвазия, возбудителями которой паразитируют в тонком кишечнике. Возбудителем аскаридоза служит круглый гельминт — аскарида человеческая (*Ascaris lumbricoides*), самая крупная среди кишечных нематод, поражающих человека. Веретеновидное тело покрыто плотной кутикулой. На головном конце выявляются 3 крупные губы. Длина самок 20–40 см, самцов — 15–25 см, хвостовой конец самцов изогнут в виде крючка. Оплодотворенные яйца аскарид эллипсоидной формы, покрыты желтовато-коричневой белковой оболочкой поверх тонкой и прозрачной хитиновой мембраны. Встречают яйца без белковой оболочки. Внутри яиц расположена темная зародышевая клетка. Полюса свободные и прозрачные. Неоплодотворенные яйца крупнее, заполнены желточными клетками. Поверхностная оболочка может быть неравномерно бугристой.

Аскаридоз — наиболее частый гельминтоз, распространенный по всему земному шару. Человек, в кишечнике которого паразитируют самки и самцы аскарид, служит единственным источником инвазии. Зрелая самка способна отложить до 245 000 яиц/сут, как оплодотворенных, так и неоплодотворенных. Неоплодотворенные яйца не могут вызвать инвазию. Во внешнюю среду с калом выделяются незрелые яйца гельминтов, и созревание их происходит только при благоприятных для развития температуре и влажности (продолжительность созревания составляет 16–18 дней). Подвижная личинка, сформировавшаяся в яйце, совершает линьку и только после этого приобретает инвазионную способность. Заражение происходит при проглатывании зрелых яиц.

Из зрелых яиц, проглоченных человеком, в тонкой кишке выходят личинки, которые внедряются в стенку кишки и проникают в кровеносные капилляры, затем гематогенно мигрируют в печень и легкие. Помимо кишечника, печени и легких, личинок аскарид находят в мозге, глазном яблоке и других органах. В легких личинка активно выходит в альвеолы и бронхиолы, продвигается по мелким и крупным бронхам до ротоглотки, где происходит заглатывание мокроты с личинками. Попадая в кишечник, личинка в течение 70–75 сут достигает половой зрелости. Продолжительность жизни взрослой аскариды около года, после чего она гибнет и вместе с калом удаляется наружу. Именно поэтому наличие аскарид на протяжении нескольких лет у одного человека объясняют только повторными заражениями. В период миграции личинок симптоматика заболевания обусловлена в основном аллергическими проявлениями, которые возникают в ответ на сенсибилизацию продуктами обмена и распада личинок. В кишечнике аскариды не прикрепляются, а удерживаются, упираясь своими концами в стенку кишки. Именно поэтому они весьма мобильны, могут спускаться и подниматься по ходу кишечника, проникать в желудок, а далее через пищевод и глотку — в дыхательные пути и даже лобные пазухи.

Тяжелые проявления наступают при проникновении аскарид в печень, поджелудочную железу и другие органы. Взрослые гельминты могут травмировать своими острыми концами стенку кишечника, а скопления аскарид иногда становятся причиной механической кишечной непроходимости. Раздражение нервных окончаний, токсическое влияние на них продуктами жизнедеятельности гельминтов порой становится причиной спастической непроходимости кишечника.

Клинические проявления аскаридоза зависят от локализации паразитов и интенсивности инвазии. В клиническом течении аскаридоза выделяют две фазы — раннюю (миграционную) и позднюю (кишечную).

Первая фаза совпадает с периодом миграции личинок, тогда как вторая обусловлена паразитированием гельминтов в кишечнике и возможными осложнениями. В ранней фазе аскаридоза клинические проявления порой мало выражены, заболевание протекает незаметно. Иногда начало болезни манифестирует с выраженного недомогания, возникает сухой кашель или с незначительным количеством слизистой мокроты, реже слизисто-гноной. Мокрота иногда приобретает оранжевую окраску и имеет небольшую примесь крови. При рентгенологическом исследовании легких отмечают наличие округлых, овальных, звездчатых, фестончатых, многоугольных инфильтратов. Эозинофильные инфильтраты определяют в пределах 2—3 нед; у отдельных больных, исчезнув, они появляются вновь спустя некоторое время, сохраняясь месяцами.

Поздняя (кишечная) фаза аскаридоза связана с пребыванием гельминтов в кишечнике. Иногда она протекает субклинически. Значительно чаще, однако, больные отмечают повышенную утомляемость, изменение аппетита, обычно понижение его, тошноту, иногда рвоту, боли в животе. Последние возникают в эпигастральной области, вокруг пупка или в правой подвздошной области и носят подчас схваткообразный характер. У некоторых больных бывают поносы, у других — запоры или чередование поносов с запорами. Описаны дизентериеподобные, холероподобные и напоминающие брюшной тиф симптомы.

Диагностика ранней миграционной фазы аскаридоза представляет значительную проблему. Достоверное установление аскаридоза в первой фазе основано на обнаружении личинок аскарид в мокроте и специфических антител в крови больных. В кишечной стадии заболевания основным методом считают микроскопическое исследование. При микроскопии препаратов кала обнаруживают яйца возбудителя (размеры 65×45 мкм) с характерной фестончатой поверхностью. Если яйца обнаруживают в дуоденальном содержимом, это может свидетельствовать о наличии паразитов в желчных и панкреатических протоках.

### 10.1.3.2. ЭНТЕРОБИОЗ

Энтеробиоз (*enterobius vermicularis*: от греч. *enteron* — кишечник, *bios* — жизнь; *vermicularis* от лат. *vermis* — червь) — самый распространенный гельминтоз не только в России, но и во многих странах мира с умеренным и холодным климатом.

Возбудитель энтеробиоза — острица *Enterobius vermicularis*. Самки длиной 5—10 мм (составляют до 90% популяции), самцы — 3 мм. На переднем конце тела у женских особей имеется небольшое вздутие

(головная везикула), концевой отдел заострен (отсюда название «острица»), сквозь тело просвечивает матка, заполненная яйцами. У мужских особей хвостовой конец закручен, на его конце расположены половые сосочки. Яйца неокрашенные, прозрачные, с хорошо выраженной оболочкой; форма асимметричная, овальная, одна сторона выпуклая, другая — уплощенная. В яйцах хорошо видны личинки. Средняя продолжительность жизни взрослой особи — 1–2 мес.

Острицы паразитируют в нижней половине тонкой кишки, слепой кишке и начальной части ободочной кишки. Самки остриц спускаются в прямую кишку, активно выходят из заднего прохода, откладывают яйца в его окружности и погибают. Общая продолжительность жизни остриц в организме человека не свыше 3–4 нед. Источником инвазии служит только больной энтеробиозом. Заражение происходит через грязные руки или загрязненные предметы.

Острицы наносят механические повреждения слизистой оболочке кишечника, присасываясь к ней и иногда внедряясь в нее. В результате возникают точечные кровоизлияния и эрозии. Продукты обмена веществ гельминтов вызывают сенсibilизацию организма с развитием аллергии. Самки остриц, проникающие в женские половые органы, заносят бактерии из кишечника, вызывая воспалительные заболевания.

Острицы ведут ночной образ жизни. При легкой форме энтеробиоза вечером при отходе ко сну у больного возникает легкий зуд в перианальной области. Он держится в течение 1–3 дней и затем самопроизвольно исчезает, но через 2–3 нед часто появляется вновь. Такая периодичность в появлении зуда связана со сменой поколений остриц — в результате реинвазии. У женщин заползание остриц в половые органы приводит к возникновению подчас очень тяжелых вульвовагинитов, симулирующих гонорейные поражения.

Дети составляют основную группу зараженных энтеробиозом — чаще всего заражение происходит в возрасте от 3 до 10–14 лет. Максимальную пораженность отмечают у детей в возрасте 4–6 лет. Основные клинические симптомы энтеробиоза:

- боли в животе;
- частая тошнота, рвота;
- утомляемость, раздражительность, тревожный сон, скрип во сне зубами;
- аллергические состояния;
- перианальный зуд;
- вульвовагинит — воспаление слизистой оболочки влагалища;
- инфекции мочевыводящих путей;
- отставание в росте, массе тела.

Основным методом лабораторной диагностики энтеробиоза служит бактериоскопическое исследование соскоба с перианальной области и кала на наличие яиц *Enterobius vermicularis*.

Диагноз энтеробиоза может быть поставлен с полной достоверностью лишь при обнаружении у больного яиц остриц или самих гельминтов. Острицы откладывают яйца преимущественно в перианальной области и очень редко в кишечнике. Именно поэтому в кале обнаружить их обычно не удается.

**Особенности сбора биологического материала.** Для получения биологического материала используют различные методы.

Соскоб с перианальных складок можно получить с помощью деревянного шпателя. Его проводят утром до дефекации. У детей соскоб лучше проводить вечером, через 2–3 ч после того, как ребенок лег спать. Шпатель перед соскабливанием смачивают в 50% растворе глицерола (Глицерина<sup>®</sup>) или 1% растворе натрия гидрокарбоната. Полученный материал вместе со шпателем помещают в чистую стеклянную или пластиковую емкость и доставляют в лабораторию.

Материал с перианальных складок можно собрать, используя ватный тампон на палочке, смоченный 50% раствором глицерола (Глицерина<sup>®</sup>). Условия сбора биоматериала аналогичны приведенным выше. Сбор биоматериала осуществляют тампоном с поверхности перианальных складок у ануса и из нижних отделов прямой кишки. Палочку с тампоном помещают в пробирку и доставляют в лабораторию.

Взятие биоматериала может быть осуществлено с использованием специальной липкой ленты. Ленту клейкой поверхностью наносят на кожу перианальных складок у ануса, а затем снимают и переносят (наклеивают) на предметное стекло (лучше брать несколько проб). Предметное стекло помещают в специальный контейнер и доставляют в лабораторию. При микроскопии в полученном материале можно обнаружить яйца остриц или взрослых паразитов.

Иногда яйца остриц можно обнаружить в содержимом подногтевых пространств, а взрослых гельминтов — в свежесвыделенных фекалиях.

### 10.1.3.3. МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ ЯИЦ ГЕЛЬМИНТОВ В КАЛЕ

Микроскопические методы обнаружения яиц в кале можно разделить на простые, к которым относят исследование нативного мазка и метод толстого мазка по Като, и сложные (или методы обогащения). Сложные методы считают более эффективными, они основаны на концентрации яиц в препаратах. Они включают предварительную обработку фекалий жидкими реактивами, в результате чего яйца гельминтов или выпадают в осадок, или всплывают на поверхность жидкости, поэтому их назы-

вают седиментационными (когда относительная плотность яиц больше относительной плотности солевых растворов, и яйца оседают в осадок) и флотационными методами (когда удельный вес яиц меньше удельного веса солевого раствора и яйца всплывают в поверхностную пленку).

#### 10.1.3.3.1. Микроскопическое исследование нативного мазка

Небольшую частицу кала берут деревянной палочкой из различных участков доставленной пробы, хорошо растирают на предметном стекле в капле 50% раствора глицерола (Глицерина<sup>\*</sup>) и делают на 2–3 предметных стеклах тонкие мазки.

Препарат накрывают покровным стеклом и микроскопируют сначала при малом увеличении микроскопа (окуляр 7×, объектив 20×), а затем при большом (окуляр 7×, объектив 40×).

При микроскопии мазков яйца аскарид имеют овальную форму с бугристой бурой белковой оболочкой (рис. 10.8, см. цв. вклейку). Она может отсутствовать, тогда оболочка яиц гладкая двухконтурная. Оплодотворенные яйца имеют размеры 45–78×35–60 мкм, содержимое на полюсах отстает от оболочки. Неоплодотворенные яйца длиннее, неправильной формы, с грубозернистым содержимым, имеют размеры 80–90×35–60 мкм.

Яйца остриц имеют овальную форму, размеры 50–60×20–32 мкм, с одной стороны уплощены, бесцветны и прозрачны (рис. 10.9, см. цв. вклейку).

#### 10.1.3.3.2. Метод толстого мазка под целлофаном по Като

Толстый мазок представляет собой тонкий слой пробы кала на предметном стекле под гигроскопическим целлофаном, пропитанным смесью глицерола (Глицерина<sup>\*</sup>), фенола и малахитового зеленого. При просветлении глицеролом (Глицерином<sup>\*</sup>) и подкрашивании малахитовым зеленым в толстом мазке легче выявить яйца гельминтов.

##### Реактивы

- Глицерол (Глицерин<sup>\*</sup>).
- Фенола 6% раствор: 100 мл дистиллированной воды + 6 г фенола.
- Малахитовой зелени 3% раствор.
- Рабочий раствор Като: 100 мл 6% раствора фенола + 100 мл чистого глицерола (Глицерина<sup>\*</sup>) + 1,2 мл 3% раствора малахитовой зелени (раствор можно хранить длительное время в склянке из темного стекла с притертой крышкой).
- Целлофановые полоски: нарезают полоски из целлофана, размер которых соответствует предметному стеклу. Целлофан должен быть гидрофильный (пригоден тот, который горит; если плавится, то непригоден). В 200 мл рабочего раствора можно обрабаты-



вать до 5 тыс. новых целлофановых полосок. Срок экспозиции целлофановых полосок до готовности к употреблению в рабочем растворе не менее 24 ч.

#### Ход исследования

- На предметное стекло наносят 50 мг кала (величиной с крупную горошину), растирают индивидуальной палочкой (стеклянной, деревянной), накрывают целлофановой полоской и сверху прижимают резиновой пробкой до получения равномерного толстого мазка. Препарат высушивают при комнатной температуре в течение 1 ч или в термостате при 40 °С в течение 20–30 мин и микроскопируют (время выдержки можно увеличить при комнатной температуре до 5–6 ч и более).
- Препарат микроскопируют при увеличении: объектив 8× или 10×, окуляр 7× или 10× (для уточнения морфологического строения яиц гельминтов — объектив 40×).

#### 10.1.3.3.3. Метод исследования перианального отпечатка с применением липкой ленты по Грэхэму

Метод исследования перианального отпечатка с применением липкой ленты используют для диагностики энтеробиоза. Последовательность действий при практическом использовании метода следующая.

- Подготовить отрезок липкой ленты длиной 8–10 см, предварительно наклеить его на предметное стекло.
- Перед взятием анализа отклеить полоску липкой ленты от предметного стекла, держа полоску за концы, плотно прижать всей липкой поверхностью к перианальным складкам, стараясь пальцами рук не касаться перианальной области.
- Отклеить полоску липкой ленты от кожи перианальной области и липким слоем вниз ленту перенести на предметное стекло, приклеить к стеклу равномерно для предотвращения образования воздушных пузырей, мешающих микроскопии.
- Концы ленты, выходящие за края стекла, отрезать.
- Микроскопировать при увеличении: объектив 8× или 10×, окуляр 7× или 10×.

#### 10.1.3.3.4. Метод формалин-эфирной седиментации

Сущность метода состоит в трехкратном сборе кала в специальный пластиковый контейнер с ложечкой, который содержит 5–6 мл консерванта Турдыева. Сбор проводят в течение 3 дней при ежедневном стуле, при склонности к запорам интервал сбора материала увеличивается. Рекомендуемый объем фекалий с каждого стула — горошина. Соотношение суммарного объема, трехкратно собранного материала

(с лесной орех) и консерванта Турдыева — 1:3. Флакон с консервирующей жидкостью при добавлении очередной порции фекалий встряхивают до получения гомогенной взвеси.

#### Реактивы

- Формалин концентрированный.
- Формалина 5–10% раствор.
- Эфир этиловый.
- Натрия хлорида 0,9% раствор.
- Глицерол (Глицерин<sup>\*</sup>).
- Фиксирующий раствор Турдыева: 80 мл 0,2% раствора натрия азотнокислого (0,16 г  $\text{NaNO}_2$  + 80 мл дистиллированной воды) + 2 мл глицерола (Глицерина<sup>\*</sup>) + 10 мл концентрированного формалина + 8 мл концентрированного раствора Люголя (10 г калия иодида растворить в 30 мл дистиллированной воды + 5 г йода кристаллического, размешать до полного растворения и долить до 100 мл дистиллированной водой; хранить во флаконе из темного стекла).
- 2% раствор Люголя.

#### Ход анализа

- Доставленный в лабораторию пластиковый контейнер с калом тщательно встряхивают или перемешивают стеклянной палочкой.
- В центрифужную пробирку помещают стеклянную воронку и на нее 2 слоя марли.
- Фильтруют не менее 8 мл суспензии из контейнера (если объем фильтрата будет меньше, добавляют 10% раствор формалина до 8 мл).
- В пробирку доливают 2 мл эфира и закрывают пробкой.
- Пробирку энергично встряхивают в течение не менее 30 с.
- Затем пробирку центрифугируют со скоростью 1500 об./мин в течение 2 мин или 2000 об./мин в течение 1 мин.
- После центрифугирования в пробирке образуются 4 слоя: осадок, раствор формалина, коагулированный белок, фекальный детрит — «пробка», а сверху эфир с растворенными в нем жирами (окрашен в желтый цвет).
- Верхние три слоя удаляют резким опрокидыванием пробирки.
- Осадок пипеткой переносят на предметное стекло, эмульгируют его в капле раствора Люголя, накрывают покровным стеклом и исследуют под микроскопом.
- Препараты микроскопируют при увеличении: объектив 8× или 10×, окуляр 7× или 10×, для уточнения морфологического строения яиц гельминтов — объектив 40×.

Метод седиментации может быть модифицирован с применением одноразовых концентраторов.

### 10.1.3.3.5. Метод исследования кала с применением флотационных растворов

В данном методе используемый для подготовки суспензии кала флотационный раствор имеет большую относительную плотность, чем яйца гельминтов. Яйца всплывают на поверхность, из образующейся пленки готовят препараты и микроскопируют.

#### Реактивы

Готовят один из двух флотационных растворов.

- Раствор № 1. Раствор натрия нитрата ( $\text{NaNO}_3$ ) или натрия азотнокислого (метод предложен В. Калантарян) с плотностью 1,38–1,40. Раствор готовят из расчета 1000 г одной из солей на 1 л горячей воды.
- Раствор № 2. Насыщенный раствор натрия хлорида ( $\text{NaCl}$ ) с плотностью 1,18–1,20 (метод предложен Б. Фюллеборном) готовят из расчета 400–420 г соли на 1 л горячей воды.

Одну из солей растворяют в горячей воде в эмалированной посуде, причем кладут соль в емкость с горячей водой порциями при подогревании на плите и постоянном перемешивании до полного растворения.

Относительную плотность флотационных растворов измеряют ареометром только после остывания раствора при комнатной температуре. Измерение относительной плотности флотационных растворов строго обязательно, так как приготовление раствора по прописи не гарантирует получение нужного значения относительной плотности (например, когда используемая соль недостаточно химически чистая).

Фильтровать приготовленные растворы необязательно. Если раствор приготовлен в большом количестве, то в последующие дни перед исследованием его подогревают с размешиванием осадка и после остывания снова измеряют ареометром относительную плотность.

#### Ход исследования

- В химический стакан объемом 30–50 мл налить небольшое количество одного из двух флотационных растворов.
- Поместить в стакан 2,5 г кала.
- Тщательно размешать кал стеклянной палочкой (индивидуальной для каждого обследуемого).
- Сразу же после размешивания удалить всплывшие крупные частицы палочкой (или ложечкой).
- Постепенно в стакан с калом добавить солевой раствор до образования выпуклого мениска.

- Приготовление препаратов. К поверхности солевого раствора приложить предметное стекло, то есть накрыть стакан предметным стеклом. Предметное стекло должно полностью соприкасаться с поверхностью раствора. Раствор отстаивают в течение 20–30 мин.
- Предметное стекло снять и просмотреть под микроскопом без покровного стекла всю пленку, прилипшую к поверхности предметного стекла. Чтобы избежать высыхания препарата, пленку можно смещать с 2 каплями 50% раствора глицерола (Глицерина<sup>®</sup>).
- Микроскопировать при увеличении: объектив 8×, 10×, окуляр 7×, 10×; уточнение морфологического строения — объектив 40×.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ

1. Кто такие паразиты?
2. Перечислите основных возбудителей паразитарных заболеваний.
3. Перечислите возбудителей протозойных инфекций.
4. Назовите стадии жизненного цикла паразитов.
5. Каковы клинические проявления малярии?
6. Назовите виды плазмодиев.
7. Что такое спорогония?
8. Что такое шизогония?
9. Какие пробы крови исследуют для диагностики малярии?
10. Какие особенности приготовления мазка крови используют для диагностики малярии?
11. Кто такие простейшие и какие заболевания они вызывают?
12. Какие формы наблюдают в жизненном цикле простейших?
13. Перечислите особенности жизненного цикла простейших.
14. В каких формах в организме человека существует дизентерийная амеба?
15. Перечислите основные методы обнаружения простейших в кале.
16. Что такое гельминтоз?
17. Какие последовательные стадии развития проходят гельминты?
18. Какое действие оказывают на организм человека гельминты?
19. Какой гельминтоз является самым распространенным?
20. Какие фазы выделяют в клиническом течении аскаридоза?
21. Какие методы получения биологического материала используют для диагностики энтеробиоза?
22. Перечислите методы обнаружения яиц гельминтов в кале.



Рис. 10.4 Большая вегетативная форма дизентерийной амебы



Рис. 10.5. *Lamblia intestinalis*

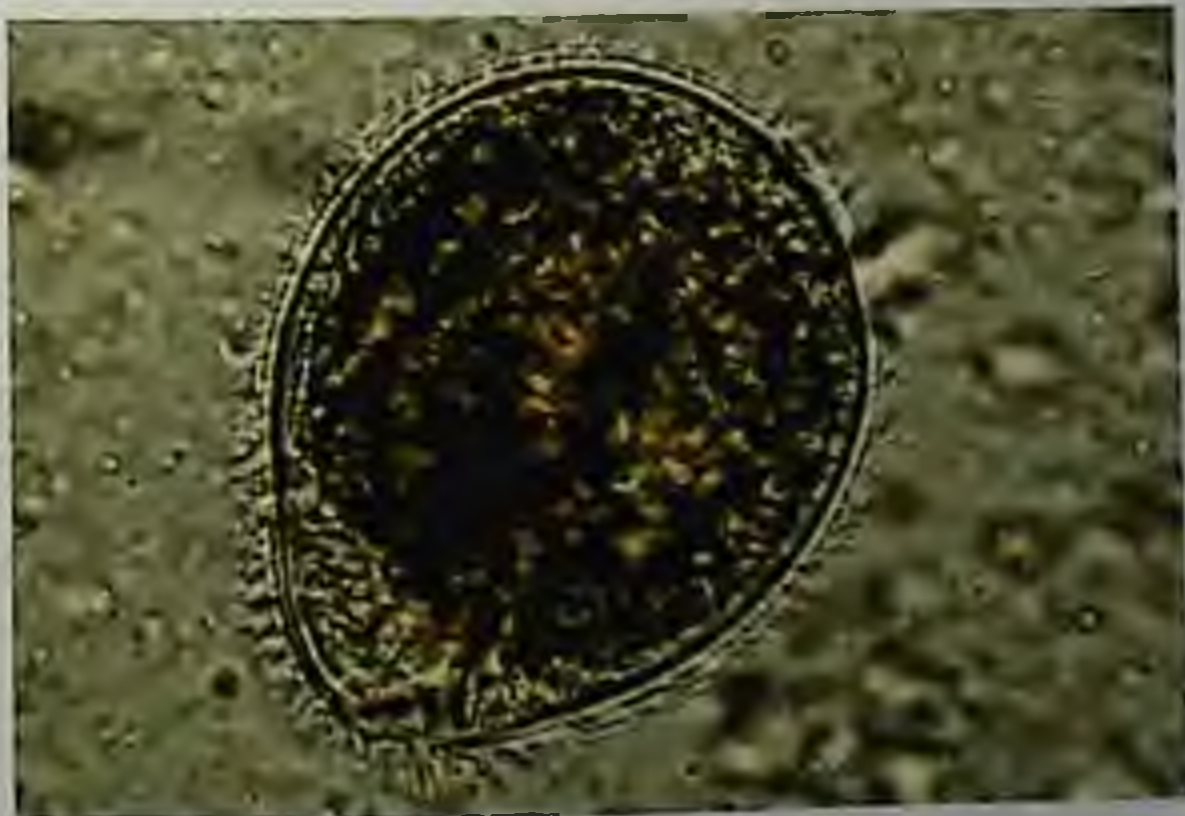


Рис. 10.6. Балантидий

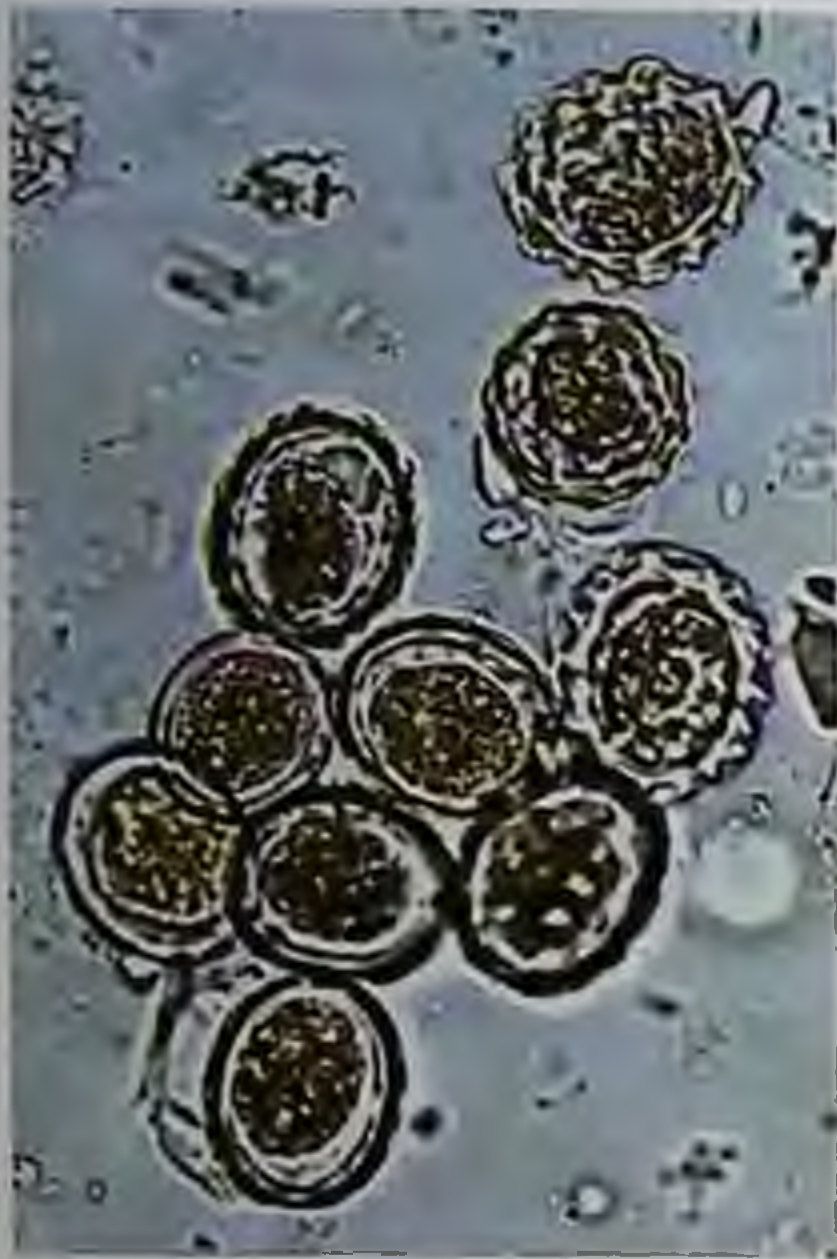


Рис. 10.8. Яйца аскарид



Рис. 10.9. Яйца остриц



Рис. 18.23. «Пестрый ряд»

# ТЕОРИЯ И ПРАКТИКА ЛАБОРАТОРНЫХ ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Важнейшей задачей КДЛ при проведении цитологических исследований служит диагностика, по возможности ранняя, злокачественных опухолей. Наиболее широко в клинической практике цитологические исследования применяют для диагностики рака шейки матки и злокачественных опухолей легких.

## 11.1. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ЦИТОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ОПУХОЛЕЙ

Злокачественная опухоль характеризуется рядом морфологических признаков, выявляемых при гистологическом и цитологическом исследовании. К ним относятся:

- тканевый или структурный атипизм опухоли — отклонения в структурной организации паренхимы и стромы опухоли по сравнению с исходными нормальными тканями, а также нарушения в расположении клеток;
- клеточный атипизм — неправильность строения опухолевых клеток, изменения их функции;
- морфологическая анаплазия — недифференцированность, незрелость опухолевых клеток.

Злокачественная опухоль обладает способностью к инфильтрирующему, инвазивному росту, то есть к прорастанию в окружающие ткани, просвет кровеносных и лимфатических сосудов, создавая предпосылки к метастазированию.

Гистологическое исследование биологического материала из опухоли позволяет оценить все указанные выше морфологические признаки

новообразования. Цитологическое исследование в состоянии выявлять в основном только признаки атипизма и анаплазии опухолевых клеток. Однако эти признаки с помощью цитологического исследования диагностируют особенно отчетливо.

В соответствии с принятой методикой проведения цитологических исследований ответ о результатах анализа состоит из описательной части и заключения. Заключение должно содержать указание на тот или иной патологический процесс (новообразование, гиперпластическое состояние, воспаление) по возможности с максимальным раскрытием его существа (например, рак из железистого эпителия с выраженной степенью дифференцировки паренхимы). Его можно давать в уверенной или предположительной форме, иногда с указанием на необходимость дифференцировать (выбирать) несколько патологических процессов. В заключении также может быть указано на невозможность суждения о процессе из-за малого числа клеток, их дистрофии, повреждений, а также нарушений взятия биологического материала.

Трудности цитологической диагностики опухолей привели к созданию типов (классификаций) заключений. Наибольшее распространение в мире получила классификация цитологических заключений по Г.Н. Папаниколау. Она включает пять групп.

**Группа I** — атипичных клеток нет. Нормальная цитологическая картина, не вызывающая подозрений.

**Группа II** — изменение морфологии клеточных элементов, обусловленных воспалением.

**Группа III** — имеются единичные клетки с аномалиями цитоплазмы и ядер, но окончательный диагноз установить не удастся. Требуется повторное цитологическое исследование, по рекомендации — гистологическое.

**Группа IV** — обнаруживают отдельные клетки с явными признаками злокачественности.

**Группа V** — в мазках имеется большое количество типичных раковых клеток. Диагноз злокачественного процесса не вызывает сомнений.

Оценивая результаты цитологических исследований, следует иметь в виду, что термин «атипичная клетка» не обязательно означает «клетка злокачественной опухоли». Клетки могут приобретать признаки атипии, оставаясь все же доброкачественными, неопухолевыми. Необходимо также понимать, что отсутствие клеток злокачественной опухоли в исследуемом биологическом материале не служит доказательством отсутствия новообразования у больного.



Не менее важно знать и сроки выполнения цитологических исследований. Общепринятыми сроками получения результатов цитологических исследований считаются при исследовании:

- срочном во время операции — 20–30 мин;
- плановом — не позднее чем через 48 ч с момента поступления биологического материала в лабораторию.

## 11.2. ЦИТОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МАЗКОВ ИЗ ШЕЙКИ МАТКИ

Главное достоинство цитологического исследования мазков из шейки матки в том, что изменения морфологии клеток поверхностного эпителия шейки матки происходят иногда за 8–15 лет до развития рака шейки матки, поэтому регулярное исследование мазков позволяет обнаружить заболевание на ранних стадиях и путем проведения лечебных мероприятий предупредить его развитие. Все женщины должны регулярно проходить такое исследование.

### 11.2.1. АНАТОМИЯ И ЭПИТЕЛИЙ ШЕЙКИ МАТКИ

Шейка матки (цервикс, от греч. *cervix* — шея) — структура, которая служит переходным звеном между телом матки и влагалищем (рис. 11.1). Это трубчатая структура длиной 3–4 см и шириной не более 4 мм, внутри которой проходит цервикальный канал, соединяющий полость матки и влагалище. Шейка матки состоит из 4 анатомических образований. Самая нижняя часть шейки матки, которая выступает во влагалище, — экзоцервикс. В центре экзоцервикса имеется маленькое отверстие, ведущее в эндоцервикальный канал, которое называют наружным зевом. Эндоцервикальный канал — трубка, которая соединяет внутренний зев и влагалище (наружный зев) и служит первой частью родовых путей. У нерожавших женщин наружный зев округлой формы, а у рожавших — в виде поперечной щели. За счет анатомических сужений (наружный и внутренний зев), а также слизи, заполняющей цервикальный канал, шейка матки служит барьером между влагалищем, заселенным множеством микроорганизмов, и стерильной полостью матки.

Поверхность шейки матки покрыта слоем эпителиальных клеток (эпителия). Эти эпителиальные клетки, которые формируют защитный слой шейки матки, и служат основной целью изучения при проведении исследования. Имеется два типа эпителия: многослойный плоский,



Рис. 11.1. Матка, цервикальный канал, яичники, влагалище

который покрывает эктоцервикс, и призматический, выстилающий эндоцервикальный канал. В многослойном плоском эпителии различают четыре слоя клеток:

- базальный слой — самый глубокий, состоит из незрелых (базальных) эпителиальных клеток, расположенных в 1 ряд на базальной мембране, которая отделяет многослойный плоский эпителий от подлежащей соединительной ткани;
- парабазальный слой — состоит из незрелых (парабазальных) клеток, которые располагаются над базальными клетками в 2–3 ряда и постоянно делятся, чтобы поддерживать целостность эпителия;
- промежуточный слой, состоящий из 6–12 рядов более зрелых клеток;
- поверхностный слой, состоит из 5–18 рядов эпителиальных клеток, которые проявляют тенденцию к ороговению и постоянному обновлению за счет непрерывного слущивания.

Процесс, в результате которого клетки поверхностного слоя постепенно утрачивают связь друг с другом и слущиваются с поверхности эктоцервикса, называют десквамацией эпителия. Постоянное обновление клеток базальных слоев многослойного плоского эпителия обеспечивает замещение клеток, слущенных с поверхности эктоцервикса.

Большинство клеток, обнаруживаемых в мазках при исследовании, происходит из промежуточного и поверхностного слоя. Цикл обновления клеток составляет в среднем 4 дня. Интенсивность слущивания зависит от фазы менструального цикла (максимальная — к концу I фазы и в период овуляции). В этот период поверхностные клетки преобладают в цитологических мазках с шейки матки. Клетки парабазального слоя составляют не более 3–6% всех эпителиальных клеток нормального мазка молодых женщин. У пожилых женщин в мазках содержится больше парабазальных клеток, а заболевания шейки матки как раз и проявляются значительным увеличением парабазальных клеток в мазках. Базальные клетки в силу того, что они расположены в глубине эпителиального слоя, редко обнаруживают в мазках.

Слизистая оболочка эндоцервикального канала покрыта высоким призматическим эпителием. Клетки расположены в I ряд. Часть клеток секретирует слизь, другие имеют на своей поверхности реснички. Слизь и реснички облегчают продвижение сперматозоидов через эндоцервикальный канал в полость матки. Под призматическим эпителием нередко обнаруживают резервные (камбиальные) клеточные элементы.

Два вида эпителия — многослойный плоский и призматический — контактируют в области наружного маточного зева. Эту область контакта двух видов эпителия называют границей (стыком) между ними (рис. 11.2). Она играет важнейшую роль в формировании патологических процессов этой локализации, так как именно в данной зоне они развиваются наиболее часто, в том числе большинство случаев рака шейки матки. С периода новорожденности до окончания пубертатного периода развития девочек граница между видами эпителия лежит у наружного зева. Однако в ответ на гормональные изменения, которые происходят в период полового созревания, призматический эпителий распространяется за пределы наружного зева, поэтому у взрослых женщин граница проходит по эктоцервиксу. Распространение призматического эпителия из канала на эктоцервикс называют эктопией. Затем происходит трансформация: плоский эпителий начинает расти поверх призматического. Участок эктоцервикса, где происходит такая трансформация призматического эпителия в плоский, называют зоной трансформации. Трансформированные эпителиальные клетки называют метапластическими. В период менопаузы у женщин граница между плоским и призматическим эпителием отступает обратно в цервикальный канал, становясь недоступной для визуального осмотра.

Знание анатомии расположения границы стыка двух видов эпителия имеет главное значение для правильного взятия мазков и соответственно получения адекватных результатов анализов.

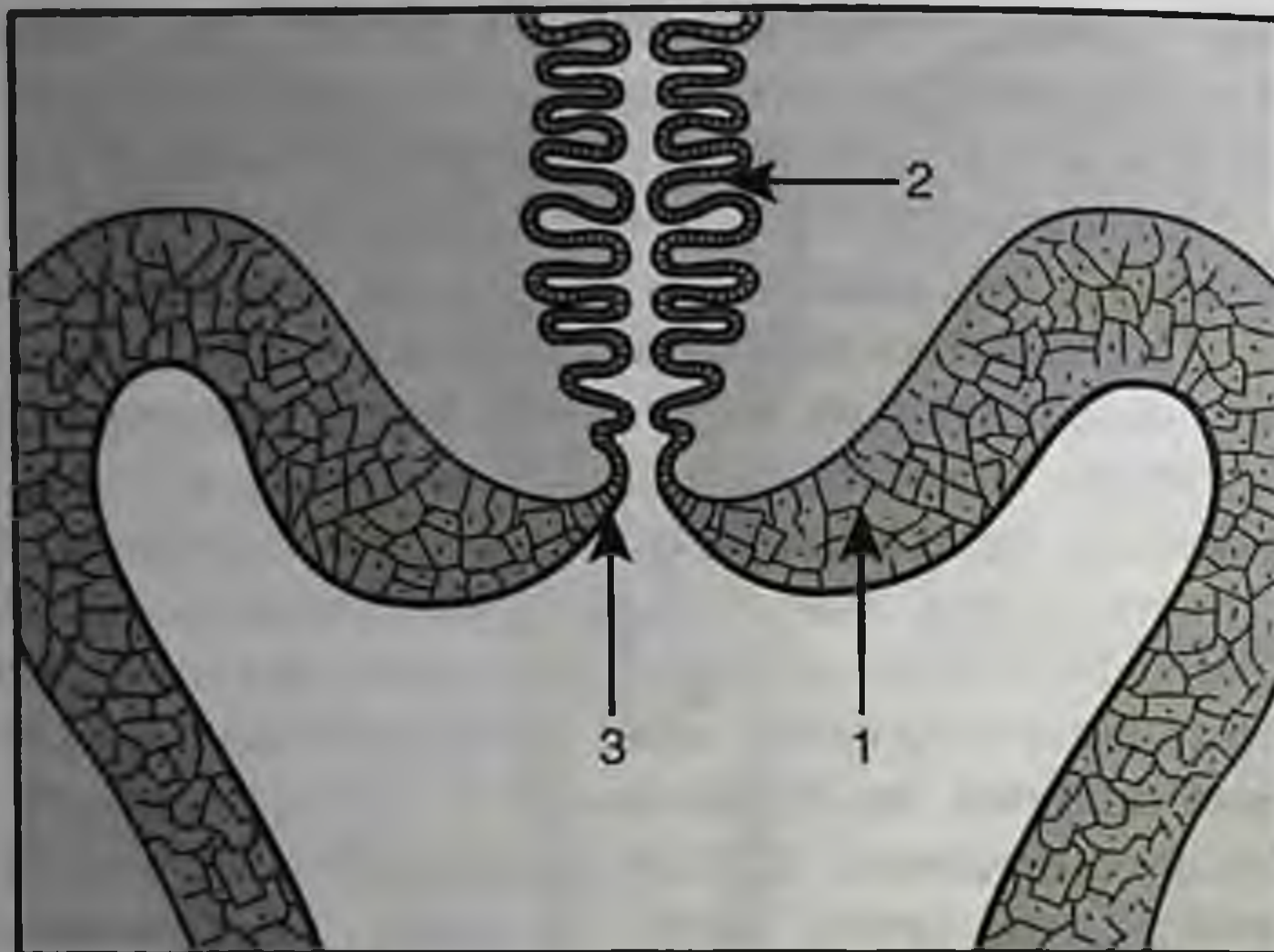


Рис. 11.2. Расположение призматического эпителия и зоны стыка в шейке матки: 1 — многослойный плоский эпителий; 2 — призматический эпителий; 3 — зона стыка

### 11.2.2. РАК ШЕЙКИ МАТКИ

Рак шейки матки возникает не сразу. В большинстве случаев он имеет длительный латентный период. Определенные предраковые изменения в эпителии происходят в течение 8–15 лет до развития инвазивного рака. Исследование мазков из шейки матки играет важнейшую роль в предупреждении развития рака этой локализации. Основная цель исследования — обнаружение изменений клеток эпителия шейки матки, которые обычно предшествуют появлению рака. Обнаружение этих предраковых изменений и их соответствующее лечение позволяют предотвратить развитие рака шейки матки.

В 80–90% случаев рак шейки матки развивается на границе между плоским и призматическим эпителием. Однако задолго до его развития на границе двух типов эпителия наблюдают микроскопические изменения плоского эпителия, которые называют дисплазией. Дисплазия обычно связана с инфицированием вирусом папилломы человека и служит потенциально прогрессирующим состоянием. Ее не видно невооруженным взглядом и можно определить только при цитологическом исследовании мазков из патологически измененной шейки матки, так и у здоровых женщин. Если пациентку не начать лечить, то дисплазия может привести к развитию рака шейки матки.

Дисплазии шейки матки бывают трех степеней (чем глубже процесс, тем тяжелее дисплазия):

- I — легкая степень, которая проявляется клеточными изменениями, ограниченными нижней третью эпителия (базальным и пара-базальным слоем);
- II — умеренная степень, при которой клеточные изменения затрагивают 2/3 слоев эпителия;
- III — тяжелая степень, при которой измененные клетки при микроскопии видны по всей толщине эпителиального пласта.

Установление степени дисплазии имеет важное практическое значение, она определяет риск развития инвазивного рака. Пациентки с дисплазией I степени подвержены относительно низкому риску. У большинства женщин (примерно 50%) дисплазия разрешается (исчезает) без лечения (самостоятельно). В остальных случаях дисплазия I степени может сохраняться (персистировать) без каких-либо проявлений, а у небольшого числа пациенток прогрессировать во II, а затем и III степень. Примерно 30% пациенток с дисплазией III степени при отсутствии лечения заболевают инвазивным раком в течение 8–10 лет, поэтому риск развития инвазивного рака наивысший при дисплазии III степени. Лечение дисплазии предупреждает развитие рака почти во всех случаях.

Окончательный диагноз дисплазии устанавливают при проведении гистологического исследования. Для этого проводят биопсию и берут кусочек ткани из шейки матки. Именно поэтому цитологическое исследование мазков из шейки матки необходимо рассматривать как скрининговый метод обследования женщин в целях предупреждения заболевания раком шейки матки.

### 11.2.3. ОСОБЕННОСТИ ВЗЯТИЯ МАЗКОВ ИЗ ШЕЙКИ МАТКИ

При взятии мазков из шейки матки необходимо учитывать фазу менструального цикла у женщин и соблюдать следующие условия.

- Желательно брать мазки не ранее чем на 5-й день менструального цикла и не позднее чем за 5 дней до предполагаемого начала менструации. Наилучшее время для взятия мазков — середина менструального цикла. Это помогает избежать загрязнения мазков менструальной кровью.
- После родов лучше отложить взятие мазков на несколько месяцев.
- Нельзя брать мазки в течение 24 ч после сексуального контакта, спринцевания, введения во влагалище медикаментов, свечей, кремов, в том числе кремов для выполнения ультразвукового

исследования (все это может повлиять на истинную картину строения клеток шейки матки).

Техника взятия мазка играет очень важную роль для получения правильных результатов. Примерно 15–20% мазков берутся неправильно, поэтому их нужно взять заново (повторно). Навыки правильного взятия мазков приобретаются путем тренировки и опыта.

Чтобы увидеть шейку матки, врач вводит во влагалище гинекологическое зеркало. После удаления выделений из влагалища осуществляют забор материала. Эта совершенно безболезненная процедура занимает 5–10 с.

Клетки берут с места, где проходит граница между двумя типами эпителия, так, чтобы мазок содержал клетки плоского и эндоцервикального эпителия. Поскольку положение границы изменяется с возрастом, при взятии мазков необходимо учитывать этот фактор. Обычно используют несколько инструментов (рис. 11.3). Для взятия клеток

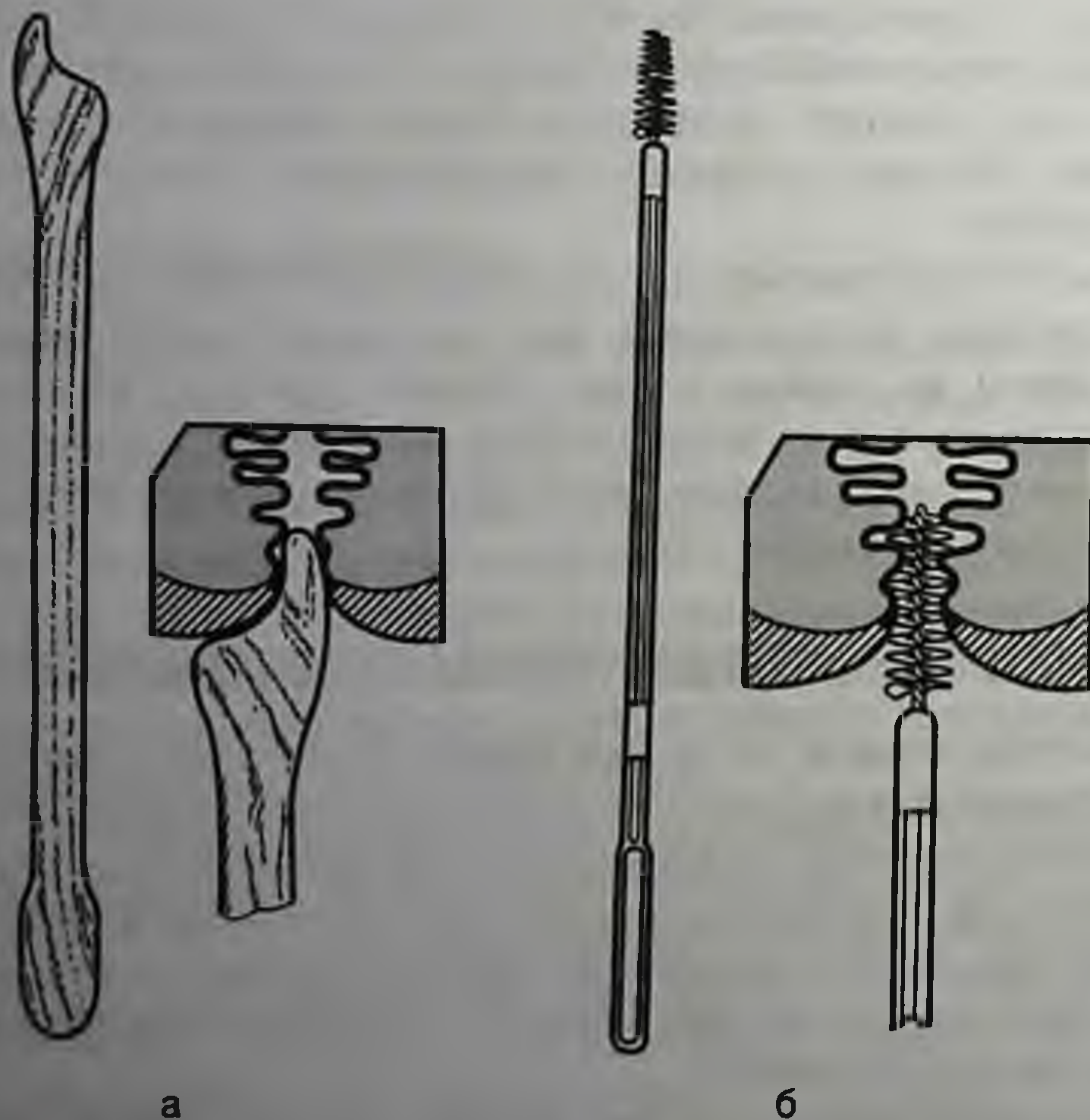


Рис. 11.3. Приспособления для взятия клеток из эндоцервикального канала: а – шпатель Эйра для взятия материала с поверхности шейки матки, б – щеточка для взятия материала из цервикального канала

из эндоцервикального канала применяют эндоцервикальную цитощеточку. Щеточку вводят в наружный зев шейки матки, осторожно направляют центральную часть ее по оси цервикального канала. Далее цитощеточку поворачивают на  $360^\circ$  (желательно до 3–4 раз) по часовой стрелке, достигая тем самым взятия достаточного количества клеток с эктоцервикса и зоны трансформации. Введение инструмента необходимо выполнять очень бережно, стараться не повредить шейку матки. Затем цитощеточку выводят, и материал распределяют на стекле. Перенос образца на предметное стекло должен происходить быстро, без подсушивания и потери прилипших к инструменту слизи и клеток. Материал необходимо распределить по предметному стеклу тонким слоем, чтобы весь он оказался на стекле. Необходимо зафиксировать влажный препарат сразу после его приготовления. Для этого предметные стекла помещают в 90–96% раствор этанола на 10–15 мин. Стекло высушивают на воздухе, помещают в пластиковую коробку и доставляют в лабораторию.

Для получения клеток из зоны трансформации эктоцервикса используют шпатель Эйра, который имеет выступающий наконечник для введения в наружный зев. Полная окружность зоны трансформации может быть охвачена при вращении шпателя на  $360^\circ$ . Образец переносят на маркированное данными пациента предметное стекло так, чтобы на него попал биологический материал с обеих сторон шпателя. Если использовали несколько шпателей, материал с каждого следует перенести на отдельное предметное стекло. Важно, чтобы клетки в образце были немедленно зафиксированы. Для этого предметные стекла помещают в 90–96% раствор этанола на 10–15 мин. Стекло высушивают на воздухе, помещают в пластиковую коробку и доставляют в лабораторию.

В настоящее время все большее распространение получает метод жидкостной цитологии. Главным отличием данного метода от традиционного считают то, что взятый биологический материал не переносят сразу на предметное стекло, а помещают во флакон со стабилизирующим раствором. Последний обеспечивает сохранность морфологических особенностей клеток. В лаборатории из доставленного во флаконе биоматериала с помощью специальных цитоцентрифуг готовят многослойные препараты.

В лаборатории мазки окрашивают и подвергают исследованию под микроскопом. Если будет обнаружено, что мазок выполнен ненадлежащим образом, лаборатория запросит повторную пробу, что создает определенные трудности и для медицинской сестры, и для пациента. Именно поэтому важно знать, какие причины приводят к неправиль-

ному взятию образца. К наиболее распространенным причинам относят следующие:

- в мазках присутствует неадекватное количество эпителиальных клеток вследствие того, что соскоб с шейки матки был сделан с недостаточным нажимом или образец был не полностью перенесен на стекло;
- в препарате присутствует большое число клеток крови вследствие чрезмерного нажима при взятии биоматериала;
- в мазках не представлена граница двух типов эпителия (например, отсутствуют эндоцервикальные или метаплазированные клетки);
- материал неравномерно распределен на стекле (мазок слишком тонкий или толстый);
- клетки плохо зафиксированы вследствие длительного пребывания образца на воздухе до фиксации или несоблюдения времени фиксации;
- образец загрязнен, например, кровью, спермой, смазкой с презерватива, гелем для ультразвукового исследования или тальком (если перед взятием мазков пациентке проведено бимануальное исследование влагалища).

При микроскопическом исследовании в лаборатории примерно в 80–90% правильно взятых мазков не выявляют патологических изменений. Таким женщинам не требуется проведения дополнительных диагностических мероприятий. Повторный вызов пациенток для взятия мазка в этих случаях необходим через 1–3 года (в зависимости от местных методических указаний). У нас в стране у женщин репродуктивного возраста мазки из шейки матки рекомендуется брать для исследования не реже чем 1 раз в год. В оставшихся 10–20% мазков обнаруживают изменения строения клеток шейки матки различной степени выраженности: от доброкачественных до дисплазии и инвазивного рака. Рак выявляют примерно в 1 случае из 1000 мазков.

Исследование мазков из шейки матки — скрининговый тест. Он позволяет исключить из дальнейшего обследования 80–90% женщин с отрицательным результатом. В этом заключается его основная ценность. У остальных 10–20% женщин степень тяжести изменений в мазках определяет последующие шаги. Большинство мазков с патологическими изменениями имеют слабую степень дисплазии. Вероятность того, что эти изменения подвергнутся обратному развитию, достаточно велика, но имеется небольшая доля риска, что со временем разовьются предраковые изменения. Именно поэтому таким пациенткам показано активное наблюдение (например, проходить повторные обследования через 3 или 6 мес), пока атипия не разрешится. Женщин, в мазках кото-



рых обнаружена дисплазия II и III степени в двух последовательных наблюдениях, обычно направляют на кольпоскопию (диагностическая процедура, во время которой шейку матки исследуют через специально модифицированный микроскоп) с проведением биопсии подозрительных участков. Результаты кольпоскопии и биопсии определяют лечение, которое может быть предложено пациентке.

## 11.3. ЦИТОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МОКРОТЫ

Рак легких считают одним из наиболее распространенных онкологических заболеваний, для которого характерен высокий уровень смертности. Ежегодно в мире диагностируют около 10 млн новых случаев рака легких, причем половина пациентов погибают в течение 1-го года после установки диагноза. Высокую смертность объясняют тем, что заболевание диагностируют слишком поздно — по статистике, лишь 25% случаев рака легких выявляют на ранних стадиях. В России рак легкого занимает 1-е место в структуре онкологической заболеваемости у мужчин. Пятилетняя выживаемость всех больных раком легкого не превышает 10–15%, а при мелкоклеточном раке — 1–3%.

Клиническая симптоматика рака легкого во многом определена локализацией опухоли (центральный, периферический рак), стадией заболевания. На ранних этапах развития новообразования особое значение имеет клиничко-анатомическая форма опухоли.

В целях ранней диагностики рака легкого проводят массовые обследования (цитологическое исследование мокроты и рентгенографию грудной клетки) мужчин из группы риска (возраст старше 45 лет, количество выкуриваемых в день сигарет 40 и более).

Объектами цитологического исследования служат мокрота, биологический материал, полученный при бронхоскопии (мазки и соскобы слизистой оболочки бронхов, аспираты бронхиального секрета и промывных вод, кусочки ткани биопсии). Полученный биологический материал необходимо немедленно доставить в лабораторию. Обычно при назначении цитологического исследования мокроты больной должен собрать 3 порции мокроты в течение 3 дней. В сомнительных случаях исследование повторяют 4–5 раз. Вероятность обнаружения клеток злокачественных новообразований повышается с увеличением числа исследований.

При первичном обследовании рак легкого обнаруживают у 4–8 человек из 1000 пациентов, остальных обследуют повторно с интервалами 4 мес. В течение года рак легкого выявляют еще у 4 человек из 1000.

При проведении скрининговых обследований диагноз рака легкого в 72% случаев устанавливают с помощью рентгенографии грудной клетки, в 20% — с помощью цитологического исследования мокроты и лишь в 6% случаев — обоими методами. На момент установления диагноза 90% больных обычно не имеют клинических проявлений рака легкого, и у примерно 62% опухоль является операбельной. Вместе с тем скрининговые обследования пациентов на раннее выявление рака легкого показывают, что они не влияют на 5-летнюю выживаемость. Причиной низкой выживаемости пациентов служат мелкие, не выявляемые метастазы рака, которые образуются на самых ранних стадиях болезни.

Успех цитологической диагностики зависит от правильного собирания мокроты и ее обработки, а также точной интерпретации цитологической картины. Для анализа следует брать утреннюю порцию мокроты, откашливаемую больным натощак. В лабораторию мокроту доставляют не позднее 1–1,5 ч после откашливания.

Цитологическое исследование мокроты (5-кратное) позволяет обнаружить раковые клетки у 50–85% больных центральным и 30–60% больных периферическим раком легкого.

Особенно ценно исследование мокроты, полученной после бронхоскопии. Ложноположительные заключения на наличие рака отмечают в 1–6% наблюдений. Отсутствие элементов рака в мокроте не дает основания отрицать опухоль легкого.

Доступность цитологического метода исследования мокроты позволяет использовать его при обследовании пациентов «повышенного риска» по раку легкого в различных лечебных учреждениях и амбулаторных условиях.

## 11.4. ЦИТОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МОЧИ

Рак мочевого пузыря — злокачественное заболевание стенки мочевого пузыря. Ежегодно в мире регистрируют более 250 тыс. случаев рака мочевого пузыря, и от этого заболевания умирают около 60 тыс. человек в год. Заболеваемость раком мочевого пузыря в России составляет 10,9 случая на 100 тыс. населения. Рак мочевого пузыря в первую очередь поражает мужчин. Наиболее часто это заболевание встречается у пациентов в возрасте 60–70 лет. Факторами риска по заболеванию раком мочевого пузыря считают потребление никотина и контакт с определенными химическими веществами (ароматическими аминами), используемыми в промышленности в виде красителей.

Примерно 2/3 опухолей мочевого пузыря приходится на поверхностные их формы. На этой стадии возможно излечение, на более поздних стадиях терапия не эффективна и сводится к хирургическому вмешательству. В большинстве случаев рак развивается из поверхностного эпителия слизистой оболочки мочевого пузыря, представленного особыми клетками — уротелием. Поскольку лоханки, мочеточники и часть уретры также выстланы уротелием, в любом из вышеназванных отделов мочевого тракта может развиваться злокачественная опухоль (карцинома уротелия). Тем не менее более чем в 90% всех случаев опухоль обнаруживают в мочевом пузыре.

Достоверных ранних клинических симптомов рак мочевого пузыря не имеет. В большинстве случаев первым его проявлением становится макрогематурия (примесь крови к моче). Именно поэтому при появлении примеси крови в моче, а также при рецидивирующем воспалении мочевого пузыря необходимо как можно раньше обратиться к урологу. Помимо исследования мочи (на наличие клеток крови и опухоли), решающее значение в диагностике рака имеет осмотр мочевого пузыря с помощью специального инструмента — цистоскопия. В большинстве случаев ее можно провести в поликлинических условиях без применения наркоза.

В настоящий момент цистоскопия — наилучший метод диагностики рака мочевого пузыря, при которой через мочеиспускательный канал вводят специальный аппарат с камерой на конце, позволяющей осматривать слизистую оболочку органа. Это дорогостоящая и болезненная процедура. Другой способ диагностики — цитологическое исследование мочи на наличие раковых клеток, но он недостаточно надежен. Эффективность цитологического исследования мочи составляет лишь 48%.

Приблизительно в 80% случаев после оперативного лечения опухоли мочевого пузыря рецидивируют. Именно поэтому необходимо проведение контрольной цистоскопии 4 раза в течение года после операции.

## **11.5. АППАРАТЫ, УСТРОЙСТВА И ПРИСПОСОБЛЕНИЯ ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ И ОКРАСКИ МАЗКОВ-ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Цитологическое исследование считают одним из основных методов морфологического анализа клеточного и неклеточного состава проб биологического материала.

Качество подготовки образцов биологических материалов для цитологических исследований служит обязательной предпосылкой адекватного их результата. Его определяют правильным взятием образца биологического материала и соблюдением технологии приготовления, фиксации и окрашивания мазка.

### 11.5.1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ МАЗКОВ

Цитологическому исследованию подвергаются соскобы, жидкости (выпоты в полости тела, моча, промывные воды), мокрота, пунктаты, кусочки ткани и другие виды биологического материала. В настоящее время в клинической практике чаще используют приведенные ниже способы получения биологического материала для цитологического исследования.

- Сбор биологического материала, содержащего слущенные клетки. Клеточные элементы, в том числе опухолевые, легко слущиваются с поверхности слизистых и серозных оболочек, опухолевых образований. Такие клетки спонтанно попадают в различные выделения, выпоты, секреты (например, в мокроту, мочу) и становятся объектом для цитологического исследования. Можно также получить слущенные клетки с помощью мазков-отпечатков со слизистой оболочки шейки матки, бронхов при бронхоскопии, изъязвленной поверхности кожи и т.д. В клинической практике биологический материал, содержащий слущенные клетки, называют эксфолиативным.
- Пункция тонкой иглой опухолевых узлов, патологических очагов и кист. Наиболее часто в клинической практике данный метод взятия биологического материала применяют при наличии патологических образований в щитовидной и молочных железах, лимфатических узлах, мягких тканях, почках, печени и др. Данный вид биологического материала объединяют термином «пункционный материал».
- Приготовление мазков с поверхности разреза удаленной на операции опухоли. Такие мазки получают в виде отпечатков или путем легкого соскабливания предметным стеклом с поверхности свежего разреза опухоли. Поскольку этот вид биологического материала получают в результате проведения операции или биопсии, его называют биопсийным и операционным.

Мазок — основной объект изучения клеточного состава в пробе биологического материала. Для его получения биологический материал для цитологического исследования наносят на чистые обезжиренные

предметные стекла, осторожно размазывая краем другого предметного (лучше шлифованного) стекла равномерным тонким слоем. Свежие мазки для сохранности клеток в образце необходимо немедленно фиксировать. Для этого предметные стекла помещают в 90–96% раствор этанола на срок 10–15 мин. Стекло высушивают на воздухе, помещают в пластиковую коробку или чашку Петри и доставляют в лабораторию.

Мазки-отпечатки из соскоба можно приготовить с помощью шпателя, края предметного стекла или скальпеля: соскобы делают осторожно с легкодоступных очагов поражения. Обилие слизи и некротических масс в биологическом материале препятствует правильному приготовлению мазка, поэтому гнойные корки и некротические массы должны быть удалены. Затем к месту поражения прикладывают предметное стекло, на котором остается некоторое количество клеточных элементов и слизистого отделяемого: с места выделения (сосок молочной железы, выходное отверстие свища), слизистой оболочки, изъязвленной поверхности кожного покрова и видимых слизистых оболочек. С пораженного участка материал также можно брать с помощью ватного тампона и наносить на предметное стекло в виде отпечатков. Метод отпечатков применим для приготовления мазков с тканей при оперативном вмешательстве и биопсии.

Жидкости серозных полостей и содержимого кист получают путем пункции плевральной, перикардальной, брюшной полости и кист. В жидкость добавляют консервант, чтобы предотвратить свертывание (1 г лимоннокислого натрия на 1 л жидкости), тщательно перемешивают стеклянной палочкой. В лабораторию доставляют всю полученную жидкость для исследования. Если количество жидкости слишком велико (несколько литров), то жидкость отстаивают (около 1 ч), сливают верхний слой, а отстоявшийся нижний (в пределах 1 л) доставляют в лабораторию. Жидкости, полученные при пункции, в лаборатории центрифугируют. Далее сливают верхний слой жидкости из пробирки, а из осадка готовят мазки подобно мазкам крови.

Правильно приготовленный мазок для цитологического исследования должен отвечать следующим требованиям.

- Мазок должен начинаться на расстоянии 1 см от узкого края предметного стекла и заканчиваться примерно в 1,5 см от другого его края, но не достигать длинного края стекла. Между мазком и краем предметного стекла должно оставаться расстояние примерно 0,3 см.
- Мазок должен быть максимально тонким (максимально приближающимся к однослойному), равномерной толщины (не волнообразным) на всем протяжении.

- Мазок из осадка жидкого материала (жидкость из серозной полости, смыв из различных органов, содержимое кистозной полости и др.) должен заканчиваться у одного из узких краев предметного стекла в виде следа, оставленного как бы тонкой щеткой.
- Клетки в мазке должны быть равномерно распределены, все участки мазка должны хорошо просматриваться и не содержать «толстые участки».

При нарушении технологии приготовления получают толстый, неравномерный (волнообразный) мазок, содержащий недоступные для детального изучения (непросматриваемые) грубые скопления или комплексы клеток.

Лучший способ подготовки биологического материала для цитологического исследования — метод жидкостной цитологии. Основная идея этой технологии в том, что клеточный материал, полученный с поверхности шейки матки и из цервикального канала посредством щеточки или при пункции, не переносят сразу на стекло, а вместе со съемной щеточкой погружают во флакон со специальной жидкой средой и доставляют в лабораторию. Для приготовления мазков определенное количество жидкости из флакона помещают в специальные пробирки, соединенные со стеклами, и подвергают центрифугированию на цитоцентрифуге (рис. 11.4). Автоматизированная подготовка мазка на цитоцентрифуге включает вакуумную фильтрацию порции суспензии клеток из пробирки, центрифугирование и нанесение полученного клеточного осадка под действием центробежной силы равномерным слоем на предметное стекло. Клетки распределяются по предметному стеклу в виде монослоя. Именно поэтому мазки, при-



Рис. 11.4. Цитоцентрифуга Shandon Cytospin 4

готовленные таким способом, однослойные. Материал распределен равномерно на относительно небольшой поверхности, что обеспечивает удобство в его изучении.

После приготовления препарата методом жидкостной цитологии мазки окрашивают по Папаниколау или гематоксилин-эозином. Преимущества метода жидкостной цитологии следующие:

- возможность приготовления без повторной пункции большого количества одинаковых цитологических препаратов хорошего качества;
- сокращение времени изучения цитологического препарата за счет уменьшения площади помещенного на стекло материала;
- однослойные цитологические препараты позволяют проводить цитологическую оценку мазков по видеоизображениям с использованием телекоммуникаций, применять компьютерные технологии в оценке результата анализа.

## 11.5.2. ФИКСАЦИЯ И ОКРАСКА МАЗКОВ

Фиксацию мазка проводят в соответствии с методикой, обусловленной биологическим материалом, который взят для цитологического исследования. Подразделяют на влажную фиксацию биологического материала и простое подсушивание его на воздухе. При влажной фиксации приготовленный мазок помещают в фиксирующую жидкость, затем подсушивают на воздухе. Недостаточная фиксация мазка ведет к некачественному окрашиванию клеток.

- Правильная фиксация мазка обуславливает стойкость клеток по отношению к содержащейся в красках воде, которая в нефиксированном мазке изменяет строение клеточных элементов. При фиксации мазка происходит коагуляция белка, в результате чего клетки прикрепляются к предметному стеклу.
- При фиксации цитологических препаратов следует использовать фиксаторы, прописи приготовления которых приведены в соответствующих руководствах.
- Рекомендуемые фиксаторы: метиловый спирт, этанол (Спирт этиловый\*), смесь Никифорова, фиксатор Мая—Грюнвальда и Лейшмана.

Лучшими считают фиксаторы Мая—Грюнвальда и Лейшмана. Время фиксации составляет:

- метиловый спирт — 3–10 мин;
- 100% раствор этанола — 10–30 мин;
- смесь Никифорова — от 15 мин до 1–2 ч.

Красители Лейшмана и Мая–Грюнвальда служат одновременно и фиксаторами.

Качественное окрашивание позволяет правильно идентифицировать клеточные элементы мазка и оценить их особенности при микроскопии. В адекватно окрашенном мазке структуры цитоплазмы, ядра, ядерного хроматина, ядрышек окрашены избирательно, то есть имеют отличия.

При применении любой методики окрашивания мазка важно точно соблюдать последовательность процедур приготовления растворов и временные промежутки в течение процесса окрашивания.

Существующие на рынке партии даже одного и того же красителя имеют различную интенсивность окраски. Поэтому необходимо опытным путем устанавливать оптимальные концентрации (разведение) и время окрашивания для каждого флакона красителя; их определяют при окрашивании серии препаратов растворами с различной концентрацией красителя, меняя длительность его воздействия. При приготовлении растворов необходимо учитывать рН воды: он должен быть нейтральным (рН 6,8–7,2), что обеспечивается использованием буферных растворов.

Рекомендуемые методы окрашивания цитологических мазков: азур-эозиновый (по Романовскому, Лейшману, Маю–Грюнвальду, Паппенгейму и др.), гематоксилиновый, гематоксилин-эозиновый, метод Папаниколау.

Метод окрашивания по Папаниколау считают наилучшим для микроскопического исследования мазков из шейки матки, позволяющим с наибольшей степенью достоверности выявить ее рак. В связи с этим исследование окрашенного по Папаниколау мазка для диагностики онкологических заболеваний шейки матки получило название ПАП-тест. Метод окраски был предложен Г.Н. Папаниколау, греческим врачом-исследователем, пионером цитологии и ранней диагностики раковых заболеваний. Окраска мазка по Папаниколау позволяет оценить степень созревания цитоплазмы (от сине-зеленого цвета в незрелых клетках до розового в клетках со зрелой цитоплазмой и оранжевого — в клетках с ороговением), при этом благодаря влажной фиксации хорошо сохраняются ядра, клеточная мембрана и структура хроматина.

Окраска мазков по Папаниколау — сложная методика, включающая большое количество технологических операций. При окрашивании этим методом последовательно применяют три краски: гематоксилин Гарриса — для окраски ядер, краски оранжевая G и EA-36 — для окраски цитоплазмы. При применении варианта методики «ПАП-ДИФФ» мазок после окрашивания кратковременно промывают в водопровод-



ной воде для удаления излишков краски со стекла. Далее выполняют дегидратацию препарата в спирте, просветление (в ксилоле) и заключение под покровное стекло с использованием канадского бальзама.

Необходимые реактивы:

- этанол 95, 90, 80, 70 и 50% раствор;
- гематоксилин Гарриса;
- 0,25% раствор соляной кислоты;
- краска оранжевая G;
- краска EA-36;
- абсолютный спирт;
- ксилол;
- канадский бальзам.

**Приготовление гематоксилина Гарриса:**

- 1 г гематоксилина растворяют в 10 мл абсолютного спирта;
- 20 г калийных квасцов растворяют при нагревании в 200 мл дистиллированной воды;
- через 24 ч оба раствора смешивают и прибавляют 0,5 г красного или желтого оксида ртути;
- нагревают до кипения, остужают и через 24 ч фильтруют.

**Приготовление раствора краски оранжевая G:** к 100 мл 0,5% спиртового раствора оранжевой краски G добавляют 0,015 г фосфорно-вольфрамовой кислоты.

**Приготовление составной краски EA-36:** 45 мл 0,5% спиртового раствора светлой зеленой, 10 мл 0,5% спиртового раствора бисмаркбраун, 45 мл 0,5% спиртового раствора эозина желтоватого (водо- и спирторастворимого), 0,2 г фосфорно-вольфрамовой кислоты, капля насыщенного водного раствора углекислого лития.

Канадский бальзам — прозрачная и бесцветная смола, получаемая из пихты бальзамической, или канадской, может иметь желтоватый оттенок. По своей консистенции она схожа с медом. Имеет приятный аромат, горький вкус. Вещество хорошо растворяется в различных жидкостях, кроме бензина и воды. Используют для покрытия цитологических препаратов, что обеспечивает их сохранность, а также применяют для подготовки тонких срезов тканей и органов для гистологических исследований.

Окраске подвергают фиксированные мазки. Для фиксации мазков используют метиловый спирт, 95% раствор этанола или фиксатор-спрей (смесь этанола и полиэтиленгликоля). После высушивания мазки подвергают окрашиванию.

Последовательность процедур при ручном окрашивании мазков (рис. 11.5) следующая.

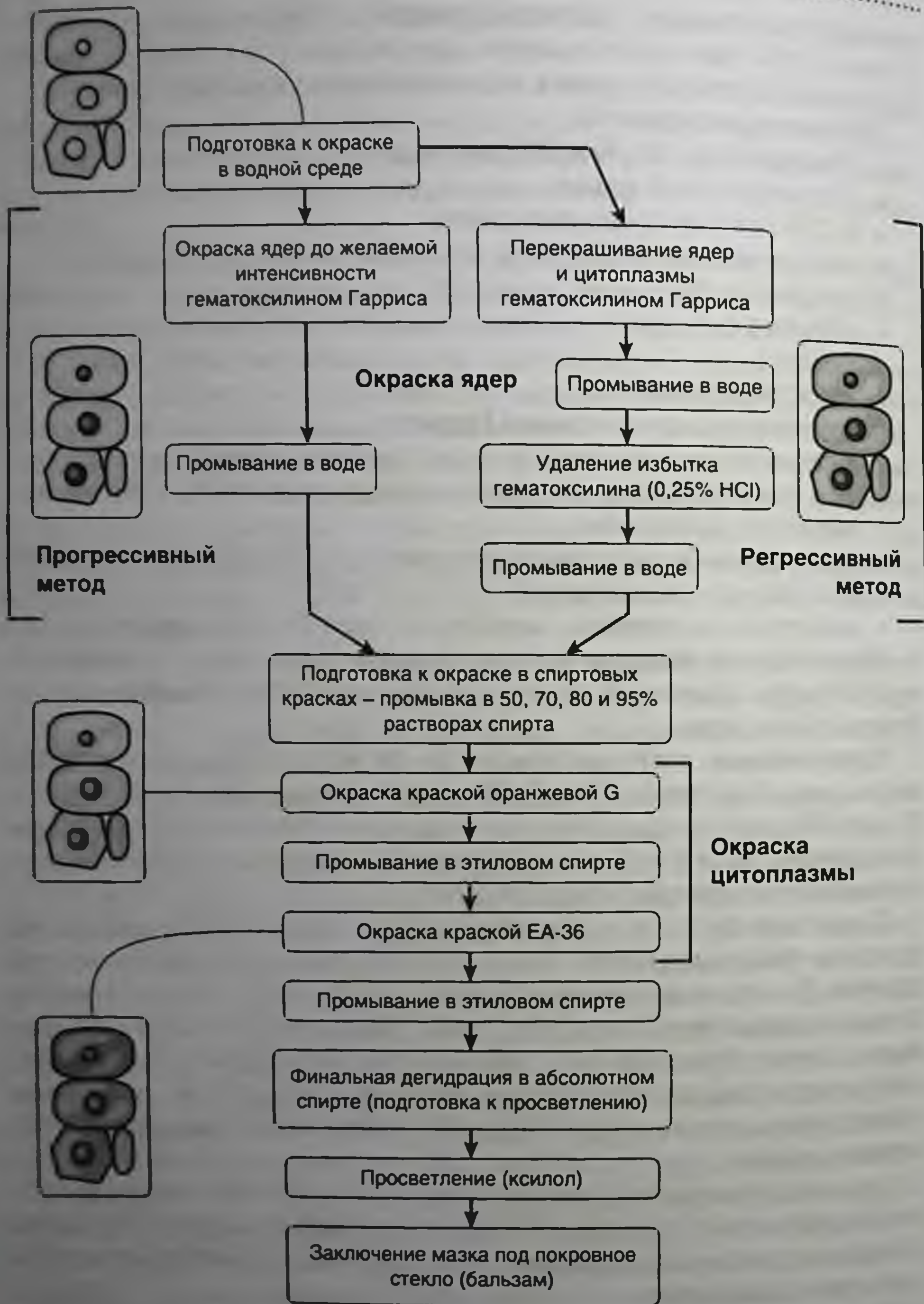


Рис. 11.5. Варианты окраски мазков по Папаниколау (схема)

- Фиксированные мазки проводят последовательно через сосуды, содержащие 80, 70 и 50% раствор спирта и дистиллированную воду. Эту процедуру называют поэтапной гидратацией (насыщение водой) цитологических препаратов в спиртах нисходящей крепости (80, 70, 50% растворе) и дистиллированной воде. Время воздействия каждого раствора 30 с.
- На мазки наносят раствор гематоксилина Гарриса (окраска гематоксилином). Гематоксин Гарриса можно применять как для прогрессивной (1–5 мин), так и для регрессивной (5–10 мин) окраски (5–10 мин).
  - ◊ Регрессивный метод окраски (первоначально предложенный Папаниколау) предусматривает следующую последовательность процедур:
    - окрашивают мазки раствором гематоксилина Гарриса продолжительностью 5–10 мин для получения однородного окрашивания ядер и цитоплазмы клеток в толстых областях мазка (избыточная окраска или переокрашивание);
    - осторожно споласкивают мазки дистиллированной водой и погружают в 0,25% раствор соляной кислоты для удаления избытка гематоксилина до покраснения мазка в течение 2–3 мин;
    - далее мазки на 6 мин кладут в сосуд с проточной водопроводной водой и обмывают дистиллированной водой;
    - мазки опускают на 1 мин в слабый раствор углекислого лития (3 капли насыщенного водного раствора лития на 100 мл дистиллированной воды);
    - промывают в воде;
    - затем их проводят через 50, 70, 80 и 95% раствор этанола (Спирта этилового\*).

Все эти процедуры промывки мазков в различных жидкостях применяют только с одной целью — вымыть излишнее количество красителей.

- ◊ Прогрессивный метод окраски:
  - окрашивают мазки раствором гематоксилина Гарриса продолжительностью 2–3 мин (окрашивают ядра до необходимой интенсивности);
  - мазки промывают в воде до появления синей окраски;
  - затем их проводят через 50, 70, 80 и 95% раствор этанола (Спирта этилового\*).
- Далее обезвоженные таким образом препараты окрашивают в течение 30–100 с краской оранжевой G.

- Мазки троекратно промывают в 95% этаноле (Спирте этиловом<sup>\*</sup>).
- Затем красят в течение 1,5 мин составной краской ЕА-36.
- Мазки отмыывают от избытка краски в трех сменах 95% раствора спирта.
- Далее мазки просветляют проведением их через абсолютный спирт, смесь абсолютного спирта и ксилола в равных объемах и, наконец, ксилол.
- После этого мазки с покровным стеклом заключают в канадский бальзам.

В настоящее время выпускаются готовые наборы реагентов, предназначенные для окраски гинекологических мазков по Папаниколау. Например, набор реагентов «МЛТ-ПАП-ДИФФ» включает следующие реактивы:

- краска гематоксилин по Гиллу-2 (Папаниколау-1);
- краска ОГ (Папаниколау-2);
- краска ЕА (Папаниколау-3);
- раствор для дегидратации;
- просветляющий раствор;
- фиксатор-спрей 100 мл;
- монтирующая (закрывающая) среда 100 мл — 1 шт.

Краски в наборе находятся в концентрированном виде, разводят их по мере необходимости. К набору реактивов прилагают методику проведения окрашивания (табл. 11.1).

**Таблица 11.1.** Методика окрашивания мазков с использованием набора реагентов «МЛТ-ПАП-ДИФФ»

№ п/п	Процесс (реагент)	Длительность процесса
1	Фиксация (фиксатор-спрей)	15 мин
2	Промывка (водопроводная вода)	30 с
3	Промывка (дистиллированная вода)	5 с
4	Окрашивание [краска гематоксилин по Гиллу-2 (Папаниколау-1)]	3 мин
5	Отсинивание (водопроводная вода)	2 мин
6	Промакивание (фильтровальная бумага)	—
7	Окрашивание [краска ОГ (Папаниколау-2)/концентрат краски ОГ (Папаниколау-2)]	15 с
8	Промакивание (фильтровальная бумага)	—
9	Ополаскивание (раствор для дегидратации, первый сосуд)	10 с
10	Промакивание (фильтровальная бумага)	—

Окончание табл. 11.1

№ п/п	Процесс (реагент)	Длительность процесса
11	Окрашивание [краска EA (Папаниколау-3)/концентрат краски EA (Папаниколау-3)]	3 мин
12	Промывка (водопроводная вода)	2 с
13	Промакивание (фильтровальная бумага)	–
14	Дегидратация (раствор для дегидратации, первый сосуд)	10 с
15	Промакивание (фильтровальная бумага)	–
16	Дегидратация (раствор для дегидратации, второй сосуд)	10 с
17	Дегидратация (раствор для дегидратации, третий сосуд)	10 с
18	Просветление (просветляющий раствор)	10 с
19	Заклучение под покровное стекло [монтирующая (закрывающая) среда]	–

Использование готовых наборов реактивов значительно облегчает окраску мазков по Папаниколау.

Сложность окраски мазков по Папаниколау может сопровождаться нарушением технологических операций на различных этапах. Автоматизация процессов позволяет стандартизировать технологический процесс и повысить качество окраски мазков.

Использование отечественного прибора «ЭМКОСТЕЙНЕР АФОМК-13-ПАП» служит одним из вариантов автоматизации окрашивания мазков по Папаниколау (рис. 11.6). Окрашивание мазков в приборе производится путем последовательного программированного перемещения штативов с предметными стеклами от станции к станции, где производятся операции окраски. Управление и программирование осуществляют с помощью сенсорного экрана.

Примером еще более совершенной технологии автоматизации служит станция автоматизированного приготовления и окраски тонкослойных цитологических мазков BD PrepStain (рис. 11.7).

Станция PrepStain позволяет приготавливать одновременно не менее 4 препаратов, обеспечивает приготовление как неокрашенных монослойных препаратов, так и окрашенных в соответствии с различными вариантами стандартного метода Папаниколау. Производительность станции составляет 48 окрашенных или 96 неокрашенных препаратов в час и 300 окрашенных или 600 неокрашенных препаратов за 8-часовой рабочий день.



Рис. 11.6. Прибор «ЭМКОСТЕЙНЕР АФОМК-13-ПАП»



Рис. 11.7. Автоматическая станция приготовления и окраски мазков BD PrepStain

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ

1. Перечислите основные морфологические признаки злокачественной опухоли.
2. Что представляет собой шейка матки?
3. Каким эпителием покрыта шейка матки?
4. Какие слои различают в многослойном плоском эпителии?
5. Что такое дисплазия шейки матки и каких степеней выраженности она бывает?
6. Перечислите особенности взятия мазков из шейки матки.
7. В чем сущность метода жидкостной цитологии?
8. Какой биологический материал используют для приготовления цитологических мазков?
9. Какой биологический материал называют эксфолиативным?
10. Каким требованиям отвечает правильно приготовленный цитологический мазок?
11. Какие фиксаторы рекомендуется использовать для фиксации цитологических препаратов?
12. Перечислите основные этапы окраски цитологических мазков по Папаниколау.

# ТЕОРИЯ И ПРАКТИКА ЛАБОРАТОРНЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Биохимические анализы широко используют в клинической практике в тех случаях, когда в основе болезни лежат метаболические нарушения (например, СД) или биохимические изменения служат следствием заболевания (например, почечная недостаточность). В практической медицине биохимические тесты используют для:

- скрининга — выявления болезни на доклинической стадии;
- диагностики — подтверждения или исключения диагноза;
- прогноза — определения величины риска развития заболевания, особенностей его течения и исхода;
- мониторинга — наблюдения за течением заболевания или реакции на лечение.

Современная КДЛ способна многосторонне оценивать динамику патологического процесса, происходящего у больного. Этого достигают путем использования различных методов исследования, направленных на определение концентрации биологически важных химических веществ (белки, углеводы, липиды), различных продуктов их превращений, активности ферментов, гормонов, медиаторов и других биологически активных соединений в биологических жидкостях организма человека.

## 12.1. БЕЛКИ И БЕЛКОВЫЕ ФРАКЦИИ

Белки представляют собой высокомолекулярные азотсодержащие полипептиды, состоящие более чем из 20 видов  $\alpha$ -аминокислот. Условной границей между крупными полипептидами и белками служит молекулярная масса 8000–10 000 Да. К белкам относят соединения, имеющие молекулярную массу более 10 000 Да. Различают простые

и сложные белки. Простые белки содержат только аминокислоты, а сложные — еще и неаминокислотные составляющие: гем, производные витаминов, липидные или углеводные компоненты. Белки играют центральную роль в процессах жизнедеятельности клеток (например, ферменты) и формировании клеточных структур.

### 12.1.1. СИНТЕЗ И МЕТАБОЛИЗМ БЕЛКОВ

Все белки организма непрерывно обновляются. Даже при состоянии внешнего покоя осуществляется два противоположно направленных процесса — синтез и распад белка.

Процессы синтеза и распада белков включают целый ряд сложнейших химических превращений, регулируемых разнообразными нейро-эндокринными факторами. Важнейшими из них считают состояние гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой и гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной системы.

Белки в организме человека синтезируются из аминокислот. Они образуются из белков, поступающих с пищей, белка организма (под действием внутриклеточных протеолитических ферментов), путем биосинтеза их друг из друга, а также из жирных кислот и других соединений.

Исследование белковой картины крови служит одним из наиболее распространенных биохимических анализов, позволяющих оценить состояние пациента. Это во многом обусловлено тем, что белковые компоненты крови выполняют многообразные ферментативные, гормональные, иммунологические и другие функции в организме человека. Практически нет ни одного заболевания, которое бы не находило своего отражения в сдвигах белкового обмена как количественного, так и качественного характера. В то же время необходимо заметить, что наблюдаемые сдвиги стандартны (неспецифичны для определенного заболевания) и однотипны, что затрудняет их клиническую оценку. Однако анализ белков крови позволяет следить за динамикой патологического процесса у больного и эффективностью лечения, а также судить о степени выраженности нарушений белкового обмена.

Плазма крови человека содержит более 100 различных видов белков, различающихся по происхождению и функциям. Основными белками плазмы крови служат альбумины, различные фракции глобулинов, фибриноген, липо-, глико- и металлопротеины. Вместе с неорганическими ионами, глюкозой и другими низкомолекулярными веществами они образуют специфическую коллоидную систему с особыми физико-химическими свойствами.



Из 9–10% сухого остатка плазмы крови на долю белков приходится 6,5–8,5%. При использовании метода высаливания нейтральными солями белки плазмы крови можно разделить на три группы: альбумины — 4–5%, глобулины — 2–3%, фибриноген — 0,2–0,4%.

Многие белки крови синтезируются в печени, плазматические клетки и лимфоциты синтезируют иммуноглобулины, макрофаги — белки системы комплемента. Пассивная потеря белков с низкой молекулярной массой происходит через почечные клубочки и стенку кишечника. Часть из этих белков подвергается реабсорбции либо непосредственно через клетки почечных канальцев, либо после переваривания в кишечнике. Большинство белков плазмы после их захвата путем пиноцитоза (поглощения) катаболизируется в клетках эндотелия капилляров или мононуклеарных фагоцитах.

Концентрация белков в плазме крови зависит от соотношения между скоростью их синтеза и выведения из организма, а также объема распределения (то есть объема циркулирующей крови, ОЦК).

Обычно в лабораторию для исследования доставляют кровь, взятую без антикоагулянта. После ее центрифугирования получают сыворотку, которую подвергают анализу. Отличие сыворотки от плазмы в том, что первая не содержит фибриноген, так как в отсутствие антикоагулянта в пробирке кровь сворачивается, при этом фибриноген превращается в фибрин, который служит основой сгустка.

Сыворотка крови содержит альбумин,  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -глобулины. Альбумин составляет более половины белковых компонентов сыворотки крови. Он обладает значительным сродством к воде и более, чем остальные белки, участвует в поддержании коллоидно-онкотического давления. Альбумин регулирует водно-электролитный обмен также путем фиксации примерно 50% кальция сыворотки крови, что способствует установлению динамического равновесия между связанной формой кальция и его ионизированной (свободной) формой. К  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобулинам относят белки:

- с ферментными свойствами;
- принимающие участие в свертывании крови (антигемофильный глобулин, протромбин);
- связывающие металлы — церулоплазмин, трансферрин;
- связанные с липидами;
- связанные с углеводами.

По сравнению с другими фракциями белка  $\gamma$ -глобулины содержат наименьшее количество связанных углеводов и липидов. Белки, относимые к  $\gamma$ -глобулинам, являются по своей сущности антителами (агглютинины, антистрептолизины, криоглобулины и др.), которые составляют

основу гуморального иммунитета. В связи с этим снижение уровня  $\gamma$ -глобулинов в сыворотке крови свидетельствует о понижении устойчивости организма к различным инфекциям. Синтез  $\gamma$ -глобулинов осуществляется в лимфоцитах лимфатических узлов и плазматических клетках.

Физиологическая роль белков крови многогранна. В целом белки выполняют следующие функции:

- поддерживают коллоидно-онкотическое давление, сохраняя объем крови, связывая воду и задерживая ее, не позволяя ей выходить из кровеносного русла;
- принимают участие в процессах свертывания крови;
- поддерживают постоянство рН крови, являясь одной из буферных систем крови;
- соединяясь с рядом веществ (холестерин, билирубин и др.), а также с лекарственными средствами, доставляют их к тканям;
- поддерживают нормальный уровень катионов в крови путем образования с ними недиализируемых соединений (например, значительная часть железа, меди, магния и других микроэлементов связана с белками);
- играют важнейшую роль в иммунных процессах;
- служат резервом аминокислот;
- выполняют регулируемую функцию, входя в состав гормонов, ферментов и других биологически активных веществ.

Распад сывороточных белков осуществляется в самых разных тканях и органах. Например, через желудочно-кишечный тракт теряется альбумин в среднем 4 г/сут. Потеря белка через кишечник — физиологический процесс. У больных с патологией кишечника теряемое количество белка увеличивается во много раз.

Знание вопросов распределения белков в организме, их обмена имеет очень большое значение для обеспечения правильного ухода за больным, в частности при применении парентерального питания (дозирование вводимых белковых препаратов и др.), а также при использовании ряда лекарственных препаратов, влияющих на транспортную функцию белков.

Белки входят в состав всех биологических жидкостей организма человека, но именно белки плазмы крови исследуют наиболее часто. Поскольку при многих заболеваниях наблюдают изменения в содержании отдельных белков, исследование их уровня в крови широко используют в диагностических целях. К важнейшим показателям белкового обмена, имеющим значение в диагностике многих заболеваний, относят содержание в сыворотке крови общего белка, альбумина, белковых фракций и индивидуальных белков.

## 12.1.2. ИССЛЕДОВАНИЕ ОБЩЕГО БЕЛКА

Синтез белков плазмы крови осуществляется в основном в клетках печени и ретикулоэндотелиальной системы. Концентрация общего белка в сыворотке зависит главным образом от синтеза и распада двух основных белковых фракций — альбумина и глобулинов. На скорость синтеза белка в организме человека оказывают влияние многие факторы: характер питания, усвоение пищи, интоксикации, потери белка в результате кровотечений, с раневым отделяемым, мочой.

Определение общего белка в сыворотке крови в клинической практике часто используют как важный диагностический тест. Он характеризует содержание всех видов белков в сыворотке крови. В норме у здорового человека концентрация общего белка в сыворотке составляет 65–85 г/л. Снижение содержания белка в крови по сравнению с нормальными показателями принято обозначать термином «гипопротеинемия», а превышение — термином «гиперпротеинемия».

Гипопротеинемический синдром свидетельствует либо о белковом голодании вследствие недостаточного поступления аминокислот с пищей, либо о значительных потерях белка организмом (например, через почки при развитии нефротического синдрома), либо об угнетении процессов биосинтеза белков крови в результате развития хронических заболеваний (например, печени), воспалительных процессов, злокачественных новообразований, интоксикаций.

**Гипопротеинемия возникает вследствие:**

- недостаточного поступления белка (при длительном голодании или продолжительном соблюдении безбелковой диеты);
- повышенной потери белка (при различных заболеваниях почек, кровопотерях, ожогах, новообразованиях, сахарном диабете, асците);
- нарушения образования белка в организме, недостаточности функции печени (гепатиты, циррозы, токсические повреждения), длительного лечения глюкокортикоидами, нарушения всасывания (при энтеритах, энтероколитах, панкреатитах);
- усиления процессов распада белка при лихорадочных состояниях и интоксикациях;
- сочетания различных факторов, перечисленных выше.

Снижение уровня общего белка в сыворотке крови менее 50 г/л часто сопровождается гипопротеинемическими отеками тканей.

Гиперпротеинемия встречается сравнительно редко. Кратковременное повышение концентрации общего белка в сыворотке крови нередко развивается как следствие дегидратации в результате потери части

внутрисосудистой жидкости. Это происходит при тяжелых травмах, обширных ожогах, холере. При острых инфекциях содержание общего белка часто повышается вследствие дегидратации и одновременного возрастания синтеза белков острой фазы. При хронических инфекциях содержание общего белка в крови может нарастать в результате активации иммунологического процесса и повышенного образования иммуноглобулинов. Стойкую ярко выраженную гиперпротеинемию наблюдают при появлении в крови парапротеинов — патологических белков, вырабатываемых в большом количестве при миеломной болезни и болезни Вальденстрема. Концентрация общего белка в сыворотке при данных заболеваниях может достигать значений 120 г/л и выше. Умеренную гиперпротеинемию встречают иногда в стадии выздоровления от острых вирусных гепатитов.

Специалисты лаборатории должны знать и учитывать при взятии проб крови для исследования общего белка то, что на величину общей концентрации белка могут оказывать влияние положение тела, длительность наложения жгута при взятии крови и физическая активность. Активная физическая работа и смена положения тела с горизонтального на вертикальное повышают содержание белка в сыворотке крови на 10%.

При оценке результатов определения общего белка в сыворотке важно понимать, что степень выраженности гипо- и гиперпротеинемии должна не только служить в качестве диагностического признака при определении природы болезни, но прежде всего быть показателем тяжести, позволяющим следить за динамикой процесса, определяющим в ряде случаев тактику лечения, и в частности способы снабжения организма больного необходимыми количествами белка.

### 12.1.3. ИССЛЕДОВАНИЕ АЛЬБУМИНА

Альбумин, находящийся в плазме крови, синтезируется в печени из аминокислот (примерно 12–15 г/сут). Содержание альбумина в сыворотке крови составляет около 60% общего белка. Референтные величины концентрации альбумина в сыворотке крови составляют 35–50 г/л (3,5–5,0 г/дл). В плазме крови альбумин выполняет следующие основные функции:

- транспортную;
- регулятора онкотического давления плазмы крови;
- белкового резерва организма.

Альбумин осуществляет транспорт различных не растворимых в воде веществ. В частности, альбумин транспортирует тиреоидные гормоны, билирубин, свободные жирные кислоты и многие лекарственные пре-

параты. Примерно половина кальция, находящегося в плазме крови, связана с альбумином и переносится им в физиологически неактивной форме.

Альбумин вносит основной вклад в поддержание ОЦК. Поддержание постоянства ОЦК зависит от удержания в сосудистом русле воды. При этом АД способствует перемещению жидкости во внесосудистое (межклеточное) пространство. В отсутствие эффективного противодействия этому процессу произошла бы быстрая потеря воды из сосудистого русла. В отличие от клеточных мембран, стенки капилляров проницаемы для небольших молекул, поэтому натрий почти не оказывает осмотического эффекта в кровеносных капиллярах. Наименьшая из молекул, концентрация которых значительна в кровотоке, но вне кровеносных сосудов низкая, — молекула альбумина. В норме стенка капилляров мало проницаема для него, поэтому концентрацию альбумина в крови считают наиболее важным фактором, противостоящим общему АД (гидростатическому). Альбумин присутствует в плазме в больших количествах и вносит самый значительный вклад в поддержание ее онкотического давления. Последнее препятствует вытеканию жидкости из капилляров в окружающее интерстициальное (межклеточное) пространство под действием давления внутри сосудов. На 65–80% онкотическое давление плазмы обусловлено альбумином.

При патологии динамическое равновесие и обмен жидкости между внутри- и внесосудистыми пространствами нарушаются. При уменьшении содержания альбумина в крови (острая кровопотеря, высокий уровень катаболизма, печеночная недостаточность, потери белка с мочой и др.) онкотическое давление плазмы снижается, жидкость усиленно покидает сосудистое русло, в связи с чем происходит сгущение крови, замедление кровотока, а в межклеточном пространстве образуется избыток жидкости и развивается отек. Отек, который внешне выглядит как припухлость, — клинический симптом накопления жидкости в интерстициальном пространстве.

Своевременное внутривенное введение раствора альбумина человека позволяет восстановить объем плазмы крови у пациентов с обширной травмой, ожогами или шоком различного происхождения.

#### **12.1.4. БЕЛКОВЫЕ ФРАКЦИИ СЫВОРОТКИ КРОВИ (ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ)**

Особое диагностическое значение имеют количественные взаимоотношения отдельных белков сыворотки крови. Для разделения всех белков сыворотки крови на составляющие обычно используют метод

электрофореза, основанный на различной их подвижности в электрическом поле. В сыворотке крови здорового человека при электрофорезе (фореграмма) можно обнаружить шесть белковых фракций: преальбумины, альбумины  $\alpha$ -1-глобулины,  $\alpha$ -2-глобулины,  $\beta$ -глобулины и  $\gamma$ -глобулины (табл. 12.1). Это исследование в диагностическом отношении более информативно, чем определение только общего белка или альбумина. При многих заболеваниях часто изменяется процентное соотношение белковых фракций, хотя общее содержание белка в сыворотке крови остается в пределах нормы. Анализ фореграмм белков позволяет установить, за счет какой фракции у больного имеется увеличение или дефицит белка, а также судить о специфичности изменений, характерных для данной патологии. Однако исследование белковых фракций позволяет судить о характерном для какого-либо заболевания избытке или дефиците белка только в самой общей форме.

При анализе результатов исследования сыворотки крови на белковые фракции можно обнаружить три типа нарушений:

- диспротеинемии — изменения соотношения белковых фракций по сравнению с нормальными значениями;
- генетические дефекты синтеза белков;
- парапротеинемии — появление в крови аномальных белков (например, при миеломной болезни).

Таблица 12.1. Белковые фракции сыворотки крови в норме

Фракции	Содержание, %
Преальбумины	2–7
Альбумины	52–65
$\alpha$ -1-Глобулины	2,5–5
$\alpha$ -2-Глобулины	7–13
$\beta$ -Глобулины	8–14
$\gamma$ -Глобулины	12–22

Диспротеинемия может манифестировать различными изменениями в соотношении основных белков сыворотки крови. Далее они рассмотрены в порядке расположения белковых фракций на фореграмме.

**Изменения фракции преальбуминов.** Преальбумин, или транстиретин, — белок с молекулярной массой 54 980 Да и периодом полураспада 1–2 дня; синтезируется в печени. Одна из важнейших функций преальбумина — транспорт гормонов щитовидной железы (тироксина и трийодтиронина) в организме человека.

Изменения фракции преальбуминов практически всегда характеризуются их снижением, вплоть до полного отсутствия на фореграмме.

Преальбумин — очень чувствительный негативный (отрицательный) острофазовый белок, при воспалительных процессах концентрация может снижаться до 20% и менее средней величины нормы. Его уровень снижается при недостаточном белково-калорийном питании, циррозе печени, печеночной недостаточности и хронических заболеваниях печени. Снижение уровня преальбуминов — ранний и чувствительный тест белковой недостаточности в организме больного. При сочетании воспалительного процесса и недостаточности питания уровень преальбумина в сыворотке крови снижается быстро и значительно.

**Изменения фракции альбуминов.** При исследовании сыворотки крови на белковые фракции обычно удается выявить количественные изменения содержания альбуминов. Увеличения абсолютного содержания альбуминов, как правило, не наблюдают. Гипоальбуминемия — одно из наиболее частых отклонений белкового спектра крови. Основные виды гипоальбуминемий приведены в разделе «Функциональные пробы печени».

**Изменения фракции  $\alpha$ -1-глобулинов.** Основными компонентами данной фракции являются  $\alpha$ -1-антитрипсин,  $\alpha$ -1-липопротеид, кислый  $\alpha$ -1-гликопротеид.

Увеличение фракции  $\alpha$ -1-глобулинов наблюдают при острых, подострых, обострении хронических воспалительных процессов, поражении печени, всех процессах тканевого распада или клеточной пролиферации.

Снижение фракции  $\alpha$ -1-глобулинов наблюдают при дефиците  $\alpha$ -1-антитрипсина, гипо- $\alpha$ -1-липопротеидемии.

**Изменения фракции  $\alpha$ -2-глобулинов.**  $\alpha$ -2-Фракция содержит  $\alpha$ -2-макроглобулин, гаптоглобин, аполипопротеины А, В, С, церулоплазмин.

Увеличение фракции  $\alpha$ -2-глобулинов наблюдают при:

- всех видах острых воспалительных процессов, особенно с выраженным экссудативным и гнойным характером (пневмонии, эмпиема плевры, другие виды гнойных процессов);
- заболеваниях, связанных с вовлечением в патологический процесс соединительной ткани (коллагенозы, аутоиммунные и ревматические заболевания);
- злокачественных опухолях;
- термических ожогах в стадии восстановления;
- нефротическом синдроме;
- гемолизе крови в пробирке.

Снижение фракции  $\alpha$ -2-глобулинов наблюдают при сахарном диабете, панкреатитах (иногда), врожденной механической желтухе у новорожденных, токсических гепатитах.

К  $\alpha$ -глобулинам относят основную массу белков острой фазы. Увеличение их содержания отражает интенсивность стрессорной реакции и воспалительных процессов при перечисленных видах патологии.

**Изменения фракции  $\beta$ -глобулинов.**  $\beta$ -Фракция содержит трансферрин, гемопексин, компоненты комплемента, иммуноглобулины и липопротеины.

Увеличение фракции  $\beta$ -глобулинов выявляют при первичных и вторичных гиперлипопропротеинемиях, заболеваниях печени, нефротическом синдроме, кровоточащей язве желудка, гипотиреозе.

Пониженные величины содержания  $\beta$ -глобулинов определяют при гипо- $\beta$ -липопропротеинемии.

**Изменения фракции  $\gamma$ -глобулинов.**  $\gamma$ -Фракция содержит иммуноглобулины G, A, M, D, E. Именно поэтому повышение содержания  $\gamma$ -глобулинов отмечают при реакции системы иммунитета, когда происходит выработка антител и аутоантител: при вирусных и бактериальных инфекциях, воспалении, коллагенозе, деструкции тканей и ожогах. Значительная гипергаммаглобулинемия, отражая активность воспалительного процесса, характерна для хронических активных гепатитов и циррозов печени. Повышение фракции  $\gamma$ -глобулинов наблюдают у 88–92% больных хроническим активным гепатитом, причем значительное увеличение (до 26 г/л и выше) у 60–65% больных. Почти такие же изменения отмечают у больных при высокоактивном и далеко зашедшем циррозе печени, при этом нередко концентрация  $\gamma$ -глобулинов превышает содержание альбуминов, что служит плохим прогностическим признаком.

Повышение содержания в крови  $\gamma$ -глобулинов, кроме уже названных, может сопровождать следующие заболевания: ревматоидный артрит, системную красную волчанку, хронический лимфолейкоз, эндотелиомы, остеосаркомы, кандидомикоз.

Уменьшение содержания  $\gamma$ -глобулинов бывает первичным и вторичным. Различают три основных вида первичных гипогаммаглобулинемий: физиологическую (у детей в возрасте 3–5 мес), врожденную (генетический дефект синтеза антител) и идиопатическую (когда установить причину не удастся). Причинами вторичных гипогаммаглобулинемий могут быть многочисленные заболевания и состояния, приводящие к истощению иммунной системы.

Сопоставление направленности изменений содержания альбуминов и глобулинов с изменениями общего содержания белка дает основание



для заключения, что гиперпротеинемия чаще связана с гиперглобулинемиями, в то время как гипопропротеинемия чаще связана с гипоальбуминемией.

Нередко для оценки выраженности диспротеинемии рассчитывают альбумин-глобулиновый коэффициент, то есть отношение величины фракции альбуминов к величине фракции глобулинов. В норме этот показатель составляет от 2,5 до 3,5. У больных хроническими гепатитами и циррозами печени этот коэффициент понижается до 1,5 и даже 1,0 за счет снижения содержания альбумина и повышения фракции глобулинов.

**Генетические дефекты синтеза белков.** Исследование сыворотки крови на белковые фракции позволяет обнаружить генетические заболевания, передаваемые по наследству. Одним из признаков наследственных дефектов считают нарушение синтеза некоторых белков. К этому типу нарушений белкового спектра относят следующее.

- Отсутствие альбумина при нормальном содержании других фракций белка. Клинически этот вид наследственной патологии характеризуется незначительными отеками в связи со снижением онкотического давления плазмы крови.
- Агаммаглобулинемия — патология, характеризующаяся врожденным дефицитом синтеза антител, входящих в  $\gamma$ -глобулиновую фракцию. Общее количество белка при этом не изменено. Больные с такой аномалией обладают повышенной восприимчивостью к бактериальным инфекциям (рецидивирующие пневмонии, ангины, отиты и др.) при сохраненной сопротивляемости к вирусным инфекциям.
- Гипоглобулинемия — общий недостаток глобулинов в сыворотке крови, при этом концентрация общего белка в сыворотке снижается до 40 г/л, а уровень альбумина остается в норме.
- Абетаглобулинемия — отсутствие  $\beta$ -фракции на фореграмме. Одновременно отмечают недостаток белка трансферрина, осуществляющего транспорт железа в организме человека.

**Парапротеинемия** — появление в крови белков, отличающихся в физическом, химическом и иммунологическом отношении от обычных белков сыворотки крови. Такие патологические белки представляют собой иммуноглобулины или их фрагменты, однородные по всем физико-химическим и биологическим параметрам. Именно поэтому их называют еще моноклональными иммуноглобулинами (парапротеины, М-протеины). Они служат продуктом секреции одного клона В-лимфоцитов или плазматических клеток, поэтому представляют собой пул структурно гомогенных молекул. При проведении электро-

фореза белков сыворотки крови о наличии парапротеинов свидетельствует появление на электрофореграмме дополнительной (у здоровых людей отсутствует) узкой и резко ограниченной фракции белков (ее еще называют М-компонентом) в области  $\gamma$ -глобулинов.

Обнаружение парапротеинов наиболее характерно для парапротеинемических гемобластозов (хронических лейкозов) — особой группы опухолей лимфатической системы. К парапротеинемическим гемобластозам относят миеломную болезнь, макроглобулинемию Вальденстрема и болезнь тяжелых цепей. Заболевания представляют собой костномозговую опухоль. Клиническая картина в начале болезни не имеет типичных черт. По мере прогрессирования процесса возникают боли в позвоноках, ребрах, обусловленные разрушением костей растущей опухолью. Проведение исследования на белковые фракции служит лучшим методом ранней диагностики заболеваний. Наряду с обнаружением парапротеинов у больных резко повышена концентрация общего белка в сыворотке крови (до 140–170 г/л) за счет увеличения содержания аномальных белков. Уровень альбумина в крови при этом не изменен. В ряде случаев парапротеины, проходя через почечный фильтр, попадают в мочу, где могут быть обнаружены (они получили название «белки Бенс-Джонса»). Однако патологические белки могут быть выявлены также при остром плазмобластном лейкозе, лимфосаркомах, других онкологических заболеваниях, например при раке толстой кишки, молочной, предстательной железы и др.

### 12.1.5. СПЕЦИФИЧЕСКИЕ БЕЛКИ

Специфические белки крови выполняют разнообразные функции: осуществляют транспорт различных веществ, участвуют в свертывании крови, ингибируют протеолитические ферменты, активно участвуют в иммунологических реакциях. Помимо выполнения специфических функций, белки крови участвуют в общих реакциях организма на различные патологические процессы, отражая при этом в определенной степени состояние органов и тканей, что нашло применение в клинической практике.

На течение воспалительной реакции оказывают влияние многие органы и ткани, главным образом с помощью промежуточных метаболитов. Основным из органов служит печень. С началом воспалительного процесса любого характера и локализации в печени изменяется скорость синтеза, а следовательно, и состав, и количество определенных видов белков в крови. Белки, синтез которых неспец-

и физически увеличивается в ответ на патологические процессы различного характера (воспаление, повреждение, злокачественные новообразования, а также при беременности) называют реактантами острой фазы воспаления.

Уровень повышения реактантов острой фазы воспаления различен. Содержание С-реактивного белка (СРБ) может возрастать на 1000%, фибриногена, гаптоглобина и  $\alpha$ -1-антитрипсина — обычно на 200–400%, ферритина — на 50%.

Из специфических белков наиболее часто в клинической практике определяют уровень СРБ, орозомукоид,  $\alpha$ -1-антитрипсин и церулоплазмин.

**Кислый  $\alpha$ -1-гликопротеин (орозомукоид)** — белок плазмы крови, наиболее богатый углеводами. Обладает способностью ингибировать активность протеолитических ферментов, изменять адгезивность тромбоцитов, подавлять иммунореактивность, связывать многие медикаменты (пропранолол) и некоторые гормоны (прогестерон). Референтные величины содержания кислого  $\alpha$ -1-гликопротеина в сыворотке составляют 13,4–34,1 мкмоль/л (0,55–1,40 г/л).

Орозомукоид относят к белкам острой фазы. Содержание его в крови увеличивается при воспалительных процессах (инфекции, ревматические заболевания, травмы, хирургические вмешательства), опухолях. Исследование этого показателя в динамике позволяет оценивать протекание воспалительного процесса, а при опухолях в случае их оперативного лечения диагностировать возникновение рецидива.

Поскольку уровень орозомукоида в крови увеличивается при воспалительных процессах, он способен связывать повышенное количество принимаемого больным лекарственного средства, вследствие чего может возникать расхождение между фармакологическим эффектом и уровнем препарата в крови.

Снижение содержания орозомукоида может быть выявлено в раннем детском возрасте, при беременности (в ранние сроки), тяжелых поражениях печени, нефротическом синдроме, приеме эстрогенов, контрацептивов.

**$\alpha$ -1-Антитрипсин** считают гликопротеидом, синтезируемым печенью. Функционально он обеспечивает 90% активности, ингибирующей трипсин в крови. Этот гликопротеид тормозит действие не только трипсина, но и химотрипсина, эластазы, калликрейна, катепсинов и других протеолитических ферментов, способствуя их расщеплению. Референтные величины содержания  $\alpha$ -1-антитрипсина в сыворотке крови: у взрослых в возрасте до 60 лет — 0,78–2,0 г/л, старше 60 лет — 1,15–2,0 г/л.

$\alpha$ -1-Антитрипсин относят к белкам острой фазы, поэтому его содержание в сыворотке крови повышается при воспалительных процессах: острых, подострых и хронических инфекционных заболеваниях, острых гепатитах и циррозах печени в активной форме, некротических процессах, состояниях после операций и в восстановительной фазе термических ожогов, при вакцинации.

Особый интерес представляют случаи снижения содержания  $\alpha$ -1-антитрипсина в сыворотке крови. Выраженный врожденный его дефицит часто сочетается с ювенильной базальной эмфиземой легких, развитием эмфиземы у людей в возрасте 20–40 лет, муковисцидозом. Довольно часто встречаются стертые формы врожденной антитрипсиновой недостаточности. У таких детей обнаруживают различные формы поражения печени, включая ранние холестазы. У 1–2% больных развивается цирроз печени.

Приобретенный дефицит  $\alpha$ -1-антитрипсина встречаются при нефротическом синдроме, гастроэнтеропатии с потерей белка, острой фазе термических ожогов. Снижение  $\alpha$ -1-антитрипсина в крови может быть у больных вирусным гепатитом вследствие нарушения его синтеза в печени. Повышенное расходование этого гликопротеида при респираторном дистресс-синдроме, остром панкреатите, коагулопатиях также приводит к снижению его содержания в крови.

Церулоплазмин представляет собой белок, обладающий оксидазной (ферментативной) активностью. Он содержит 8 ионов  $\text{Cu}^+$ , 8 ионов  $\text{Cu}^{2+}$  и катализирует окисление кислородом различных веществ. Субстратами церулоплазмина в организме человека могут быть аскорбиновая кислота, соединения железа, норадреналин, серотонин и сульфгидрильные соединения. Он также инактивирует активные формы кислорода, предотвращая перекисное окисление липидов. Церулоплазмин — главный медьсодержащий белок плазмы, который относят к  $\alpha$ -2-глобулинам; на его долю приходится 3% общего содержания меди в организме и свыше 95% меди сыворотки. Ему принадлежит ведущая роль в транспорте меди к тканям. Церулоплазмин синтезируется в печени. Референтные величины содержания церулоплазмина в сыворотке крови у взрослых составляют 180–450 мг/л.

Определение уровня церулоплазмина в сыворотке крови играет важнейшую роль для диагностики болезни Вильсона–Коновалова (гепатоцеребральная дегенерация). В основе заболевания лежит генетический дефект синтеза белка в печени. При недостаточности церулоплазмина ионы меди после их всасывания в желудочно-кишечном тракте из продуктов питания попадают в общий кровоток. Однако из-за отсутствия церулоплазмина в плазме ионы меди быстро выходят во внесосудистое

пространство (содержание меди в крови снижается). Они проходят через базальные мембраны почек в гломерулярный фильтрат и выводятся с мочой или накапливаются в тканях (например, в роговице глаза). Для проявления клинических признаков заболевания особое значение имеет степень накопления меди в ЦНС. Недостаточность ионов меди в крови (вследствие дефицита церулоплазмина) приводит к повышению их резорбции в кишечнике, что еще больше способствует ее накоплению в организме с последующим повреждением органов и тканей. В наибольших количествах медь откладывается в печени и базальных ганглиях головного мозга, а также почечных канальцах. В клинической картине болезни симптомы поражения печени обычно появляются первыми. Патологический процесс в печени (гепатит) развивается, приводя через несколько лет к хронической печеночной недостаточности. В ткани мозга появляются полости и дегенеративные изменения не только в базальных ганглиях, но и в коре головного мозга, особенно в лобных долях. Неврологические симптомы чаще всего начинают отмечать с 6–8-летнего возраста. Возникают двигательные нарушения и отклонения в психике. Движения рук напоминают взмахи крыльев птицы. Могут возникнуть психические отклонения, задержка умственного развития. Поражение почек характеризуется развитием почечного канальцевого ацидоза, усиленной потерей с мочой аминокислот, неорганического фосфора, глюкозы (глюкозурия). Болезнь обычно прогрессирует медленно. Снижение уровня церулоплазмина в крови определяют у 97% пациентов с болезнью Вильсона–Коновалова.

Однако низкие уровни церулоплазмина в сыворотке крови могут быть выявлены также при нефротическом синдроме (потеря белка с мочой), заболеваниях желудочно-кишечного тракта (нарушение всасывания аминокислот), тяжелых заболеваниях печени (в 23% случаев) вследствие нарушения его синтеза, заболеваниях ЦНС (у 15% пациентов).

Церулоплазмин служит белком острой фазы (период полураспада 6 сут), поэтому возрастание его уровня наблюдают у больных с острыми и хроническими инфекционными заболеваниями, циррозом печени, гепатитами, инфарктом миокарда (ИМ), системными заболеваниями, лимфогранулематозом. Повышение уровня церулоплазмина может быть отмечено у больных шизофренией.

Содержание церулоплазмина в сыворотке крови увеличивается при злокачественных новообразованиях различной локализации (рак легкого, молочной железы, шейки матки, ЖКТ) в 1,5–2 раза, достигая более значительных величин при распространенности процесса. Успешное химио- и лучевое лечение сопровождается снижением уров-

ня церулоплазмينا, вплоть до нормального. При неэффективности комбинированной терапии, а также при прогрессировании заболевания содержание церулоплазмينا остается высоким.

### 12.1.6. С-РЕАКТИВНЫЙ БЕЛОК

СРБ определяют в сыворотке крови при различных воспалительных и некротических процессах, он служит показателем острой фазы их течения. Свое название этот белок получил из-за способности связывать С-полисахарид клеточной стенки пневмококка. Синтез СРБ как белка «острой фазы» происходит в печени под влиянием цитокинов (белки с небольшой молекулярной массой, продуцируемые ядродержащими клетками). Основные функции СРБ — активация иммунных реакций организма, связывание различных микроорганизмов и продуктов распада поврежденных тканей. В норме уровень СРБ в сыворотке крови составляет менее 5 мг/л.

Повышение уровня СРБ в крови, подобно увеличению СОЭ, — признак любого заболевания, связанного со значительным повреждением тканей, воспалением, инфекцией или злокачественной опухолью. В целом чем выше уровень СРБ в крови, тем выше вероятность наличия у больного повреждения тканей, воспалительного, инфекционного или онкологического заболевания.

**Повреждение тканей.** Целый ряд заболеваний, при которых происходит повреждение тканей, сопровождаются повышением уровня СРБ. Оно начинается в течение первых 4 ч от момента тканевого повреждения, достигает максимума через 24–72 ч и снижается в ходе выздоровления.

При ИМ (повреждение миокарда) уровень СРБ повышается через 18–36 ч от начала заболевания, к 18–20-му дню снижается и к 30–40-му дню приходит к норме. Высокие уровни СРБ служат прогностическими показателями неблагоприятного исхода ИМ.

Для всех форм острого панкреатита (повреждение поджелудочной железы) характерно значительное повышение содержания СРБ в сыворотке крови. Уровень его начинает повышаться приблизительно через 36 ч от начала заболевания. Установлено, что величины СРБ выше 150 мг/л свидетельствуют о тяжелом (панкреонекроз) или осложненном остром панкреатите.

После хирургических вмешательств (хирургическое повреждение) уровень СРБ повышается в ранний послеоперационный период, но начинает быстро снижаться при отсутствии инфекционных осложнений.

**Инфекционные заболевания.** Уровень СРБ в сыворотке крови считается самым ранним признаком бактериальной инфекции. Концентрация СРБ в сыворотке крови выше 80–100 мг/л почти всегда свидетельствует о бактериальной инфекции. Эффективная антибактериальная терапия сопровождается снижением уровня СРБ в крови.

**Воспалительные заболевания.** Любой воспалительный процесс в организме сопровождается повышенным синтезом некоторых белков плазмы (белки «острой фазы»), включая СРБ. Его уровень в крови отражает интенсивность воспалительного процесса. Контроль уровня СРБ важен для мониторинга течения многих заболеваний. Уровень СРБ при воспалительном процессе может повышаться в 20 раз и более. При активном ревматическом процессе повышение уровня СРБ обнаруживают у большинства больных. Одновременно со снижением активности ревматического процесса уменьшается и содержание СРБ. Ревматоидный артрит также сопровождается повышением уровня СРБ.

**Онкологические заболевания.** Синтез СРБ усиливается в ответ на появление в организме злокачественных опухолей различных локализаций. Повышение уровня СРБ отмечают при раке легкого, предстательной железы, желудка, яичников и других опухолей. Несмотря на свою неспецифичность, СРБ совместно с другими опухолевыми маркерами может служить тестом для оценки прогрессирования опухоли и диагностики рецидива заболевания.

**Ультрачувствительный (сверхчувствительный) СРБ.** Длительное время считали, что клинически значимым служит повышение уровня СРБ более 5 мг/л, при значениях ниже этой величины констатировали отсутствие системного воспалительного ответа. В дальнейшем было показано, что значения концентрации СРБ, превышающие 3 мг/л, служат неблагоприятным прогностическим признаком, связанным с риском сосудистых осложнений у практически здоровых людей и больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями. В связи с этим были разработаны ультрачувствительные тест-системы и наборы реактивов для определения уровня СРБ. Эти методы обладают примерно в 10 раз большей аналитической чувствительностью по сравнению с традиционными и позволяют регистрировать минимальные колебания концентрации СРБ в крови. Определение ультрачувствительного СРБ имеет большое практическое значение для определения риска развития тяжелых сердечно-сосудистых заболеваний и осложнений — ИМ и инсульта. При значениях СРБ ниже 1 мг/л риск развития сосудистых осложнений минимальный, при концентрации 1,1–1,9 мг/л — низкий, 2,0–2,9 мг/л — умеренный, выше 3 мг/л — высокий.

## 12.2. ПОКАЗАТЕЛИ АЗОТИСТОГО ОБМЕНА

Синтез и распад белков — единая система, сбалансированная всеми промежуточными реакциями, которые протекают на различных уровнях. Все эти реакции, представленные в организме человека, настолько многочисленны и разнообразны, что оценить их с использованием лабораторных показателей невозможно. Вместе с тем оценка ключевых звеньев промежуточного обмена белков и азотистых соединений крайне важна для оценки функционального состояния жизненно важных органов и тканей, таких как печень, почки, мышечная система. При этом под промежуточным обменом следует понимать превращение компонентов пищи после их переваривания и всасывания в организме человека. Он включает процессы:

- анаболические — процессы синтеза белков (анаболизм);
- катаболические — процессы распада белков, образования промежуточных и конечных продуктов метаболизма (катаболизм).

У здорового взрослого человека обновление белков в норме составляет 1–2% общего количества белков тела за сутки и связано преимущественно с деградацией мышечных белков до аминокислот. При этом примерно 75–80% высвободившихся аминокислот снова используется в синтезе белков. Оставшаяся часть метаболизируется до конечных продуктов азотистого обмена (аммиак, мочевина), удаляемых из организма с мочой, а также превращается в глюкозу. Суточная деградация белка составляет 30–40 г. Для поддержания нормального стационарного состояния взрослый человек нуждается в потреблении в среднем 30–40 г белка или эквивалентного количества аминокислот.

Белки состоят из аминокислот, которые обязательно содержат аминогруппу, в состав которой входит азот. Именно поэтому для оценки состояния белкового обмена в медицинской практике широко используют термин «азотистый баланс». Баланс азота в организме — разность между количеством потребленного и выделенного азота. У здорового человека скорости анаболизма и катаболизма находятся в равновесии, поэтому азотистый баланс равен нулю. При травме или стрессе (например, при ожогах) потребление азота снижается, а потери азота могут быть больше потребления, тогда у больного развивается отрицательный азотистый баланс. При выздоровлении азотистый баланс становится положительным вследствие получения белка с пищей. Исследование азотистого баланса дает более полную информацию о состоянии пациента, у которого имеются метаболические потребности в азоте.



Общий азот включает все продукты обмена белков, выводимые с мочой. Количество общего азота сопоставимо с азотом усвоенного белка и составляет примерно 85% азота, поступившего с белками пищи. Белки содержат в среднем 16% азота. Определение общего азота важно для последующей оценки состояния азотистого обмена. Однако методы определения общего азота достаточно сложны и не нашли широкого применения в лаборатории.

Помимо азота белков, не меньшее значение имеет небелковый азот, который называют также остаточным — то количество азота, которое остается в сыворотке крови после удаления из нее белков путем осаждения. Небелковый азот крови включает азот мочевины (50% общего количества небелкового азота), аминокислот (25%), мочевой кислоты (4%), креатина (5%), креатинина (2,5%), аммиака и индикана (0,5%), других небелковых веществ (5%), содержащих азот (полипептиды, нуклеотиды, нуклеозиды, глутатион, билирубин, холин, гистамин и др.).

Таким образом, в состав небелкового (остаточного) азота крови входит главным образом азот конечных продуктов обмена простых и сложных белков.

У здорового человека колебания в содержании небелкового азота в крови незначительны и в основном зависят от количества поступающих с пищей белков. При ряде патологических состояний содержание небелкового азота в крови повышается. Это повышение остаточного азота в крови носит название «азотемия». Оно служит свидетельством нарушения нормальных взаимоотношений образования и выделения продуктов азотистого метаболизма из организма пациента.

Различные виды азотемии приводят к неодинаковым изменениям составляющих остаточного азота в крови и моче. Именно поэтому для более детального анализа характера азотемии в клинической практике целесообразно отдельно определять в крови концентрацию основных составляющих веществ остаточного азота (мочевина, азот аминокислот, мочевая кислота, креатинин, аммиак). Учитывая, что на долю мочевины приходится около 50% всего небелкового азота, уровень мочевины крови в большинстве случаев наиболее адекватно отражает состояние всего азотистого обмена в организме человека.

Определение концентрации мочевины и креатинина в сыворотке крови входит практически во все стандарты обследования больных. Оба теста в основном используют для оценки функции почек. Далее рассматриваются маркерная роль и клиническое значение этих метаболитов более детально.

### 12.2.1. МОЧЕВИНА И КРЕАТИНИН

Конечным продуктом нормального клеточного метаболизма является аммиак ( $\text{NH}_3$ ). Это токсичный продукт, который образуется при дезаминировании аминокислот, распаде пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов. Аммиак доставляется кровью в печень, где обезвреживается, превращаясь в мочевины в процессе целого ряда ферментативных реакций. Этот процесс называют циклом синтеза мочевины (цикл мочевины). На рис. 12.1 представлены процессы превращения аммиака и дальнейшая судьба мочевины в организме человека.

Креатинин служит конечным продуктом распада креатина, который играет важную роль в энергетическом обмене мышечной ткани и др. Креатин синтезируется в основном в печени, откуда с током крови поступает в мышечную ткань. Здесь он, фосфорилируясь, превращается в креатинфосфат, который является макроэргом и участвует в переносе энергии в клетке между митохондриями и миофибриллами. В дальнейшем креатин превращается в креатинин, который высвобождается из миоцитов и кровью доставляется в почки, откуда экскретируется вместе с мочевиной в составе мочи. Его образование — величина довольно постоянная и непосредственно зависит от состояния мышечной массы. Креатинин удаляется почками посредством клубочковой фильтрации, но, в отличие от мочевины, не реабсорбируется, что делает его хорошим маркером для оценки скорости клубочковой фильтрации (СКФ). Концентрация креатинина в крови зависит от его образования и выведения. Экскреция креатинина отражает метаболизм мышечного белка. При истощении мышечной массы наблюдают снижение экскреции креатинина с мочой.

### 12.2.2. РЕГУЛЯЦИЯ ПОЧКАМИ УРОВНЯ МОЧЕВИНЫ И КРЕАТИНИНА В КРОВИ

Почки выполняют функцию фильтра для крови, который освобождает организм от нежелательных продуктов метаболизма (в том числе мочевины, креатинина, мочевой кислоты и др.), а также избыточного количества электролитов (калий, натрий, кальций, магний, хлор и др.). Моча — продукт почечной фильтрации, представляет собой водный раствор этих нежелательных продуктов. Благодаря своей способности изменять объем и состав мочи почки играют важнейшую роль в поддержании постоянства плазмы крови и интерстициальной жидкости, окружающей клетки тканей организма. Такое постоянство внутренней

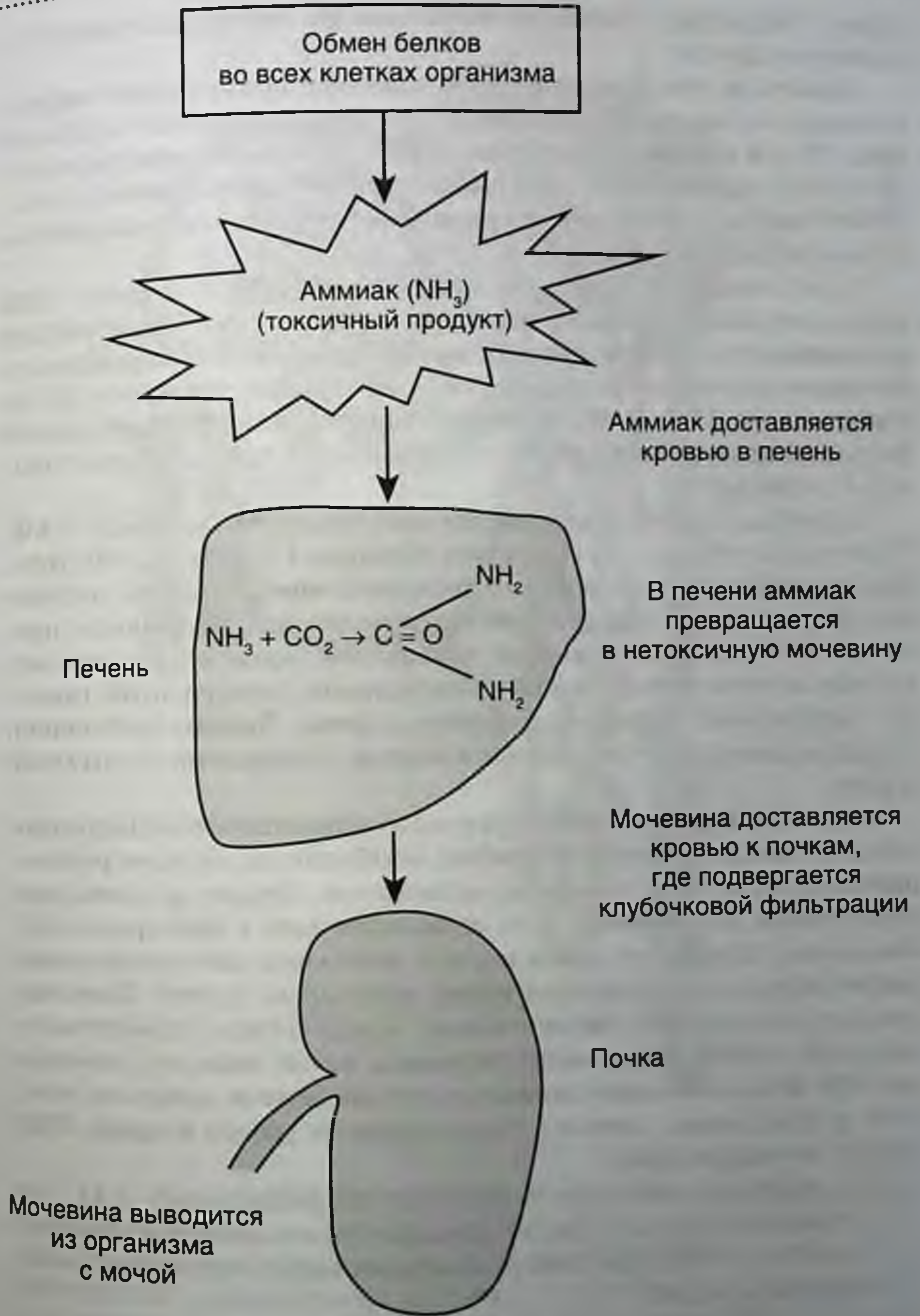


Рис. 12.1. Образование и выведение мочевины из организма

среды (гомеостаза) — необходимое условие для нормального функционирования клеток.

Напомним, что функциональной единицей почки служит нефрон, который состоит из гломерулярного клубочка и почечных канальцев (рис. 12.2). В клубочках происходит фильтрация воды и нежелательных продуктов метаболизма (низкомолекулярных компонентов) крови. Одновременно клубочки удерживают клетки и высокомолекулярные компоненты (белки) в крови.

Через почки протекает каждую минуту более 1 л крови (25% минутного объема кровообращения всего организма). Такая высокая интенсивность почечного кровотока сопровождается образованием большого количества фильтрата: за 1 мин в почках образуется 125 мл фильтрата, за 24 ч — 180 л. Образующийся фильтрат (клубочковый фильтрат) представляет собой по сути плазму, освобожденную от белков и клеток крови.

Скорость, с которой образуется этот фильтрат, называют СКФ. У здорового человека она составляет в среднем 125 мл/мин (180 л/сут). При прохождении клубочкового фильтрата через канальцы нефрона его состав и объем существенно видоизменяются. В канальцах примерно 99% профильтрованных клубочками воды и аминокислот, средних и низкомолекулярных полипептидов, электролитов, глюкозы и других реабсорбируются обратно в кровь. Помимо реабсорбции, канальцы секретируют некоторые вещества непосредственно из крови в мочу.

Мочевина и креатинин фильтруются из крови в почечных клубочках. Оба этих продукта служат побочными метаболитами, поэтому реабсорбируются из мочи в небольших количествах. Однако для мочевины этот процесс активизируется, если ее концентрация в фильтрате слишком высока. Креатинин же и в норме в небольших количествах может секретироваться из крови почечными канальцами в мочу. Поскольку влияние этих эффектов незначительно, можно сказать, что количество мочевины и креатинина, экскретируемое с мочой, зависит в основном от СКФ. Когда последняя снижается, уменьшается и экскреция мочевины и креатинина, а значит, повышаются их уровни в крови. СКФ зависит от трех факторов:

- скорости, с которой кровь поступает для фильтрации;
- состояния (проходимости) фильтра («блокирование» фильтра, например ЦИК при гломерулонефрите ведет к снижению скорости фильтрации);

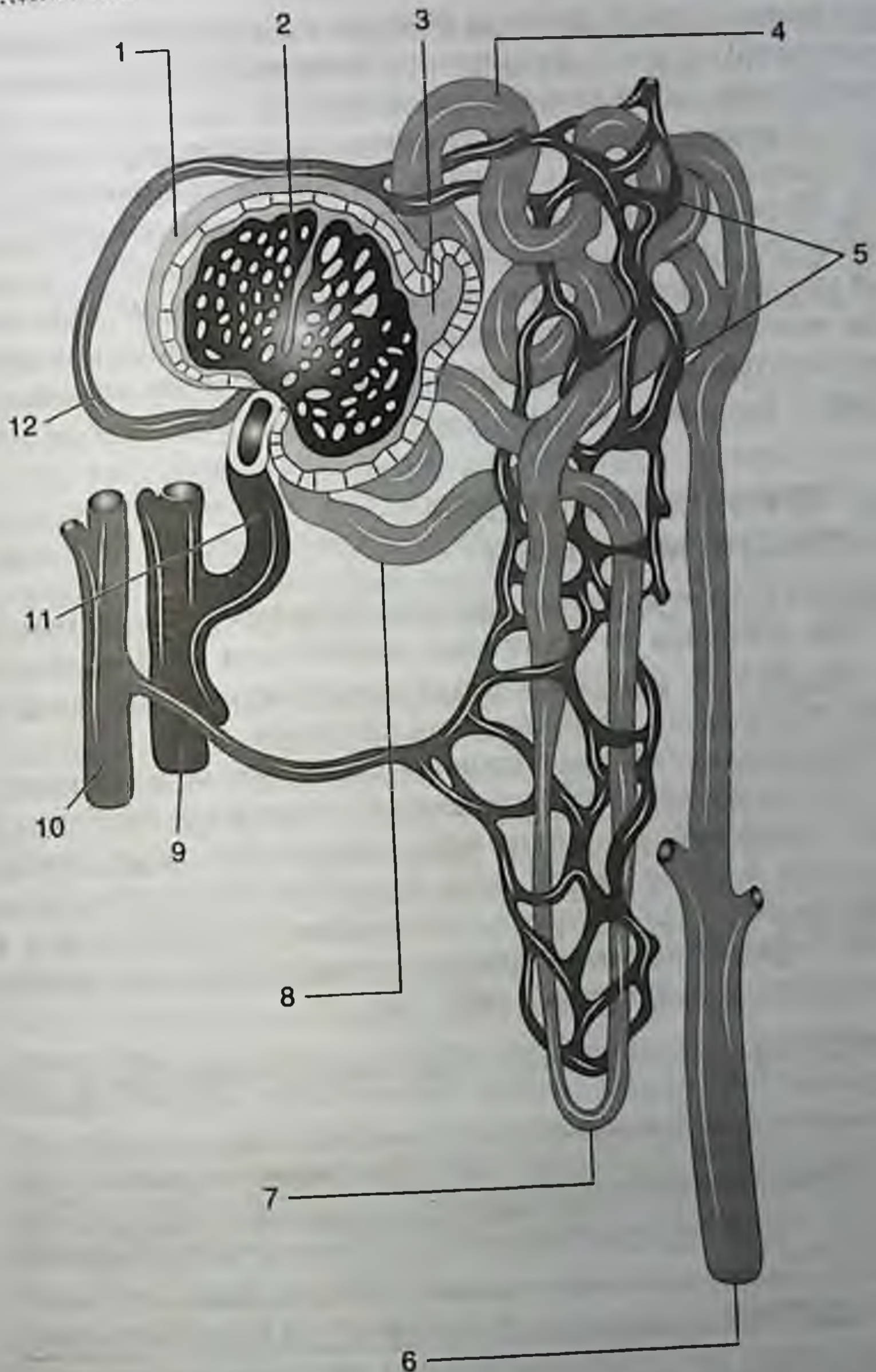


Рис. 12.2. Строение и кровоснабжение нефрона: 1 — капсула клубочка (Шумлянско-Боумена); 2 — клубочек почечного тельца; 3 — просвет капсулы клубочка; 4 — проксимальная часть канальца нефрона; 5 — кровеносные клубочки; 6 — собирательная трубочка; 7 — петля нефрона; 8 — дистальная капилляры; 9 — артерия; 10 — вена; 11 — приносящая клубочковая артериола; 12 — выносящая клубочковая артериола

- давления с другой стороны фильтра, противодействующего (снижающего) скорость фильтрации (например, блокирование мочевыводящих путей камнем или опухолью).

Таким образом, выведение мочевины и креатинина, а соответственно и их уровень в крови в основном регулируются почками и зависят от СКФ. Если СКФ, отражающая функциональное состояние почек, снижается, то уровни мочевины и креатинина в крови возрастают. Именно поэтому исследование содержания в крови мочевины и креатинина используют в клинической практике для оценки функционального состояния почек, которое может нарушаться при целом ряде заболеваний и состояний.

### 12.2.2.1. ПРИЧИНЫ ИЗМЕНЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ МОЧЕВИНЫ

Мочевина служит конечным продуктом метаболизма белков в организме. Она удаляется из организма посредством клубочковой фильтрации, 40–50% ее реабсорбируется канальцевым эпителием почек и активно секретруется тубулярными клетками.

Концентрация мочевины в крови — отражение баланса между скоростью ее синтеза в печени и выведения почками с мочой. Если синтез/продукция увеличивается и/или выведение уменьшается, концентрация мочевины в крови растет. Если же синтез/продукция снижается и/или экскреция увеличивается, концентрация мочевины в крови снижается. Референтные величины содержания мочевины (азота мочевины) в сыворотке приведены в табл. 12.2.

Таблица 12.2. Референтные величины содержания мочевины (азота мочевины) в сыворотке

Исследуемый показатель	Содержание мочевины	
	ммоль/л	мг/дл
Мочевина	2,5–8,3	15–50
Азот мочевины	2,5–8,3	7,5–25

При патологии сдвиги уровня мочевины крови зависят от соотношения процессов ее образования и выведения.

**Причины снижения концентрации мочевины в сыворотке крови.** К снижению концентрации мочевины в сыворотке крови могут привести целый ряд физиологических причин и некоторые патологические процессы.

- Диета с низким содержанием белков сопровождается снижением уровня мочевины в крови. Это обусловлено тем, что при сниженном поступлении белков и аминокислот с пищей в организме меньше образуется аммиака и соответственно меньше синтезируется мочевины, чем при нормальном питании.
- Беременность обычно приводит к увеличению СКФ и, как следствие, к повышению скорости выведения мочевины. Именно поэтому беременные, как правило, имеют более низкий уровень мочевины в крови, чем небеременные.
- Болезни печени — основная причина патологического снижения уровня мочевины в крови. Синтез мочевины происходит в печени. Функциональные возможности печени настолько велики, что при ее заболеваниях легкой и средней степени тяжести нарушения синтеза мочевины не отмечают. Однако для больных с печеночной недостаточностью характерно снижение синтеза мочевины и накопление в крови токсичного аммиака.

**Причины повышения концентрации мочевины в сыворотке крови.** К повышению концентрации мочевины в сыворотке крови могут привести две основные группы причин: внепочечные и почечные.

Внепочечные причины связаны с повышенным образованием мочевины в организме при нормальной выделительной функции почек. Такого рода надпочечную недостаточность называют еще продукционной. Основные внепочечные причины повышения концентрации мочевины в сыворотке крови следующие.

- Потребление очень большого количества белковой пищи.
- Длительное голодание, которое сопровождается усилением катаболизма белков собственных тканей. Возросший распад белков приводит к повышению синтеза мочевины. Это можно наблюдать при различных воспалительных процессах, у тяжелых больных, находящихся в отделении реанимации.
- Обезвоживание в результате рвоты, поноса. При дегидратации количество реабсорбированной из почечных канальцев в кровь мочевины (после клубочковой фильтрации) увеличивается.
- Желудочно-кишечные кровотечения из язв, опухолей. Кровь попадает в кишечник, в результате всасывание белков (кровь содержит большое количество белка) увеличивается и, следовательно, вызывает активацию синтеза мочевины.

Однако при этих состояниях избыток мочевины быстро удаляется из организма почками, и ее концентрация в крови вскоре приходит в норму.

Повышение мочевины в крови наиболее часто возникает в результате нарушения выделительной функции почек. Уровень мочевины в крови возрастает, если СКФ снижается.

В соответствии с приведенными выше факторами, способствующими снижению СКФ, все причины, определяющие развитие почечной недостаточности, можно разделить на три группы:

- преренальные (уменьшение потока крови к почкам);
- ренальные (повреждение собственно почечного фильтра);
- постренальные (затруднение оттока мочи).

Патология, лежащая в основе преренальных механизмов почечной недостаточности, приводит к повышению уровня мочевины в крови и характеризуется низкой СКФ вследствие уменьшения тока крови через почечные клубочки. При этом структура нефрона остается в норме, но нарушается его функция. Наиболее частые причины преренальной дисфункции почек следующие.

- Дегидратация и снижение ОЦК (шок, обильные кровотечения, тяжелая диарея, обильная рвота).
- Острая или хроническая сердечно-сосудистая недостаточность. Снижение АД или недостаточность сократительной функции миокарда приводит к снижению СКФ.

Старение ассоциируется со снижением СКФ, поэтому уровень мочевины в крови с возрастом увеличивается.

Ренальная патология сопровождается низкой СКФ вследствие «блокирования» клубочкового фильтра. Структура нефронов нарушена, и соответственно нарушена их функция. Причинами почечной недостаточности могут быть следующие формы патологии.

- Острые и хронические гломерулонефриты. При остром гломерулонефрите повышение мочевины наблюдают редко и, как правило, кратковременно, при хроническом уровень мочевины может колебаться, повышаясь при обострении процесса и снижаясь при его затухании.
- Хронические пиелонефриты. Повышение мочевины у этих больных зависит от выраженности нефросклероза и воспалительного процесса в почках.
- Нефросклерозы, вызванные отравлениями солями ртути, гликолями, дихлорэтаном, другими токсичными веществами.
- Синдром длительного сдавливания (размозжения). Уровень мочевины в крови бывает очень высоким, что объясняется сочетанием задержки выведения мочевины с повышенным распадом белков.



- Диабетическая нефропатия.
- Гипертоническая болезнь со злокачественным течением.
- Подагра.
- Гидронефроз, выраженный поликистоз, туберкулез почки.
- Амиллоидный или амиллоидно-липоидный нефроз; повышение мочевины в крови у таких больных наблюдают только на поздних стадиях развития заболевания.

Патология, лежащая в основе постренальных механизмов почечной недостаточности, проявляется низкой СКФ вследствие блокирования мочевыводящих путей. Она возникает при задержке выделения мочи из-за каких-либо препятствий в мочевыводящих путях (камень, опухоль, в частности аденома или рак предстательной железы).

Значительное повышение уровня мочевины в крови ( $>10,0$  ммоль/л) всегда свидетельствует о поражении почек, более умеренное повышение этого показателя (от 6,5 до 10,0 ммоль/л) может быть проявлением другой патологии.

Необходимо помнить, что нормальная концентрация мочевины в крови не исключает ранней стадии почечного заболевания. Увеличение концентрации мочевины в крови наблюдают только при значительном снижении функции почек. Концентрация мочевины в крови не выходит за пределы нормы до тех пор, пока СКФ не становится ниже 40 мл/мин, то есть на 50% менее нормального значения.

Продолжительное увеличение содержания мочевины в сыворотке крови выше значения 10,0 ммоль/л следует расценивать как проявление почечной недостаточности.

При развитии острой почечной недостаточности (ОПН) мочевины в крови нередко достигает очень высоких концентраций — 133,2–149,8 ммоль/л.

В клинической практике увеличение концентрации мочевины в крови, отмечаемой у больных с выраженным синдромом интоксикации, называют уремией.

Выведение мочевины с мочой пропорционально содержанию белка в рационе питания, а также скорости метаболизма эндогенных белков. Удаляемая с мочой мочевина составляет около 90% всех выводимых из организма азотистых метаболитов. У взрослых в состоянии азотистого равновесия выделение 500 ммоль мочевины (или 14 г азота мочевины) в течение суток соответствует потреблению около 100 г белка. Референтные величины содержания мочевины (азота мочевины) в моче отражены в табл. 12.3.

Таблица 12.3. Референтные величины содержания мочевины (азота мочевины) в моче

Исследуемый показатель	Содержание мочевины в моче	
	ммоль/сут	г/сут
Мочевина	430–710	24–40
Азот мочевины	430–710	12–20

Уменьшение выделения мочевины с мочой отмечают в период роста, во время беременности, у тех, кто придерживается углеводного рациона питания с низким содержанием белка.

В клинической практике определение мочевины в моче используют для контроля состояния процессов анаболизма и катаболизма в организме (для расчета баланса азота в организме) Это имеет большое значение, особенно у тяжелых больных реанимационных отделений, получающих энтеральное (зондовое) и парентеральное питание.

Для оценки азотистого баланса определяют концентрацию мочевины (азота мочевины) в суточной моче, по которой затем рассчитывают общие потери азота.

### 12.2.2.2. ПРИЧИНЫ ИЗМЕНЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ КРЕАТИНИНА

Содержание креатинина в крови здоровых людей — величина довольно постоянная и мало зависящая от питания и других внепочечных факторов. Референтные величины содержания креатинина в сыворотке представлены в табл. 12.4.

Таблица 12.4. Референтные величины содержания креатинина в сыворотке крови

Возраст	Содержание креатинина в сыворотке	
	мкмоль/л	мг/дл
Новорожденные	27–88	0,3–1,0
Дети до 1 года	18–35	0,2–0,4
Дети от 1 года до 12 лет	27–62	0,3–0,7
Подростки	44–88	0,5–1,0
Взрослые:		
мужчины;	62–132	0,7–1,4
женщины	44–97	0,5–1,1

Ряд физиологических и патологических состояний может приводить к отклонению концентрации креатинина в сыворотке крови от нормальных значений.

**Причины снижения уровня креатинина в крови.** Снижение уровня креатинина в крови не имеет существенного значения. Тем не менее необходимо знать, что его уровень может снижаться при беременности в результате увеличения экскреции креатинина почечными канальцами. Как известно, креатинин синтезируется в мышцах, поэтому любое заболевание, сопровождаемое существенным снижением мышечной массы (например, мышечные дистрофии), может сопровождаться патологическим снижением уровня креатинина в сыворотке крови.

**Причины повышения уровня креатинина в крови.** Уровень креатинина в крови, в отличие от мочевины, не повышается при сепсисе, травмах, лихорадочных состояниях, не зависит от степени гидратации организма, повышенного потребления белка.

Определение креатинина широко используют в диагностике заболеваний почек. Креатинин в меньшей степени, чем мочевина, зависит от уровня катаболизма, не реабсорбируется в почках, поэтому в большей мере отражает степень нарушения фильтрационной и выделительной функции почек.

Повышение уровня креатинина в крови в большинстве случаев — признак почечной недостаточности, которая нередко сопровождается различными заболеваниями почек. Причины развития почечной недостаточности аналогичны приведенным для мочевины.

**Критерии диагностики острой почечной недостаточности (ОПН):**

- уровень креатинина в сыворотке крови 200–500 мкмоль/л (2–3 мг%);
- увеличение уровня креатинина в сыворотке крови на 45 мкмоль/л (0,5 мг%) при исходном значении ниже 170 мкмоль/л (<2 мг%);
- повышение уровня креатинина по сравнению с исходным в 2 раза.

Тяжелая ОПН характеризуется уровнем креатинина в сыворотке крови более 500 мкмоль/л (>5,5 мг%). Нередко содержание в крови креатинина может достигать 800–900 мкмоль/л, а в отдельных случаях — 2650 мкмоль/л и выше.

Однако увеличение уровня креатинина и мочевины при ОПН — довольно поздние ее признаки. Повышение диагностируют, когда поражено более 50% нефронов.

Показаниями для проведения гемодиализа у больных с ОПН считают признаки начинающейся или выраженной уремической интоксикации — повышение креатинина в крови до 0,70–0,88 ммоль/л (8–10 мг%), уровня мочевины крови — до 25 ммоль/л (150 мг%).

Следует помнить, что такие заболевания, как гипертиреоз, акромегалия, гигантизм, СД, кишечная непроходимость, мышечная дис-

трофия, обширные ожоги, также могут сопровождаться повышением уровня креатинина в крови.

Суточное выделение креатинина с мочой относительно постоянно, эквивалентно суточному образованию и непосредственно зависит от массы мышц и выделительной способности почек. Насыщенный животными белками рацион питания дает повышение выделения креатинина с мочой. Референтные величины содержания креатинина в моче представлены в табл. 12.5.

Таблица 12.5. Референтные величины содержания креатинина в моче

Возраст	Содержание креатинина в моче	
	мг/кг в сутки	мкмоль/кг в сутки
Дети до 1 года	8–20	71–177
Дети от 1 года до 12 лет	8–22	71–194
Подростки	8–30	71–265
Взрослые: мужчины женщины	14–26 (800–2000 мг/сут) 11–20 (600–1800 мг/сут)	124–230 (7,1–17,7 ммоль/сут) 97–177 (5,3–15,9 ммоль/сут)

Одновременное определение концентрации креатинина в крови и моче значительно расширяет диагностические возможности оценки функционального состояния почек. Оно получило название «проба Реберга–Тареева».

### 12.2.3. КЛИРЕНС ЭНДОГЕННОГО КРЕАТИНИНА (ПРОБА РЕБЕРГА–ТАРЕЕВА)

Основополагающим процессом мочеобразования служит клубочковая фильтрация. Она протекает в почечном клубочке, состоящем приблизительно из 50 капилляров, у которых суммарная фильтрационная поверхность приблизительно равна поверхности тела, то есть около 2 м<sup>2</sup>, что обеспечивает образование ежесуточно около 180 л первичной мочи, поступающей в канальцы. Скорость, с которой образуется первичная моча (фильтрат), называют СКФ. На образование первичной мочи почка практически не потребляет энергии, так как фильтрация происходит под влиянием гидростатического АД.

СКФ — чувствительный показатель функционального состояния почек. Концентрация мочевины и креатинина в сыворотке крови отражает СКФ и влияет на нее, но не позволяет прямо ее измерить.

Это обусловлено тем, что уровни этих метаболитов в крови не увеличиваются существенно до тех пор, пока почки не теряют свою функцию (образование первичной мочи) на 50%. Именно поэтому концентрация мочевины и креатинина в сыворотке крови служит плохим индикатором незначительных нарушений функции почек на ранних стадиях почечных заболеваний. В связи с этим для повышения информативности оценки СКФ в клинической практике определяют клиренс креатинина (проба Реберга–Тареева), который также имеет некоторые недостатки. Тем не менее это достаточно адекватный и доступный метод прямого измерения СКФ и, следовательно, более чувствительный и специфичный способ диагностики почечной недостаточности на ранних стадиях, чем оценка содержания мочевины и креатинина в крови. Клиренс креатинина — объем плазмы крови, который очищается от креатинина за 1 мин при прохождении через почки. Чем эффективнее работают почки по очищению крови от креатинина и выведению его с мочой, тем выше клиренс.

В норме клиренс креатинина или СКФ у здоровых людей колеблется от 80 до 160 мл/мин, составляя  $120 \pm 25$  мл/мин у мужчин и  $95 \pm 20$  мл/мин у женщин.

При заболеваниях почек величину клиренса креатинина (СКФ) принято считать достаточно корректным критерием оценки массы действующих нефронов, параметра важного, в том числе с позиций клинической фармакологии, так как фармакокинетика многих медикаментов зависит от величины этого показателя.

Общепринятой методикой оценки СКФ считают исследование клиренса креатинина (проба Реберга–Тареева). Креатинин, будучи низкомолекулярным веществом, беспрепятственно приходит из крови в состав первичной мочи в процессе клубочковой фильтрации безбелковой плазмы крови. Таким образом, концентрация креатинина в фильтрате, то есть первичной моче, соответствует его плазматической концентрации — концентрации креатинина в исследуемой сыворотке крови ( $K_{кр}$ ). Следовательно, количество креатинина (ммоль/мин), поступающее в фильтрат, соответствует произведению концентрации креатинина в фильтрате на минутный объем фильтрата:  $K_{кр} \times V$ .

#### Порядок проведения пробы Реберга–Тареева

- Пациент не нуждается в специальной подготовке.
- Пациент в течение суток собирает мочу (всю выделенную мочу за 24 ч). Утром он идет в туалет. Обязательно фиксирует время (нулевое время). Первую утреннюю порцию не собирает (выпус-

каст в унитаз), а собирает все последующие порции точно до этого же времени следующего дня (за сутки в емкость объемом 3 л). По окончании сбора суточной мочи емкость завинчивают крышкой и доставляют в лабораторию.

- Утром дня окончания сбора мочи у пациента берут венозную кровь для определения концентрации креатинина.
- Для получения точных результатов чрезвычайно важно полностью собрать мочу за 24 ч и указать в направлении на исследование, что это суточная моча. Неправильный сбор мочи приведет к ложным результатам.

В лаборатории определяют концентрацию креатинина в сыворотке крови ( $K_{кр}$ ) и суточной моче ( $K_{м}$ ) пациента, а также рассчитывают минутный диурез —  $D$  исходя из суточного объема мочи, собранного пациентом. Например, за сутки пациент выделил 1350 мл мочи. Это количество (мл) необходимо разделить на 24 ч, выраженные в минутах — 1440 мин. Следовательно, в данном примере минутный диурез составил 0,94 мл/мин.

Клиренс креатинина рассчитывают по следующей формуле:

$$\text{клиренс креатинина} = K_{м}/K_{кр} \times D.$$

Пробу Реберга—Тареева можно выполнять и за более короткие отрезки времени (например, за 1–2 ч). Однако, проводя быстрое исследование клиренса креатинина, необходимо учитывать возможность значительной ошибки при сборе небольшого объема мочи из-за недоучета «остаточной мочи» в мочевом пузыре, низкого диуреза и аналитической вариации метода определения концентрации креатинина. Для повышения адекватности определения клиренса креатинина желательно добиваться диуреза у обследуемого пациента в объеме не менее 1,5 мл/мин, что обеспечивают дополнительной небольшой водной нагрузкой в объеме 1–2 стаканов воды.

**Порядок проведения пробы Реберга—Тареева за более короткий промежуток времени.** Больной утром мочится, выпивает 200 мл воды и затем натошак в состоянии полного покоя собирает мочу за точно определенное непродолжительное время (2 ч). Посередине этого отрезка времени берут кровь из вены. При направлении проб в лабораторию для получения правильных результатов определения СКФ в направлении на исследование очень важно указать, за какой отрезок времени собрана моча.

В норме величины клубочковой фильтрации наиболее низки утром, повышаясь до максимальных в дневные часы, и вновь снижаются вечером. У здоровых людей снижение СКФ происходит под влиянием

тяжелой физической нагрузки и отрицательных эмоций; возрастает после питья жидкости и приема высококалорийной пищи.

Определение клиренса креатинина служит прямым методом измерения СКФ, поэтому его величина снижается при уменьшении СКФ. Уменьшение величины клиренса креатинина по сравнению с нормальными величинами свидетельствует о повреждении почек. По уровню снижения клиренса креатинина можно судить о тяжести их поражения, но не о диагнозе, так как СКФ уменьшается при заболеваниях почек разной этиологии. Этот показатель — более чувствительный индикатор ранних стадий почечной недостаточности.

Снижение СКФ наблюдают при острых и хронических гломерулонефритах, нефросклерозах, так как это один из ранних симптомов нарушения функции почек.

На СКФ оказывают влияние экстраренальные факторы. Так, СКФ снижается при сердечной и сосудистой недостаточности, обильном поносе и рвоте, гипотиреозе, механическом затруднении оттока мочи (из-за опухоли предстательной железы), поражении печени. В начальной стадии острого гломерулонефрита снижение СКФ происходит не только вследствие нарушения проходимости клубочковой мембраны, но и в результате системных расстройств гемодинамики. При хроническом гломерулонефрите снижение СКФ может быть обусловлено азотемической рвотой и поносом.

Стойкое падение СКФ до 40 мл/мин при хронической почечной патологии указывает на выраженную почечную недостаточность, падение до 15—10—5 мл/мин — на развитие терминальной почечной недостаточности.

Повышение уровня мочевины в крови более 35,0 ммоль/л, креатинина более 1200 мкмоль/л и снижение клиренса креатинина менее 10 мл/мин считают показанием для проведения экстренного гемодиализа.

Клиренс эндогенного креатинина можно быстро рассчитать по номограмме (рис. 12.3) без определения концентрации креатинина в моче (нет необходимости собирать мочу). Для этого необходимо знать массу тела больного (кг), возраст (лет) и концентрацию креатинина в сыворотке крови (мкмоль/л). Первоначально прямой линией соединяют возраст пациента и его массу тела, отмечают точку на линии А. Затем отмечают концентрацию креатинина в сыворотке крови на шкале и соединяют прямой линией с точкой на линии А, продолжая ее до пересечения со шкалой клиренса креатинина. Точка пересечения прямой линии со шкалой клиренса эндогенного креатинина и есть СКФ.

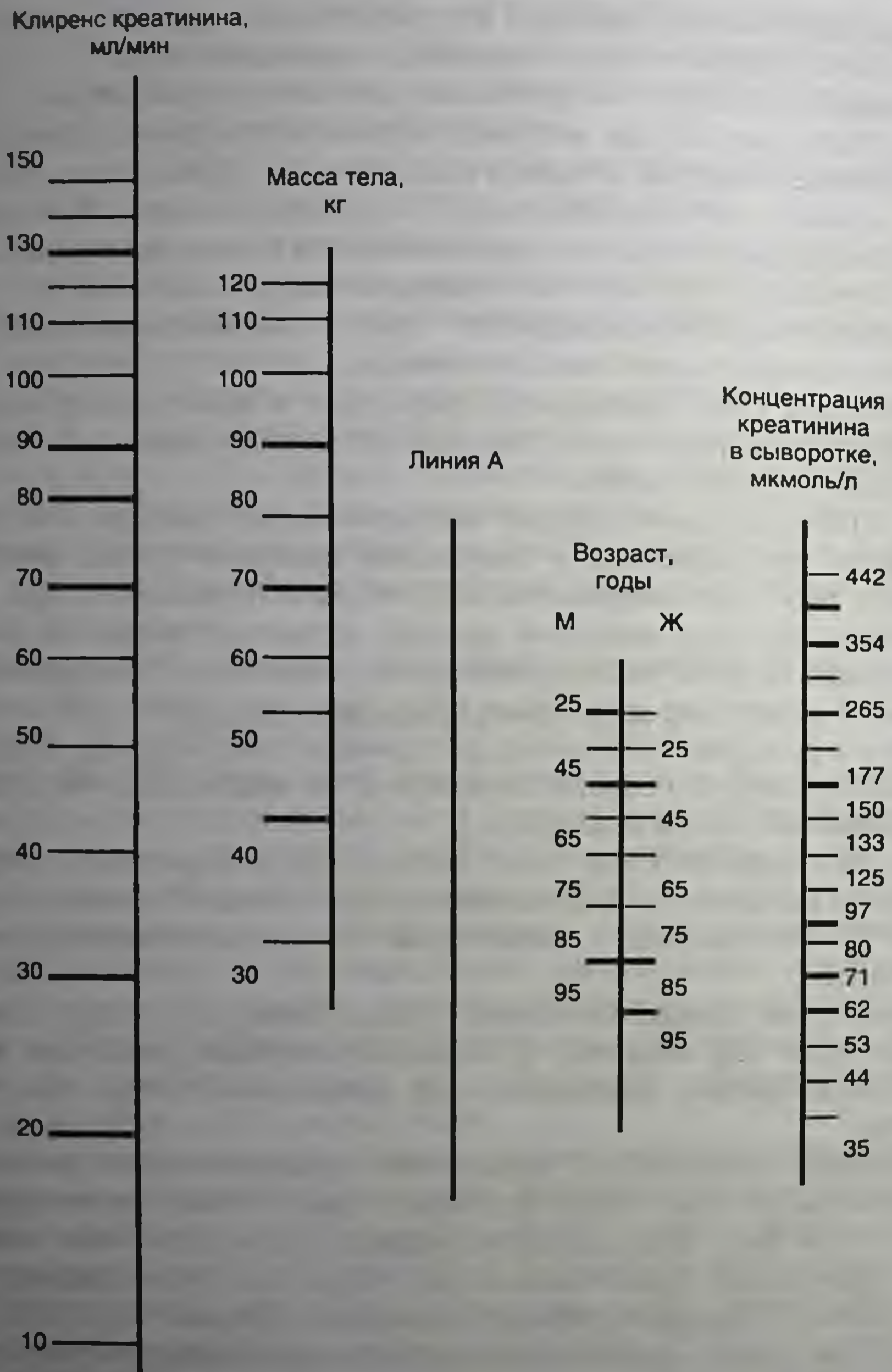


Рис. 12.3. Номограмма расчета клиренса креатинина без сбора мочи

Сущность пробы Реберга–Тареева в том, что наряду с определением СКФ (клиренса креатинина) одновременно оценивают и состояние канальцевой реабсорбции. Определение канальцевой реабсорбции —



метод объективной оценки концентрационной функции почек. При этом никаких дополнительных анализов пациенту не требуется. Все показатели, которые используют при определении клиренса креатинина, применяют и для расчета канальцевой реабсорбции.

Концентрационную функцию почек наиболее часто в клинической практике оценивают по величине составляющего показателя общего анализа мочи — относительной плотности мочи (удельного веса). Если плотность мочи в норме, то концентрационная функция почек не нарушена. С этой же целью исследуют мочу по Зимницкому. Тем не менее нередко при назначении исследования клиренса креатинина (СКФ) одновременно определяют и канальцевую реабсорбцию.

*Канальцевую реабсорбцию* (КР) рассчитывают по разнице между клубочковой фильтрацией и минутным диурезом (Д) и вычисляют в процентах к клубочковой фильтрации по формуле:

$$\text{КР} = (\text{СКФ} - \text{Д}) / \text{СКФ} \times 100.$$

В норме канальцевая реабсорбция составляет от 95 до 99% клубочкового фильтрата.

Канальцевая реабсорбция может значительно меняться в физиологических условиях, снижаясь до 90% при водной нагрузке. Выраженное снижение реабсорбции происходит при форсированном диурезе, вызванном мочегонными средствами. Наибольшее снижение ее наблюдают у больных несхарным диабетом.

При различных заболеваниях почек периоды (время) возникновения нарушения (снижения) СКФ и канальцевой реабсорбции могут существенно отличаться, что используют для оценки динамики течения заболеваний.

При гломерулонефритах, когда первично поражается фильтр почечного клубочка, канальцевая реабсорбция снижается позднее, чем СКФ. Понижение СКФ, как правило, наступает значительно раньше, чем снижение концентрационной функции почек и накопление в крови мочевины и креатинина. Кроме того, недостаточность концентрационной функции почек диагностируют достаточно поздно, при снижении СКФ приблизительно на 40–50%.

При пиелонефритах канальцевая реабсорбция снижается раньше уменьшения СКФ. Это обусловлено тем, что при хронических пиелонефритах первоначально поражается преимущественно дистальный отдел канальцев нефрона, а только затем гломерулярный клубочек. Именно поэтому СКФ уменьшается позднее, чем канальцевая реабсорбция.

### 12.2.4. МОЧЕВАЯ КИСЛОТА

Мочевая кислота служит продуктом обмена пуриновых нуклеозидов, входящих в состав нуклеиновых кислот (РНК и ДНК). При этом мочевая кислота может образовываться из продуктов, поступающих с пищей, и в результате распада собственных нуклеиновых кислот организма. Среди продуктов питания в наибольшем количестве пуриновые нуклеозиды содержатся в мясе и печени. Пурины пищи под влиянием пищеварительных ферментов распадаются до мочевой кислоты уже в желудочно-кишечном тракте, после чего всасываются в кровотоки.

Образовавшаяся мочевая кислота выделяется почками. Во внеклеточной жидкости, в том числе и плазме крови, мочевая кислота присутствует в виде соли натрия (ураты) в концентрации, близкой к насыщению, поэтому существует возможность кристаллизации урата натрия, если концентрация мочевой кислоты в крови превысит максимум нормальных значений. Референтные величины содержания мочевой кислоты в сыворотке представлены в табл. 12.6.

**Таблица 12.6.** Референтные величины содержания мочевой кислоты в сыворотке крови

Возраст	Содержание мочевой кислоты в сыворотке	
	ммоль/л	мг/дл
До 60 лет:		
мужчины	0,26–0,45	4,4–7,6
женщины	0,14–0,39	2,3–6,6
Старше 60 лет:		
мужчины	0,25–0,47	4,2–8,0
женщины	0,21–0,43	3,5–4,2

Мочевая кислота, выводимая с мочой, отражает поступление пуринов с пищей и распад эндогенных пуриновых нуклеозидов. Около 70% общего количества мочевой кислоты организма выводится с мочой. Процессы, происходящие с мочевой кислотой в почках, сложны. Она фильтруется в клубочках, затем почти полностью реабсорбируется в проксимальном канальце, а в дальнейшем снова секретируется и реабсорбируется в дистальном канальце. В конечном итоге с мочой выводится около 10% мочевой кислоты от профильтрованного количества. Референтные величины содержания мочевой кислоты в моче представлены в табл. 12.7.

Таблица 12.7. Референтные величины содержания мочевой кислоты в моче

Вид диеты	Содержание мочевой кислоты	
	мг/сут	ммоль/сут
Обычная диета	250–750	1,48–4,43
Беспуриновая диета:	<420	<2,48
	мужчины <400	женщины <2,36
Диета с низким содержанием пуринов:	<480	<2,83
	мужчины <400	женщины <2,36
Диета с высоким содержанием пуринов	<1000	<5,90

Нарушение пуринового обмена сопровождается либо повышением (гиперурикемия), либо снижением (гипоурикемия) уровня мочевой кислоты в крови.

**Повышение уровня мочевой кислоты в крови** имеет большое значение для диагностики подагры. В плазме крови мочевая кислота находится в виде соли — натрия урата. Эта соль обладает низкой растворимостью, и при концентрациях чуть выше нормы происходит образование кристаллов натрия урата. При подагре соли мочевой кислоты начинают откладываться в хрящах, синовиальной оболочке и жидкости суставов, вызывая повреждение кристаллами суставной поверхности. Клинически это проявляется сильной болью в суставах и их воспалением (острый артрит). Другими симптомами подагры служат камни в почках с приступами почечной колики и образование тофусов (скопление солей мочевой кислоты в мягких тканях).

Различают первичную подагру, когда накопление мочевой кислоты в крови и тканях не вызвано каким-либо другим заболеванием, и вторичную, которая может быть следствием нарушения работы почек, повышенного образования пуринов при гематологических заболеваниях, когда распадается много ядерных клеток (в ядре много РНК и ДНК), после облучения рентгеновскими лучами, при злокачественных новообразованиях, сердечной декомпенсации, разрушении тканей при голодании и др. Таким образом, первичная и вторичная подагра возникает вследствие нарушения экскреции мочевой кислоты или ее избыточной продукции.

**Первичная подагра** — следствие гиперурикемии, развивающейся при замедленном выведении (90% случаев) либо избыточном синтезе (10% случаев) мочевой кислоты. Кристаллы мочевой кислоты (ураты) могут откладываться в суставах, подкожной клетчатке (тофусы) и почках.

Определение содержания в крови мочевой кислоты имеет особенно большое значение в диагностике бессимптомной гиперурикемии (мочевая кислота в крови у мужчин выше 0,48 ммоль/л, у женщин — выше 0,38 ммоль/л) и скрытого развития подагрической почки (у 5% мужчин). У 5–10% больных с бессимптомной гиперурикемией возникает острый подагрический артрит. Гиперурикемия у больных подагрой непостоянна, может носить волнообразный характер. Периодически содержание мочевой кислоты может снижаться до нормальных значений, но часто наблюдают повышение в 3–4 раза по сравнению с нормой.

Критерии постановки диагноза подагры:

- уровень мочевой кислоты в сыворотке крови у мужчин выше 0,48 ммоль/л, у женщин выше 0,38 ммоль/л;
- наличие подагрических узелков (тофусов);
- обнаружение кристаллов уратов в синовиальной жидкости или тканях;
- наличие в анамнезе острого артрита, сопровождающегося сильной болью, начавшегося внезапно и стихнувшего в течение 1–2 сут.

Диагноз подагры считают достоверным, если обнаруживают по крайней мере два любых признака.

**Вторичная подагра** возможна при лейкозах,  $B_{12}$ -дефицитной анемии, полицитемии, некоторых острых инфекциях (пневмония, рожистое воспаление, скарлатина, туберкулез), заболеваниях печени и желчных путей, СД с ацидозом, хронической экземе, псориазе, крапивнице, заболеваниях почек, ацидозе, острой алкогольной интоксикации (вторичная «подагра алкоголика»).

**Особенности лабораторного обследования больных подагрой**

- Для получения точных данных о содержании мочевой кислоты в крови, наиболее адекватно отражающих уровень эндогенного образования мочевой кислоты, необходимо в течение 3 дней перед исследованием назначать больным малопуриновую диету.
- Во время острого приступа подагры у 39–42% больных уровень мочевой кислоты в сыворотке крови снижается до нормальных значений. Именно поэтому при нормальных значениях мочевой кислоты таким больным необходимо повторить взятие крови на анализы через 3–5 сут после купирования приступа для получения объективных величин концентрации этой кислоты.

Определение мочевой кислоты в моче и крови необходимо проводить совместно. Это позволяет во многих случаях установить патологический механизм, лежащий в основе подагры у больного (избыточная продукция мочевой кислоты в организме или нарушение ее выве-

дения). Признаком гиперпродукции мочевой кислоты в организме считают ее выведение с мочой более 800 мг/сут в случае проведения исследования без ограничения в диете или 600 мг/сут после предварительного применения малопуриновой диеты. При нарушении выделительной функции почек высокий уровень мочевой кислоты в крови не сопровождается увеличением концентрации мочевой кислоты в моче. Определение механизма развития подагры помогает выбрать правильную схему лечения больного.

Снижение уровня мочевой кислоты в крови встречаются редко, в основном при врожденных нарушениях метаболизма (генетические дефекты синтеза ферментов, участвующих в образовании мочевой кислоты) и дефектах реабсорбции мочевой кислоты в почечных канальцах.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ

1. Для решения каких задач используют биохимические анализы?
2. Какие соединения относят к белкам?
3. Перечислите основные белки плазмы крови.
4. Какие функции выполняют белки плазмы крови?
5. Что такое гипопротейнемия, каковы ее причины?
6. Какие функции выполняет альбумин?
7. Какие значения концентрации альбумина в сыворотке крови указывают на гипоальбуминемию?
8. Что собой представляют белковые фракции сыворотки и как их получить?
9. Что такое парапротеинемия?
10. Какие белки крови называют специфическими?
11. Какие значения концентрации СРБ указывают на его повышенную концентрацию?
12. Перечислите основные патологические процессы, приводящие к повышению уровня СРБ.
13. Какие биохимические показатели наиболее адекватно отражают состояние всего азотистого обмена в организме человека?
14. В результате каких процессов образуется мочевина в организме человека?
15. Назовите нормальную концентрацию креатина в крови здорового человека.
16. Каковы основные причины повышения концентрации креатина в крови?
17. Что такое клиренс эндогенного креатинина?
18. Каковы условия проведения пробы Реберга–Тареева?

19. Продуктом обмена каких соединений является мочева кислота?
20. Назовите заболевание, основным признаком которого служит повышение уровня мочева кислоты в крови.

## 12.3. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ОБМЕНА БЕЛКОВ

Химическое строение и пространственная конфигурация макромолекул определяют большинство специфических свойств белков. Белки имеют большое сродство к воде, то есть обладают гидрофильными свойствами, образуя с водой коллоидные растворы, отличающиеся неустойчивостью. Под влиянием различных воздействий белки легко выпадают в осадок. На этом свойстве белковых растворов основаны осадочные пробы. Белки обладают амфотерными свойствами, так как содержат кислые гидроксильные группы и основные аминокетты, поэтому заряд белков зависит от рН раствора, что используют для электрофоретического разделения белков.

### 12.3.1. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЩЕГО БЕЛКА

Концентрацию общего белка можно определять различными методами. Среди методов определения концентрации общего белка в биологических материалах можно выделить несколько основных групп, основанных на различных принципах:

- азотометрические;
- гравиметрические;
- рефрактометрические;
- спектрофотометрические;
- колориметрические;
- нефело- и турбидиметрические.

Азотометрические методы определения общего белка основаны на определении количества белкового азота, образующегося при разрушении аминокетт. Азот, содержащийся в составе белков, окисляют до иона аммония и его количество определяют титрованием раствором соляной кислоты. Исходя из того что белки биологических жидкостей содержат в среднем 16% азота, полученное в результате анализа его количество умножают на коэффициент 6,25.

Гравиметрический (весовой) метод определения общего белка основан на высушивании белков до постоянной массы и их последующем

взвешивании. Этот метод в современной практике лабораторий уже не используют.

В основе рефрактометрического метода лежит способность растворов белка к преломлению светового потока. При температуре  $17,5^{\circ}\text{C}$  показатель преломления воды равен 1,33. При той же температуре показатель преломления сыворотки крови колеблется в пределах 1,34–1,35. В связи с тем что концентрация электролитов и небелковых органических соединений, влияющих на ее преломляющую способность, невелика и достаточно постоянна в сыворотке крови здорового человека, то величина показателя преломления сыворотки зависит в первую очередь от содержания в ней белков.

Спектрофотометрические методы определения общего белка основаны на измерении светопоглощения в УФ-области. Растворы белка обладают поглощением при длинах волн 200–225 и 270–290 нм. Поглощение при 270–290 нм определяется присутствием в молекуле белка ароматических аминокислот — тирозина, триптофана и фенилаланина. Поглощение при 200–225 нм практически в 20 раз выше, чем при 280 нм, и обусловлено главным образом пептидными связями. Точность и специфичность методов определения белка, основанных на поглощении при 270–290 нм, невелики, так как содержание тирозина и триптофана может колебаться в различных белках сыворотки крови. Кроме того, присутствие в сыворотке свободных аминокислот — тирозина и триптофана, а также мочевой кислоты и билирубина, поглощающих при 280 нм, вносит определенную погрешность.

Колориметрические методы определения общего белка основаны на цветных реакциях белков с хромоген-образующими реактивами или на неспецифическом связывании красителя. Среди этих методов определения концентрации общего белка сыворотки наиболее распространен биуретовый метод, основанный на цветной биуретовой реакции, в ходе которой белки реагируют в щелочной среде с сульфатом меди с образованием соединений, окрашенных в фиолетовый цвет. Интенсивность окраски при этом зависит от концентрации общего белка в сыворотке. Скорость развития окраски в данном методе зависит от времени и температуры реакции.

Нефело- и турбидиметрические методы определения общего белка основаны на снижении растворимости белков и образовании суспензии взвешенных частиц под воздействием различных агентов. О содержании белка в исследуемой пробе судят либо по интенсивности светорассеяния (нефелометрический метод), определяемого числом светорассеивающих частиц, либо по ослаблению светового потока образовавшейся суспензией (турбидиметрический метод).

### 12.3.2. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЛЬБУМИНА

Существует несколько групп отличающихся друг от друга методов определения концентрации альбумина в сыворотке крови. Основными служат методы:

- фракционного осаждения;
- электрофоретические;
- фотометрические.

Методы фракционного осаждения основаны на разной способности альбумина и глобулинов осаждаться в растворах с различной ионной силой. Определение проводят в два этапа:

- I — глобулины осаждают сульфатом аммония, после чего осадок отделяют центрифугированием;
- II — в надосадочной жидкости концентрацию альбумина определяют с помощью биуретовой реакции.

В настоящее время данную группу методов практически не используют вследствие их сложности и трудности автоматизации.

Электрофоретические методы позволяют разделить белки сыворотки крови на носителе (пленка из ацетата целлюлозы, гель, агар), подвергнуть их фиксации и окраске, а затем рассчитать процентное соотношение между различными фракциями с помощью денситометрии. Концентрацию альбумина определяют исходя из уровня общего белка в исследуемом образце сыворотки.

Фотометрические методы основаны на образовании комплекса альбумин—краситель. Это позволяет проводить фотометрию в присутствии избытка красителя, необходимого для насыщения всех связывающих сайтов альбумина, что дает возможность всем его молекулам принимать участие в реакции. В качестве красителей, применяемых для определения альбумина, могут быть использованы:

- бромкрезоловый зеленый;
- бромкрезоловый фиолетовый;
- бромфеноловый синий.

Наиболее широкое распространение получили методы, основанные на связывании с бромкрезоловым зеленым; другие красители в настоящее время для определения альбумина в крови практически не используются. Интенсивность образования окрашенного соединения альбумина с бромкрезоловым зеленым зависит от вида буфера. При применении ацетатного и лактатного буфера достигают наибольшей чувствительности метода. Реакцию обычно проводят при pH 4,2–4,5, фотометрию осуществляют при 620–630 нм. При взаимодействии альбумина с бромкрезоловым зеленым в слабокислой среде образуется



окрашенный комплекс синего цвета. При фотометрировании величина световой абсорбции пропорциональна интенсивности окраски исследуемого раствора и концентрации альбумина в пробе.

### 12.3.3. ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Существует множество методов разделения белков сыворотки крови на фракции: высаливание нейтральными солями, электрофоретическое фракционирование, иммунологические методы, седиментационный способ, хроматографическое разделение и др. В практике лабораторий наиболее широкое распространение получили электрофоретические методы фракционирования белков сыворотки крови.

Принцип электрофоретического разделения молекул состоит в их движении с различной скоростью в постоянном электрическом поле. При электрофоретическом разделении через исследуемую сыворотку, помещенную в камеру с буферным раствором, пропускают электрический ток определенной силы и напряжения. В зависимости от электрического заряда и других физических и химических свойств белки сыворотки крови передвигаются к одному из полюсов электрической цепи (в нейтральной среде к аноду). В процессе продвижения близкие по своему заряду и другим свойствам белки сыворотки объединяются во фракции. Электрофоретическая подвижность белка зависит от характеристик его (электрического заряда, размеров и формы) и буферной среды, в которой происходит разделение (типа и ионной силы электролита, рН, вязкости и добавок). Количество выделенных белковых фракций зависит от применяемой поддерживающей основы. В качестве поддерживающей основы при электрофорезе применяют бумагу, пленки ацетата целлюлозы, гели крахмала, полиакриламида, агара.

**Электрофорез на бумаге.** Коллоидные частицы белка сыворотки крови, нанесенной на бумагу, перемещаются в электрическом поле постоянного тока: в щелочной среде к аноду, в кислой — к катоду. В щелочной среде в электрическом поле наиболее быстро перемещаются альбумины, затем  $\alpha$ -1-,  $\alpha$ -2-,  $\beta$ - и  $\gamma$ -глобулины (рис. 12.4). Для исследования используют различные виды буферов — минал-вероналовый (рН 8,6), боратный, трис-буфер (рН 8,9). После разделения белков на фракции фореграмму сушат и окрашивают. Для окраски электрофореграммы применяют следующие красители: пунцовый С, нигрозин, амидо черный, азокармин, бромфеноловый синий.

Количественную оценку результатов электрофоретического разделения белков сыворотки проводят либо фотометрическим измерением

оптической плотности растворов после элюирования (извлечения) красителя из отдельных фракций белков, либо с помощью денситометра — прибора, позволяющего регистрировать (сканировать) картину разделения фракций анализируемых веществ в отраженном или проходящем монохроматическом световом потоке (см. рис. 12.4).

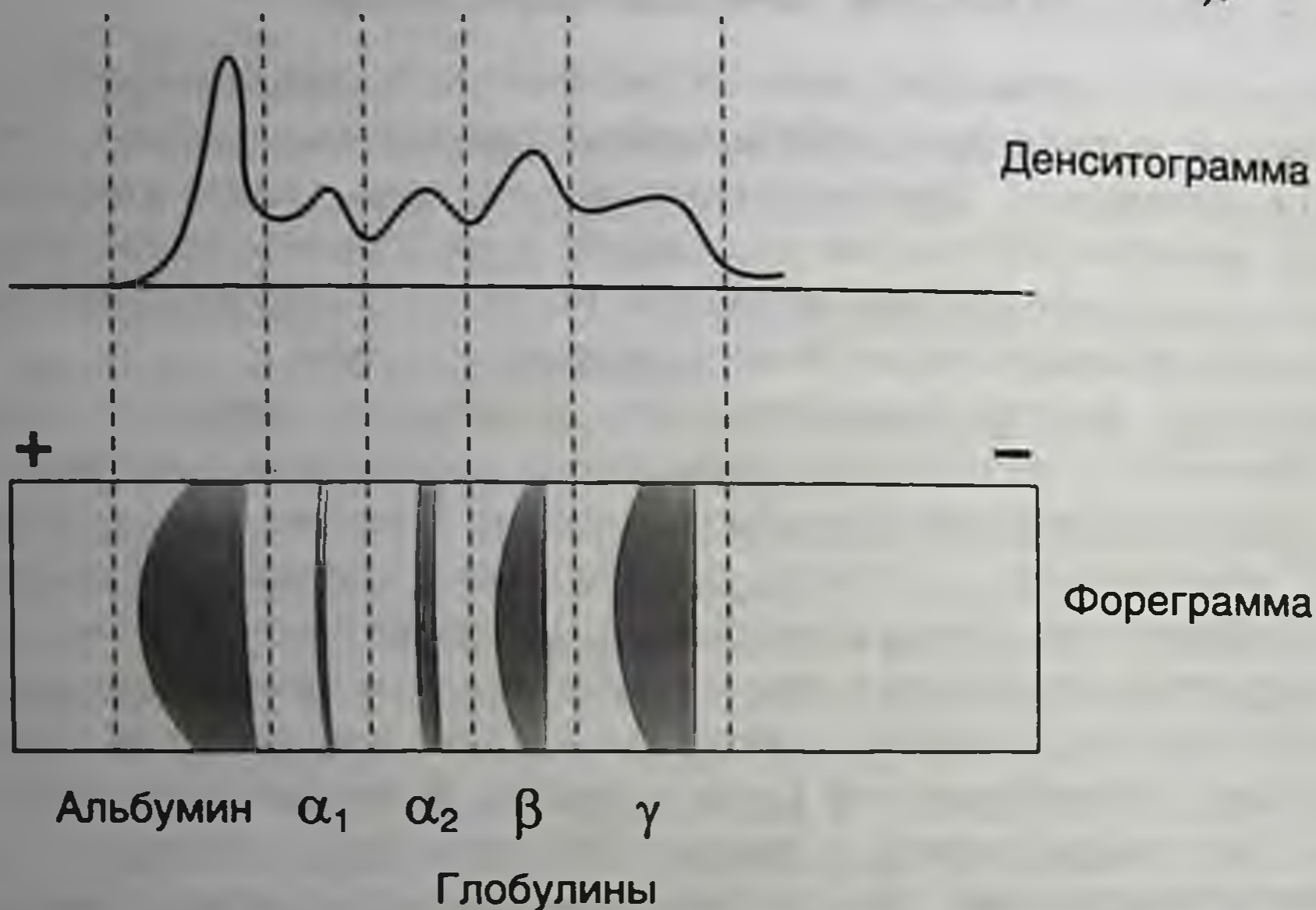


Рис. 12.4. Фореграмма и денситограмма белков сыворотки крови

Метод элюирования состоит в том, что сначала электрофореграммы разрезают по числу фракций, ориентируясь на самый светлый участок между ними. Каждую фракцию помещают в отдельную пробирку и заливают элюирующим раствором. К альбуминовой фракции добавляют двойной его объем, на основании чего величину оптической плотности для альбуминовой фракции умножают на 2. Контролем служит участок фореграммы, не содержащий белка. Пробирки осторожно встряхивают и оставляют в затемненном месте на 30 мин (40–60 мин).

Плотность (световую абсорбцию) испытываемых растворов определяют на фотометре любого типа с зеленым (красным) светофильтром. В качестве контрольного используют элюирующий раствор.

Состав элюирующих растворов, применяемых для извлечения красителя из окрашенных фракций электрофореграмм, зависит от природы используемого индикатора (красителя), для бромфенолового синего — 0,01 N раствор натрия гидроксида. При элюировании находят величину абсорбции каждой фракции и общую сумму значений

оптической абсорбции, которую принимают за 100%, или величину содержания общего белка в сыворотке крови, представленную в размерности (г/л). В первом случае результаты выражают в относительных единицах, во втором — в абсолютных. Последний способ оценки электрофореграмм более информативен.

Приняв сумму показателей оптической абсорбции отдельных элюатов за 100%, рассчитывают относительное содержание альбумина и фракций глобулинов.

При денситометрии в проходящем свете предварительно проводят просветление электрофореграмм с помощью парафина жидкого (Вазелинового масла<sup>\*</sup>). Полосу пропитывают парафином жидким (Вазелиновым маслом<sup>\*</sup>) и располагают ее в перемещающем устройстве денситометра таким образом, чтобы против щели освещения находился неокрашенный участок. Записанная прибором кривая позволяет судить о числе фракций и содержании в них белка. С помощью интегрального устройства в автоматическом режиме осуществляют количественную обработку картины разделения фракции белков. Количественную обработку денситограмм можно выполнить и ручным способом. Для этого кривую делят на ряд участков, соответствующих отдельным фракциям. Величина площади каждого участка пропорциональна количеству красителя, соединившегося с белком данной фракции. Соотношение между этими площадями вычисляют по массе вырезанных участков бумаги, определенной на торсионных весах. Общую массу принимают за 100% (или содержание общего белка в плазме в граммах на литр) и вычисляют, какой процент по отношению к нему составляет масса каждого участка (фракции).

При электрофорезе на бумаге вследствие ее химической неоднородности получается недостаточно четкое разделение белковых фракций.

**Электрофорез на пленках из ацетата целлюлозы** по сравнению с электрофорезом на бумаге обладает рядом преимуществ: химическая однородность ацетата и одинаковый размер пор позволяют увеличить четкость разделения; время для проведения всех процедур (разделение, окраска, отмывание) существенно сокращается. Для исследования применяют веронал-медиаловый буфер, рН 8,6, медиал-цитратный буфер, рН 8,6, веронал-цитратный буфер, рН 8,6, трис-буфер. Для просветления материала ацетатных полос используют смесь пропилового спирта с ледяной уксусной кислотой и глицерином.

Количественную оценку проводят фотометрическими методами или с помощью денситометра.

**Капиллярный электрофорез** — физический метод анализа, основанный на подвижности внутри капилляра заряженных частиц в рас-

творе электролита под влиянием приложенного электрического поля. Скорость миграции частиц определяется их электрофоретической подвижностью и электроосмотической подвижностью буферного раствора. Капиллярный электрофорез может быть использован и для разделения белковых молекул сыворотки крови по заряду и размеру. Разделение осуществляют в тонком капилляре, заполненном электролитом (рис. 12.5).



Рис. 12.5. Проведение капиллярного электрофореза белков сыворотки крови

При подаче на электроды высокого напряжения в капилляре быстро устанавливается стационарное состояние: через капилляр протекает постоянный электроосмотический поток, на который накладывается взаимно противоположная электромиграция катионов и анионов. Белковые компоненты пробы начинают двигаться по капилляру с разной скоростью, зависящей в первую очередь от заряда и массы (точнее — величины ионного радиуса), и соответственно в разное время достигают зоны детектирования.

Катионные белки пробы, двигаясь к катоду, будут обгонять электроосмотический поток. Скорость их движения складывается из скорости электроосмотического потока и скорости электромиграции, поэтому на выходе капилляра катионы появляются первыми и тем раньше, чем больше их электрофоретическая подвижность.

Нейтральные белки пробы способны перемещаться только под действием электроосмотического потока, тогда как анионные будут перемещаться к аноду со скоростями меньшими, чем скорость электроосмотического потока. Медленно мигрирующие анионы появятся на выходе после электроосмотического потока.

Если времени нахождения пробы в капилляре (которое можно регулировать изменением напряжения, величины рН и концентрации ведущего электролита) достаточно, чтобы проявились различия в подвижности ионов, то на выходе капилляра вблизи катода можно наблюдать зоны раствора, в которых находятся индивидуальные белки пробы. Движение этих зон (фракций) в капилляре происходит через детектор, который регистрирует результат разделения и представляет его в виде последовательности пиков. Детекция фракций белков осуществляется путем измерения их оптической абсорбции при длине волны 200 нм, так как растворы белка обладают феноменом оптической абсорбции (поглощения) при длинах волн 200–225 нм. Полученную последовательность пиков называют электрофореграммой, при этом качественной характеристикой фракции белков служит параметр удерживания (время миграции), а количественной — высота или площадь пика, пропорциональная концентрации белков данной фракции. Метод капиллярного электрофореза не требует окраски пленок, он менее трудоемкий, позволяющий проводить разделение белков в течение 15–30 мин. Эффективность разделения белков методом капиллярного электрофореза значительно выше других электрофоретических методов.

Оборудование для электрофореза на бумаге, пленке из ацетата целлюлозы, геле включает электрофоретическую камеру с источником тока, блок окрашивания, осветления и сушки фореграмм, программируемый сканер (денситометр) для количественного анализа и печатающее устройство для документирования результатов. По степени автоматизации всего процесса системы электрофореза разделяют на полуавтоматические и автоматические. В полуавтоматических системах электрофореза нанесение проб сыворотки крови на носитель, окрашивание, осветление и сушку пленок или гелей, а также помещение фореграмм в денситометр осуществляет специалист лаборатории. При использовании автоматических систем, которые обычно состоят из двух блоков (блока проведения электрофореза и блока окрашивания, осветления и сушки гелей), все аналитические процедуры, включая нанесение проб сыворотки, выполняются в автоматическом режиме.

#### **12.3.4. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ БЕЛКОВ**

Для определения специфических белков в сыворотке крови используют в основном методы нефелометрии и иммунотурбидиметрии, причем последний метод — самый распространенный.

Турбидиметрия представляет собой аналитический метод, в котором используется рассеяние света. В методе иммунотурбидиметрии

используют классическую реакцию антиген–антитело. Белок (антиген) формирует иммунные комплексы с соответствующими специфическими моноклональными (к данному конкретному белку) антителами. Образуется мутная суспензия (комплексы антиген–антитело), оптическую абсорбцию которой измеряют фотометрически. Величина оптической абсорбции зависит от содержания белка в пробе.

### 12.3.5. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОЧЕВИНЫ

Для определения концентрации мочевины в биологических жидкостях используют в основном фотометрические методы, которые можно разделить на две группы — химические и ферментативные.

Среди химических фотометрических наиболее распространен метод, основанный на реакции мочевины с диацетилмонооксидом. Мочевина способна образовывать с диацетилмонооксидом в присутствии тиосемикарбозида и ионов  $Fe^{3+}$  в сильноокислой среде комплекс красного цвета, интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию мочевины в исследуемой жидкости. Интенсивность окрашивания оценивают фотометрически при длине волны 525 нм.

Все современные ферментативные методы определения мочевины основаны на использовании в качестве реактива фермента уреазы, который гидролизует мочевину. При гидролизе мочевины образуется ион аммония, концентрацию которого определяют с использованием сочетанных ферментативных реакций (колориметрический ферментативный уреазный метод):

- [мочевина +  $H_2O$ ] (уреаза  $\rightarrow$ ) [ $NH_3$  +  $CO_2$ ];
- [ $NH_3$  + салицилат натрия + гипохлорит натрия] (натрия нитропруссид  $\rightarrow$ ) продукт зеленого цвета.

Интенсивность окраски продукта реакции пропорциональна концентрации мочевины.

Одним из наиболее распространенных в настоящее время ферментативных методов определения мочевины в сыворотке крови и моче служит метод, основанный на использовании в качестве индикаторного фермента глутаматдегидрогеназы. Уменьшение абсорбции (поглощения) регистрируют при длине волны 340 нм:

- [мочевина +  $H_2O$ ] (уреаза  $\rightarrow$ ) [ $NH_3$  +  $CO_2$ ];
- [ $NH_3$  +  $\alpha$ -кетоглутарат + НАДН<sub>2</sub>] (глутаматдегидрогеназа  $\rightarrow$ ) [глутамат + НАД<sup>+</sup> +  $H_2O$ ] — не прямой тест Варбурга.

Скорость окисления НАДН пропорциональна концентрации мочевины.

### 12.3.6. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КРЕАТИНИНА

Практически все методы, которые используют в КДЛ для определения концентрации креатинина, основаны на реакции, предложенной М. Яффе в 1886 г. Сущность ее в том, что ароматические нитровещества (например, пикриновая кислота) способны взаимодействовать с веществами, содержащими активную метиленовую ( $=\text{CH}_2$ ) или метиновую ( $=\text{CH}-$ ) группу. Креатинин — одно из таких веществ. В щелочной среде пикриновая кислота взаимодействует с креатинином с образованием оранжево-красной окраски (реакция Яффе — образование таутомера пикрата креатинина), которую измеряют фотометрически в интервале длины волн 485–520 нм.

Однако в сыворотке крови, помимо креатинина, присутствует множество различных веществ (хромогены, пировиноградная и аскорбиновая кислоты, ацетон, глюкоза и др.), которые реагируют с пикриновой кислотой подобно креатинину, что может исказить результаты анализа. Присутствие в исследуемом материале (сыворотка, моча) белков также оказывает влияние на результаты фотометрического измерения. Именно поэтому определение креатинина в сыворотке крови проводят после депротенинизирования (осаждения белка), а в моче — после разведения водой.

Скорость образования креатинин-пикратного комплекса постоянна при температуре ниже 30 °С. При повышении температуры глюкоза и кислоты (мочевая и аскорбиновая) приобретают способность превращать пикриновую кислоту в пикраминую, обладающую максимумом поглощения при длине волны 482 нм, что приводит к ложному завышению результатов исследований сыворотки крови. Величина рН является другим важным фактором, определяющим скорость образования креатинин-пикратного комплекса. Ее значение должно быть постоянным и находиться в интервале 12–12,4. Кроме этого, особое значение имеет выбор депротенинирующего вещества и его концентрации. Считают, что наиболее целесообразно осаждают белки теми денатурирующими агентами, при использовании которых рН фильтрата или центрифугата ниже 2,5. Метод с осаждением белков при помощи пикриновой кислоты (метод Поппера) считают наиболее точным, так как при этом удаляется часть креатиноподобных хромогенов.

В ряде биохимических анализаторов используют основанный на цветной реакции Яффе кинетический метод определения концентрации креатинина без депротенинирования. Поскольку скорость образования окрашенного креатинин-пикратного комплекса линейно зависит от концентрации креатинина, изменение оптической абсорбции

пробы за фиксированное время при длине волны 490–510 нм прямо пропорционально концентрации креатинина в ней.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ

1. Назовите основные методы определения общего белка.
2. На чем основаны фотометрические методы определения альбумина?
3. Перечислите методы проведения электрофореза белков сыворотки крови.
4. Что такое денситограмма?
5. Какие методы используют для определения специфических белков?
6. На чем основано определение концентрации мочевины уреазными методами?
7. В чем сущность реакции Яффе?

## 12.4. ГЛЮКОЗА И МЕТАБОЛИТЫ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА

Определение концентрации глюкозы в крови в клинической практике имеет особое значение для диагностики и мониторинга лечения СД.

СД по частоте встречаемости среди населения занимает 3-е место в мире после сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний. Распространенность болезни в нашей стране составляет 3–4% всего населения. Число зарегистрированных больных — примерно 1/2 фактического количества. По данным ВОЗ, прогнозируется двукратное увеличение числа больных СД каждые 15 лет. Мужчины и женщины болеют примерно одинаково часто.

Большинство больных СД нуждаются в ежедневном определении уровня глюкозы в крови. Однако повышение концентрации глюкозы в крови не всегда означает, что пациент страдает СД.

### 12.4.1. МЕТАБОЛИЗМ ГЛЮКОЗЫ

Глюкоза служит одним из важнейших компонентов крови; количество ее отражает состояние углеводного обмена.

Углеводы — органические соединения, состоящие из углерода, водорода и кислорода. Общепринято делить углеводы на четыре группы:

- моносахариды — простые сахара (глюкоза, фруктоза, моноза, галактоза, ксилоза);



- дисахариды, дающие при расщеплении 2 молекулы моносахарида (мальтоза, сахароза, лактоза);
- олигосахариды, дающие при расщеплении от 3 до 6 молекул моносахаридов;
- полисахариды, дающие при расщеплении более 6 молекул моносахаридов.

Углеводы — важнейший источник энергии в организме человека, поступающий в составе пищи. Основным источником углеводов в пище служат растительные продукты (хлеб, картофель, каши). Поступившие с пищей углеводы [главным образом полисахариды (крахмал, гликоген) и дисахариды (сахароза, лактоза)] расщепляются ферментами желудочно-кишечного тракта до моносахаридов, в такой форме всасываются через стенки тонкой кишки и с кровью воротной вены поступают в печень и ткани организма. Физиологически наиболее важным углеводом в организме человека считают глюкозу. Основные обменные превращения, которые проходит глюкоза:

- превращение в гликоген;
- окисление с образованием энергии;
- превращение в другие углеводы;
- превращение в компоненты белков и жиров.

Глюкозе отводится особая роль в системе энергетического обеспечения организма. Она может функционировать только внутри клеток, где играет роль источника энергии. Поступившая в клетку глюкоза при наличии достаточного количества кислорода подвергается метаболическому окислению до углекислого газа и воды. В ходе этого процесса энергия, аккумулируемая в молекуле глюкозы, используется для образования макроэргического соединения — АТФ. В дальнейшем энергия, заключенная в молекуле АТФ, используется для осуществления многих биохимических реакций внутри клетки.

При недостатке кислорода в клетке глюкоза может окисляться в процессе гликолиза с образованием молочной кислоты (лактата). Накопление последней в крови (лактат-ацидоз) — причина метаболического ацидоза, который сопровождает многие патологические процессы с недостаточным поступлением кислорода (дыхательная недостаточность) или кровоснабжением тканей.

Большинство тканей (мозг, эритроциты, хрусталик глаза, паренхима почки, работающая мышца) полностью зависят от прямого поступления глюкозы в клетки и требуют непрерывной подачи глюкозы каждую секунду, так как в них происходит очень быстрая утилизация АТФ. У взрослого человека потребность в глюкозе составляет минимум 190 г/сут (около 150 г для мозга и 40 г для других тканей). Однако,

в отличие от других тканей, головной мозг не способен синтезировать и депонировать глюкозу и потому всецело зависит от поступления ее из крови для обеспечения энергетических потребностей. Для нормального функционирования мозга необходимо поддерживать уровень глюкозы в крови на уровне минимально — около 3 ммоль/л.

Глюкоза в качестве источника энергии нужна всем клеткам организма человека. Однако потребности клеток в глюкозе могут существенно отличаться. Например, потребности мышечных клеток (миоцитов) минимальны во время сна и велики при выполнении физической работы. Необходимость в глюкозе не всегда совпадает по времени с приемом пищи. Именно поэтому в организме человека существуют механизмы, позволяющие запасать поступающую с пищей глюкозу впрок и в дальнейшем использовать по мере необходимости. Большинство клеток организма человека способно запасать глюкозу в ограниченных количествах, но три типа клеток служат основными депо глюкозы. К таким клеткам относят:

- печеночные;
- мышечные;
- клетки жировой ткани (адипоциты).

Эти клетки способны захватывать глюкозу из крови и запасать ее впрок, когда потребность в ней мала, а содержание высоко (после еды). В ситуации, когда потребность в глюкозе возрастает, а содержание в крови падает (в перерывах между приемами пищи), они способны высвободить ее из депо и использовать на возникшие потребности.

Клетки печени и миоциты запасают глюкозу в виде гликогена, который представляет собой высокомолекулярный полимер глюкозы. Процесс синтеза гликогена называют гликогенезом. Обратный процесс превращения гликогена в глюкозу — гликогенолиз. Он стимулируется в ответ на снижение уровня глюкозы в крови. Клетки жировой ткани (адипоциты) также способны запасать глюкозу. В процессе липогенеза они превращают ее в глицерин, который затем включается в состав триглицеридов (форма депонирования жира). Для обеспечения клеток энергией триглицериды могут мобилизовываться из жировых клеток, но только после того, как будут исчерпаны запасы гликогена. Именно поэтому в организме человека гликоген выполняет функцию кратковременного депонирования глюкозы, а жиры — долговременного.

После приема пищи, когда уровень глюкозы и жирных кислот в крови высоки, печень синтезирует гликоген и триглицериды, мышечные клетки — гликоген, а адипоциты — триглицериды. Емкость депо углеводов в организме лимитирована и составляет порядка 70 г в печени и 120 г в мышцах. Общий запас тканевых и жидких углеводов

у взрослого человека (около 300 кал) явно недостаточен для обеспечения энергетических потребностей организма между приемами пищи, поэтому основным депо и источником энергии в организме человека служат триглицериды жировой ткани.

### 12.4.1.1. ОСНОВНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПОДДЕРЖАНИЯ НОРМАЛЬНОГО УРОВНЯ ГЛЮКОЗЫ В КРОВИ

В течение дня организм человека подвержен значительным колебаниям в поступлении и расходовании глюкозы. Тем не менее ее уровень в крови обычно не поднимается выше 8,0 и не опускается ниже 3,5 ммоль/л. Это обусловлено функционированием целого ряда регуляторных систем, обеспечивающих поддержание нормального уровня глюкозы в крови.

В течение короткого периода времени после приема пищи уровень глюкозы в крови повышается, так как сахара, содержащиеся в продуктах питания, всасываются из кишечника в кровь. Немедленно часть глюкозы начинает захватываться клетками органов и тканей и используется для энергетических потребностей. Одновременно клетки печени и мышц запасают избыточное количество глюкозы в виде гликогена. Между приемами пищи, когда содержание глюкозы в крови снижается, она мобилизуется из депо (гликоген) для поддержания необходимого уровня в крови. Если возможности депо недостаточны, глюкоза может быть получена из других источников, например белков (этот процесс называют глюконеогенезом) или жиров.

Все эти процессы обеспечивают поддержание необходимого уровня глюкозы в крови. Вместе с тем как поступление глюкозы в клетку и ее расходование, так и все ее метаболические превращения (гликогенез, гликогенолиз) находятся под постоянным контролем.

Наиболее важными регуляторами уровня глюкозы в крови служат ЦНС и гормоны поджелудочной железы.

В настоящее время установлено, что центральные механизмы регуляции углеводного обмена находятся в гипоталамусе.

Концентрация глюкозы в крови играет центральную роль в пищевом поведении. Ее уровень весьма точно отражает энергетическую потребность организма, а величина разности ее содержания в артериальной и венозной крови тесно связана с ощущением голода или сытости. В латеральном ядре гипоталамуса имеются глюкорцепторы, которые тормозятся при увеличении уровня глюкозы крови и активируются при ее снижении, приводя к возникновению чувства голода. Гипоталамические глюкорцепторы получают информацию о содер-

жании глюкозы и в других тканях организма. Об этом сигнализируют периферические глюкорцепторы, находящиеся в печени, каротидном синусе, стенке желудочно-кишечного тракта.

Если пища не поступает в организм, то в крови снижается содержание глюкозы, и центр голода побуждает человека к еде. В результате приема пищи в крови увеличивается содержание глюкозы. При достижении определенного уровня концентрации глюкоза стимулирует центр насыщения, что приводит к возникновению чувства сытости. Одновременно из центра насыщения идут сигналы, вызывающие торможение активности центра голода.

Таким образом, глюкорцепторы гипоталамуса интегрируют информацию, получаемую по нервным и гуморальным путям, участвуют в контроле потребления пищи.

Помимо потребления пищи, в регуляции уровня глюкозы в крови важнейшую роль играют гормоны поджелудочной железы — инсулин и глюкагон.

Эндокринная функция поджелудочной железы связана с панкреатическими островками (островками Лангерганса). У взрослого человека островки Лангерганса составляют 2–3% общего объема поджелудочной железы. В островке содержится от 80 до 200 клеток, которые по функциональным, структурным и гистохимическим показателям разделяют на три типа:  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\delta$ -клетки. Большую часть островка составляют  $\beta$ -клетки — 85%,  $\alpha$ -клетки — 11%,  $\delta$ -клетки — 3%. В  $\beta$ -клетках островков Лангерганса синтезируется и высвобождается инсулин, а в  $\alpha$ -клетках синтезируется и высвобождается глюкагон.

Основная роль эндокринной функции поджелудочной железы состоит в поддержании нормального уровня глюкозы в крови. Эту роль выполняют инсулин и глюкагон.

**Инсулин** — основной гормон инкреторного аппарата (то есть секретирующего гормоны непосредственно в кровоток) поджелудочной железы, представляет собой полипептид, мономерная форма которого состоит из двух цепей: А (из 21 аминокислоты) и В (из 30 аминокислот). Он секретируется  $\beta$ -клетками поджелудочной железы в ответ на повышение концентрации глюкозы в крови. Свой эффект инсулин реализует посредством связывания с инсулиновыми рецепторами на поверхности мембран инсулиночувствительных клеток. Инсулин обеспечивает снижение уровня глюкозы в крови при помощи следующих механизмов:

- способствует проведению глюкозы из крови в клетки органов и тканей — инсулинозависимых тканей (поступление глюкозы в клетки ЦНС и печени не зависит от инсулина — инсулин-независимые ткани);

- стимулирует внутриклеточный метаболизм глюкозы до молочной кислоты (гликолиз);
- активирует образование гликогена из глюкозы в печени и мышцах (гликогенез);
- в жировой ткани усиливает транспорт глюкозы, повышает скорость синтеза жирных кислот, угнетает липолиз и способствует увеличению запасов жира;
- ингибирует образование глюкозы из аминокислот (глюконеогенез).

Инсулин сравнительно быстро (за 5–10 мин) разрушается в печени (80%) и почках (20%) под действием фермента глутатион-инсулин-трансгидрогеназы.

Если бы регуляция уровня глюкозы в крови осуществлялась только инсулином, этот уровень постоянно колебался в пределах, значительно превышающих физиологические (не выше 8,0 и не ниже 3,5 ммоль/л). В результате инсулин-независимые ткани (головной мозг) испытывали бы то недостаток глюкозы, то избыток. Однако этого удается избежать в результате действия антагониста инсулина — глюкагона.

Глюкагон — полипептид, состоящий из 29 аминокислотных остатков. Он продуцируется  $\alpha$ -клетками островков Лангерганса и имеет, так же как инсулин, короткий период полураспада (несколько минут). В противоположность эффекту инсулина действие глюкагона заключается в повышении уровня глюкозы в крови. Он усиливает выход глюкозы из печени тремя путями: ингибирует синтез гликогена, стимулирует гликогенолиз (образование глюкозы из гликогена) и глюконеогенез (образование глюкозы из аминокислот). Эти механизмы служат гарантией того, что глюкоза будет доступна для глюкозозависимых тканей между приемами пищи. Печень — главный орган-мишень для глюкагона.

Динамика уровня инсулина и глюкагона в крови после приема пищи в зависимости от уровня глюкозы представлена на рис. 12.6.

Как видно из рис. 12.6, концентрация глюкозы в крови возрастает после еды в результате всасывания углеводов пищи. Повышенный уровень глюкозы стимулирует секрецию инсулина поджелудочной железой. Сигнал, который несет инсулин клеткам, — «глюкоза в избытке», она может использоваться в качестве источника энергии или депонироваться. Инсулин способствует утилизации глюкозы в качестве источника энергии, стимулируя ее транспорт в мышцы и жировую ткань. Он также осуществляет депонирование глюкозы: в виде гликогена в печени и мышцах, в виде триглицеридов в жировой ткани; способствует захвату аминокислот мышцами и синтезу белков в них. В резуль-

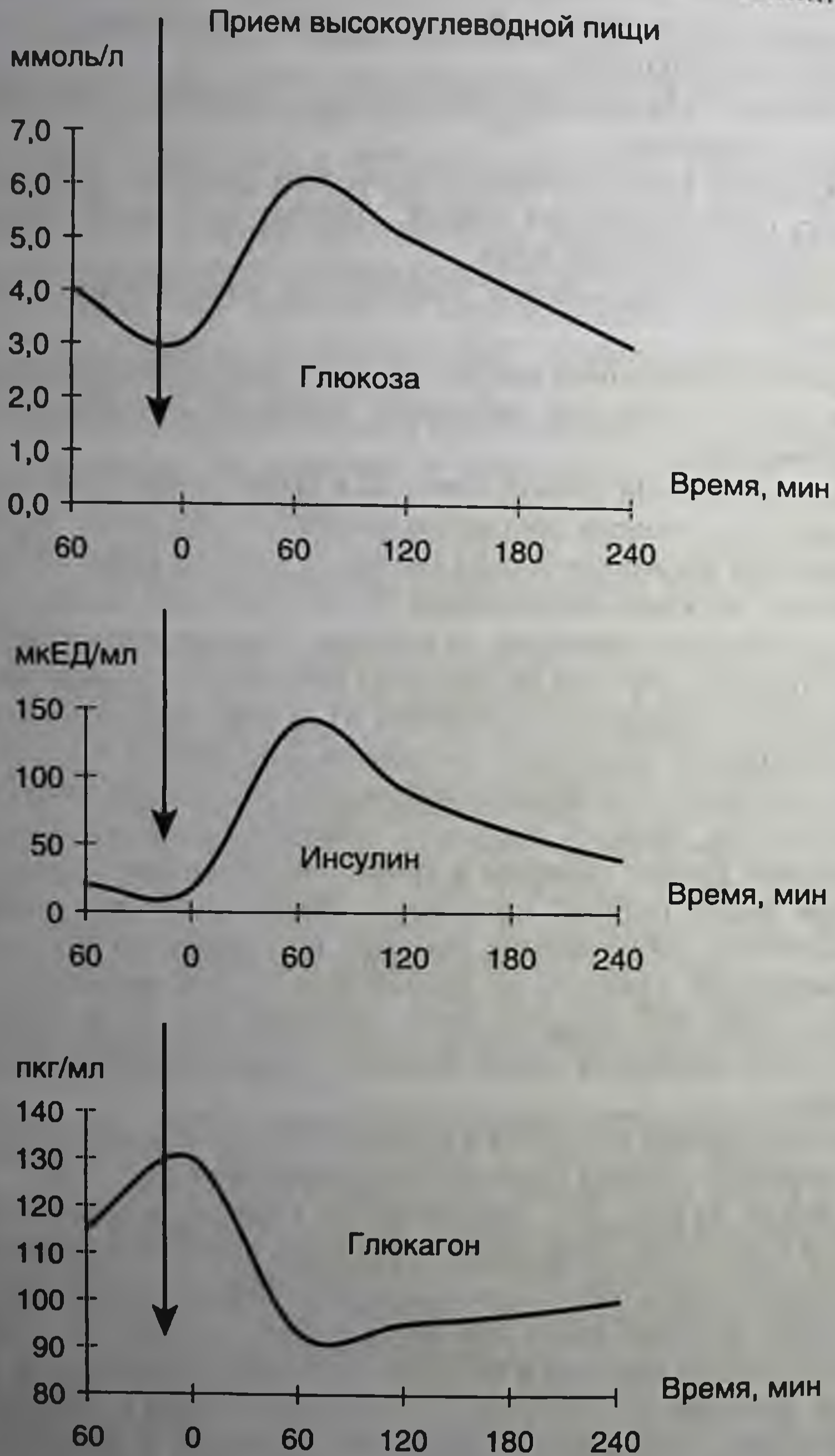


Рис. 12.6. Динамика глюкозы, инсулина и глюкагона в крови при приеме высокоуглеводной пищи в норме

тате действия инсулина уровень глюкозы в крови снижается. В свою очередь, гипогликемия приводит к индукции секреции глюкагона, который способствует повышению уровня глюкозы в крови. Глюкагон поддерживает доступность депонированной глюкозы в отсутствие глюкозы, поступающей с пищей, стимулируя выход ее из печени (из гликогена), стимулируя глюконеогенез из лактата, глицерина и аминокислот и в сочетании со сниженным уровнем инсулина стимулируя мобилизацию жирных кислот из триглицеридов. Сигнал, который несет глюкагон, — «глюкозы нет».

Уровни инсулина и глюкагона непрерывно колеблются в соответствии с режимом питания, что позволяет поддерживать оптимальную концентрацию глюкозы в крови. Однако не только они принимают участие в этих процессах.

Адреналин, норадреналин, кортизол и соматотропный гормон (СТГ) также способны повышать уровень глюкозы в крови, то есть обладают контринсулярной активностью.

Адреналин и норадреналин синтезируются мозговым веществом надпочечников и служат гормонами стресса. В печени, адипоцитах, скелетных мышцах они оказывают прямое влияние на мобилизацию глюкозы из депо (из гликогена), способствуя повышению уровня глюкозы в крови для использования в качестве источника энергии при стрессовых ситуациях (стресс → адреналин → гликоген → глюкоза). Одновременно они подавляют секрецию инсулина, то есть создают почву для того, чтобы глюкоза продолжала поступать к месту ее утилизации, пока действуют стрессовые импульсы.

Глюкокортикоиды (гормоны коры надпочечников, основным представителем является кортизол) угнетают захват глюкозы многими тканями. В мышцах глюкокортикоиды стимулируют окисление жирных кислот, в печени для получения энергии направляют глицерин и аминокислоты на синтез глюкозы (глюконеогенез), которая превращается в гликоген и депонируется, то есть готовятся легкодоступные запасы глюкозы. В случае возникновения стрессовой ситуации и поступления большого количества адреналина в кровь эти запасы легко используются.

СТГ (гормон роста) угнетает захват и окисление глюкозы в жировой ткани, мышцах и печени и тем самым способствует повышению уровня глюкозы в крови. Помимо этого, он способствует синтезу гликогена в печени из других источников (глюконеогенез).

Таким образом, 4 гормона (глюкагон, адреналин, кортизол, СТГ) способствуют повышению уровня глюкозы, не позволяя ему опускаться слишком низко, и только один инсулин предотвращает

избыточное увеличение концентрации глюкозы в крови. Это обстоятельство отражает важность постоянного поддержания минимального уровня глюкозы в крови для нормального функционирования головного мозга.

Вместе с тем это определяет и то, что нормальный гормональный ответ на повышение уровня глюкозы в крови зависит от двух факторов:

- секреции адекватного количества инсулина, то есть от нормального функционирования  $\beta$ -клеток поджелудочной железы;
- количества и функциональной активности (чувствительности) инсулиновых рецепторов на поверхности инсулиночувствительных клеток.

Если секреция инсулина будет неадекватна (недостаточна) или функциональная активность инсулиновых рецепторов снизится, концентрация глюкозы в крови будет повышена, что может перейти в заболевание — СД. В свою очередь, избыточная секреция инсулина (например, при опухоли  $\beta$ -клеток поджелудочной железы — инсулиноме) приведет к развитию тяжелой гипогликемии — состоянию, угрожающему жизни пациента.

#### 12.4.1.2. ПРИЧИНЫ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ УРОВНЯ ГЛЮКОЗЫ В КРОВИ

При целом ряде состояний содержание глюкозы в крови повышается (гипергликемия) или снижается (гипогликемия). Практически всегда патологические изменения уровня глюкозы крови — результат недостатка или избытка одного из гормонов, участвующих в регуляции ее уровня. Именно поэтому к гипергликемии может приводить недостаток инсулина или избыток адреналина, кортизола, СТГ либо глюкагона.

Наиболее часто гипергликемия развивается у больных сахарным диабетом (недостаток инсулина). Однако повышенный уровень глюкозы в крови необязательно свидетельствует о его наличии. Кроме СД, гипергликемию наблюдают при следующих состояниях и заболеваниях: эпидемическом энцефалите, сифилисе ЦНС, повышении гормональной активности щитовидной железы, коры и мозгового слоя надпочечников, гипофиза; травмах и опухолях мозга, эпилепсии, отравлении оксидом углерода, сильных эмоциональных и психических возбуждениях.

Гипергликемия может быть следствием некоторых видов лекарственной терапии. Использование в лечении пациента глюкокорти-



коидов (гидрокортизон), фенитоина, некоторых диуретиков, а также внутривенное введение глюкозосодержащих растворов сопровождается временной гипергликемией.

Гипогликемия у людей, не болеющих сахарным диабетом, служит следствием опухоли  $\beta$ -клеток поджелудочной железы — инсулиномы, которая синтезирует инсулин в повышенном количестве.

Гипогликемию может вызвать дефицит какого-либо из трех гормонов (кортизол, СТГ, катехоламины), повышающих концентрацию глюкозы в крови. Например, недостаточность коры надпочечников, сопровождаемая дефицитом кортизола, нередко приводит к развитию эпизодов гипогликемии.

Иногда гипогликемические состояния наблюдают у пациентов с заболеваниями ЦНС:

- с распространенными сосудистыми нарушениями;
- с острым пиогенным, туберкулезным и криптококковым менингитом;
- с энцефалитом при эпидемическом паротите, первичной или метастатической опухоли мягкой мозговой оболочки;
- при небактериальном и первичном амебном менингоэнцефалите.

### 12.4.1.2.1. Сахарный диабет

Сахарный диабет (СД) — заболевание, которое характеризуется гипергликемией, возникающей вследствие абсолютной или относительной инсулиновой недостаточности. В результате недостаточности инсулина глюкоза накапливается в крови, так как не может проникать в клетки (за исключением клеток печени и головного мозга).

Выделяют два основных типа СД. СД 1-го типа (инсулинозависимый) встречаются у 10–15% всех больных диабетом. Гипергликемия при СД 1-го типа развивается вследствие инсулиновой недостаточности, обусловленной аутоиммунной деструкцией (антителами к собственным клеткам) инсулинопродуцирующих  $\beta$ -клеток поджелудочной железы. СД 2-го типа встречаются значительно чаще — в 85–90% случаев. Гипергликемия при данном типе обусловлена не недостаточной продукцией инсулина (у большинства больных концентрация инсулина в крови даже повышена), а неэффективностью его действия на клетки органов и тканей. Этот феномен называют инсулиновой резистентностью. Рост заболеваемости СД 2-го типа наблюдают после 50 лет жизни, в то время как пики СД 1-го типа отмечают в возрасте 3–5 и 11–14 лет. Основные различия между СД 1-го и 2-го типа приведены в табл. 12.8.

Таблица 12.8. Основные различия между сахарным диабетом 1-го и 2-го типа

Сахарный диабет 1-го типа	Сахарный диабет 2-го типа
Возникает в детстве	Возникает у взрослых людей
Для большинства пациентов характерно острое начало заболевания	Характерно постепенное развитие заболевания
Пациенты имеют худощавый внешний вид	Заболеванию часто сопутствует ожирение
Уровень инсулина в крови снижен или не определяется	Уровень инсулина в крови в норме или повышен
На его долю приходится 10–15% больных сахарным диабетом	На его долю приходится 85–90% больных
В возникновении генетические факторы имеют меньшее значение, чем при сахарном диабете 2-го типа	Генетическая предрасположенность очень часто носит семейный характер
Кетоацидоз (накопление в организме продуктов метаболизма жирных кислот и их токсическое действие на организм) может быть первым проявлением болезни и часто сопровождает течение заболевания	Кетоацидоз развивается крайне редко
Больные абсолютно зависимы от инъекций инсулина	Нет абсолютной зависимости от инсулина; в большинстве случаев лечение включает диету и прием сахароснижающих препаратов внутрь

Помимо СД 1-го и 2-го типа, выделяют другие специфические типы. СД у таких больных служит следствием определенного первичного заболевания (генетического или приобретенного), и эту форму называют вторичным СД. Основными его причинами считаются следующие заболевания.

- Генетические дефекты  $\beta$ -клеток или действия инсулина.
- Акромегалия (гигантизм), обусловленная опухолью гипофиза, которая продуцирует избыточное количество СТГ (гормона роста); СТГ нарушает захват глюкозы жировой и мышечной тканью путем подавления действия инсулина и способствует развитию гипергликемии.
- Феохромоцитома (как правило, опухоль мозгового вещества надпочечников), секретирует избыточное количество катехоламинов (адреналин, норадреналин). Их действие направлено на мобилизацию глюкозы из депо и подавление эффектов инсулина, что приводит к развитию гипергликемии.

- Синдром Иценко–Кушинга (гиперплазия коркового слоя надпочечников), сопровождается повышенной секрецией кортизола, который, в свою очередь, угнетает захват глюкозы многими тканями и способствует развитию гипергликемии.
- Хронический панкреатит или операция на поджелудочной железе вызывает повреждение ткани железы (в том числе и  $\beta$ -клеток), приводит к снижению секреции инсулина и развитию гипергликемии.
- Токсическое воздействие на поджелудочную железу лекарственных средств или химикатов.

Нормально протекающая беременность сопровождается многочисленными гормональными сдвигами, предрасполагающими к гипергликемии и соответственно развитию СД. От 1 до 14% беременных страдают преходящим (транзиторным) СД. Диагноз, установленный во время беременности, называют гестационным СД. У большинства женщин с гестационным СД в конце беременности, когда гормональные уровни возвращаются к исходным, проявления болезни исчезают. Тем не менее примерно у 30–50% женщин с гестационным СД в анамнезе в дальнейшем развивается СД 2-го типа.

#### 12.4.1.2.2. Диагностика сахарного диабета

Задачей лабораторного обследования при подозрении на наличие сахарного диабета считают обнаружение или подтверждение наличия у пациента абсолютной или относительной недостаточности инсулина. Основные биохимические признаки недостаточности инсулина: гипергликемия натощак или выходящее за пределы нормы повышение уровня глюкозы после еды, глюкоз- и кетонурия. При наличии клинических симптомов сахарного диабета лабораторные исследования необходимы прежде всего для подтверждения клинического диагноза. В отсутствие симптомов результаты лабораторных исследований сами по себе позволяют установить точный диагноз.

##### Исследование глюкозы в крови

Исследование концентрации глюкозы в крови — самый распространенный метод диагностики СД. Глюкоза равномерно распределяется между плазмой и форменными элементами крови с некоторым превышением ее концентрации в плазме. Содержание глюкозы в артериальной крови выше, чем в венозной, что обусловлено непрерывным ее использованием клетками тканей и органов. Этим же объясняется и преимущество исследования глюкозы в плазме или сыворотке венозной крови перед ее определением в капиллярной крови для диагностики СД. Венозная кровь дополнительно отражает такой важный момент,

как использование глюкозы клетками тканей и органов. Именно поэтому для диагностики СД предпочтительно определение глюкозы в венозной крови. Референтные величины концентрации глюкозы в крови представлены в табл. 12.9.

Таблица 12.9. Референтные величины концентрации глюкозы в крови

Возраст	Концентрация глюкозы в плазме крови	
	ммоль/л	мг/дл
Новорожденные	2,8–4,4	50–115
Дети	3,9–5,8	70–105
Взрослые	3,9–6,1	70–110

### Методические особенности определения глюкозы в крови

- Существующие в настоящее время портативные глюкометры (с использованием тестовых полосок) не могут обеспечить точность измерения концентрации глюкозы с достаточной аналитической надежностью. Именно поэтому для диагностики СД их не следует использовать. Концентрацию глюкозы в крови необходимо исследовать в лицензированной КДЛ.
- КДЛ должны использовать для определения концентрации глюкозы в крови методы, имеющие аналитическую вариацию не более 3,3% (0,23 от 7,0 ммоль/л), а общую неточность ниже 7,9%.

### Глюкозотолерантный тест

Наиболее информативным методом диагностики СД считают динамику изменения уровня глюкозы в крови пациентов в ответ на сахарную нагрузку — глюкозотолерантный тест (тест на переносимость глюкозы).

Глюкозотолерантный тест необходимо проводить у больных, если содержание глюкозы в плазме крови натощак составляет от 6,1 до 7,0 ммоль/л, а также у пациентов с выявленными факторами риска в отношении развития СД [СД у близких родственников, рождение крупного плода, нарушение толерантности (переносимости) к глюкозе в анамнезе, ожирение, гипертоническая болезнь].

Для проведения теста больной 3 дня должен получать диету, содержащую не менее 125 г углеводов (этому требованию отвечают все столы больничного питания). Пробу проводят утром после 10–14 ч голодания. Берут исходную пробу крови натощак, больной принимает 75 г глюкозы, растворенной в 200 мл воды, а ребенок — из расчета 1,75 г глюкозы на 1 кг массы тела, но не более 75 г. Затем повторно берут кровь через 120 мин и исследуют пробы на содержание глюкозы.

### Исследование мочи на глюкозурию

У здоровых людей глюкоза, попадающая в первичную мочу, почти полностью реабсорбируется в почечных канальцах и в моче общепринятыми методами ее не определить. При превышении концентрации глюкозы в крови выше почечного порога (8,88–9,99 ммоль/л) глюкоза начинает поступать в мочу, и возникает глюкозурия.

Глюкозу можно обнаружить в моче в двух случаях: при значительном увеличении гликемии и снижении почечного порога для глюкозы — почечном диабете. Очень редко эпизоды умеренной глюкозурии можно наблюдать у здоровых людей после значительной алиментарной нагрузки продуктами с высоким содержанием углеводов.

Вне зависимости от типа СД в отсутствие лечения у больных сохраняется гипергликемия. При этом если уровень глюкозы в крови превышает почечный порог, глюкоза начинает выводиться с мочой.

В лаборатории обычно определяют процентное содержание глюкозы в моче, что само по себе несет недостаточную информацию, так как величина диуреза и соответственно истинная потеря глюкозы с мочой могут широко варьировать. Именно поэтому необходимо, чтобы лаборатория выдавала результат с расчетом суточной глюкозурии (количество глюкозы, г). Для этого в лабораторию необходимо направлять всю суточную мочу.

У больных СД исследование глюкозурии проводят в целях оценки эффективности проводимого лечения и в качестве дополнительного критерия компенсации СД. Уменьшение суточной глюкозурии свидетельствует об эффективности лечебных мероприятий.

*Критерием компенсации СД типа 2 (инсулиннезависимого) считают достижение аглюкозурии (отсутствие глюкозы в моче).*

*При СД типа 1 (инсулинзависимого) допускают потерю глюкозы с мочой 20–30 г/сут.*

У больных СД глюкозурия обуславливает развитие ряда характерных для заболевания клинических симптомов. Из-за выраженного осмотического эффекта глюкозы (осмотически активное вещество, которое притягивает воду в сосудистое русло) вода начинает поступать вслед за ней в мочу, что приводит к увеличению объема последней, проявляется полиурией и развитием дегидратации (обезвоживания), что стимулирует центр жажды в гипоталамусе с последующим увеличением потребления пациентом воды. Выраженная гипергликемия у больных СД сопровождается пятью классическими симптомами:

- глюкозурией (выведение глюкозы с мочой);
- полиурией (увеличение количества мочи);
- никтурией (опорожнение мочевого пузыря ночью);

- полидипсией (увеличение объема потребляемой жидкости);
- дегидратацией (обезвоживание организма).

Определение глюкозы в моче обычно не используют для диагностики СД. Тем более что с возрастом почечный порог для глюкозы увеличивается и у пожилых людей может составлять выше 16,6 ммоль/л, прежде чем появится глюкозурия. Именно поэтому у пожилых людей исследование мочи на глюкозу для диагностики СД не эффективно. Однако СД 2-го типа, а также вторичный имеют длительный субклинический период без проявления симптомов. В связи с этим СД нередко диагностируют по обнаружению глюкозы в моче при профилактических осмотрах.

### Гликозилированный гемоглобин

У человека имеются три основных типа нормального гемоглобина: эмбриональный — U, фетальный — F и гемоглобин взрослого человека — A. Гемоглобин U (назван по начальной букве латинского слова *uterus* — матка) встречаются в эмбрионе между 7-й и 12-й неделей жизни, затем он исчезает и появляется фетальный гемоглобин, который после 3-го месяца служит основным гемоглобином плода. Вслед за этим появляется постепенно обыкновенный гемоглобин взрослого человека, называемый гемоглобином A (HbA) по начальной букве английского слова *adult* (взрослый, зрелый).

Гемоглобин взрослого человека (HbA) характеризуется структурной неоднородностью. В норме вместе с основной фракцией гемоглобина (HbA) в крови существует небольшое количество других его «минорных» фракций. В дополнение к основному гемоглобину HbA1 в крови взрослого человека присутствует гемоглобин HbA2, который также состоит из 4 субъединиц: двух  $\alpha$ - и двух  $\delta$ -цепей (дельта). На долю HbA2 приходится около 2,5% всего гемоглобина.

Белки, в том числе и гемоглобин, если их долго выдерживать в растворе, содержащем глюкозу, связываются с ней, и, что принципиально, такое связывание происходит самопроизвольно — без участия ферментов. Гликозилированию преимущественно подвержен гемоглобин A1 (HbA1), при определении которого методом хроматографии катионного обмена и обнаруживают несколько его вариантов: HbA1a, HbA1b и HbA1c. Наиболее распространенным является HbA1c, составляющий приблизительно 60–80% всего количества гликозилированного гемоглобина. Именно в нем молекулы глюкозы присоединяются к аминокислоте валину  $\beta$ -цепи гемоглобина A, вследствие чего он обозначен как HbA1c.

Гликозилированный (или гликированный) гемоглобин (HbA1c) образуется в результате медленной, неферментативной (неэнзиматической) реакции между гемоглобином A, содержащимся в эритроцитах,

и глюкозой сыворотки крови. Степень гликозилирования гемоглобина (а следовательно, его концентрация) зависит от концентрации глюкозы в крови и длительности контакта глюкозы с гемоглобином (срока жизни эритроцита). Клиническое и научное значение этих метаболических особенностей не было оценено вплоть до 1968 г., когда S. Rajbarg обнаружил повышение гликозилированных фракций гемоглобина у больных СД. Поскольку гликозилированная форма гемоглобина HbA<sub>1c</sub> количественно преобладает и дает более тесную корреляцию со степенью выраженности СД, ее определение используют для диагностики и мониторинга течения заболевания. Референтные величины содержания HbA<sub>1c</sub> в крови — 4,0–5,2% общего гемоглобина.

Срок жизни эритроцитов определяет длительность контакта глюкозы с гемоглобином. Эритроциты, циркулирующие в крови, имеют разный возраст, поэтому для усредненной характеристики уровня связанной с ними глюкозы ориентируются на полупериод жизни эритроцитов — 60 сут, или 2 мес. Именно поэтому минимальный срок между повторными исследованиями HbA<sub>1c</sub> в крови должен составлять не менее 2 мес.

Почему измерения глюкозы в крови недостаточно для диагностики и эффективного мониторинга лечения СД?

Наглядный ответ на этот вопрос представлен на рис. 12.7. Какой вывод о реальной компенсации диабета можно сделать, если измерение концентрации глюкозы в крови состоялось, например, в момент ее максимума? Или в момент ее минимума? Действительно, измерение глюкозы в крови оценивает текущий (сиюминутный) уровень глюкозы, который может зависеть от приема (или неприема) пищи, ее состава, физических нагрузок и их интенсивности, эмоционального состояния пациента, времени суток. Очевидна высокая вероятность того, что определение текущего уровня глюкозы в крови не будет отражать действительную степень компенсации СД, а это может привести либо к передозировке лекарственных препаратов, либо к неоправданному уменьшению их количества. Ценность определения гликозилированного гемоглобина (HbA<sub>1c</sub>) в том, что он характеризует средний уровень глюкозы в крови на протяжении длительного промежутка времени, то есть действительную степень компенсации СД на протяжении последних 1–2 мес.

В целом определение HbA<sub>1c</sub> дает усредненное, интегрированное представление об уровне гликемии при всех формах СД.

Результаты исследования HbA<sub>1c</sub> оценивают следующим образом: 4–6% свидетельствуют о хорошей компенсации СД в последние 1–2 мес, 6,2–7,5% — удовлетворительный уровень, выше 7,5% —

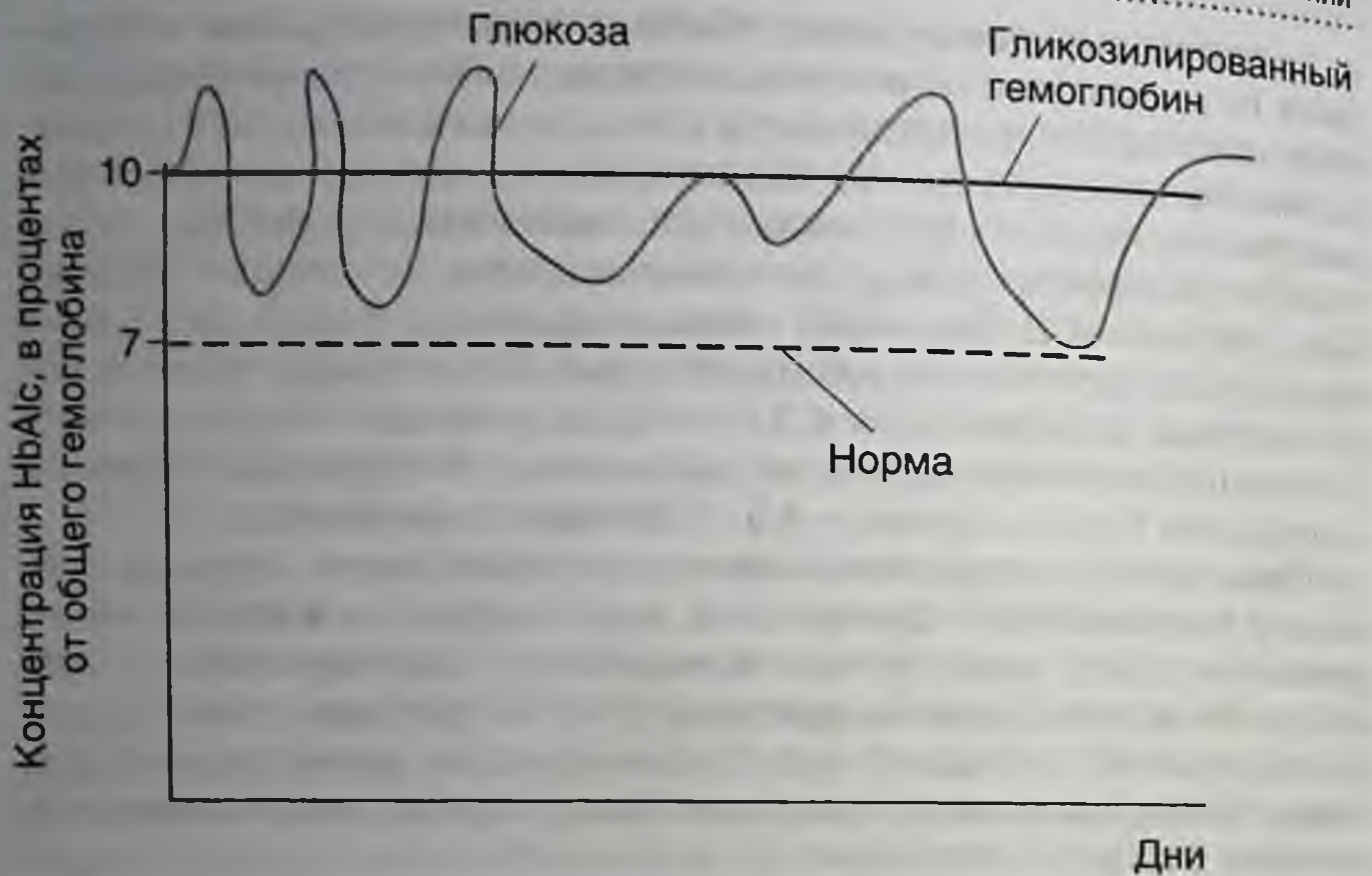


Рис. 12.7. Динамика концентрации глюкозы в крови на протяжении 9 нед. Концентрация глюкозы изменяется между 7 и 12 ммоль/л. Уровень HbA1c в течение всего периода постоянен — 10%

неудовлетворительный уровень. Для оценки эффективности лечения целесообразно повторить исследование через 2–3 мес.

Ложные сниженные значения HbA1c отмечают при уремии, острых и хронических геморрагиях, а также при состояниях с уменьшением длительности жизни эритроцитов (например, при гемолитической анемии).

#### 12.4.1.2.3. Критерии диагностики сахарного диабета

Диагноз СД может быть установлен при наличии одного из нижеприведенных критериев:

- HbA1c >6,5%;
- клинические симптомы СД (полиурия, полидипсия и необъяснимая потеря массы тела) и случайно выявленное повышение концентрации глюкозы в плазме крови  $\geq 11,1$  ммоль/л ( $\geq 200$  мг%);
- уровень глюкозы в плазме крови натощак (состояние натощак — отсутствие приема любой пищи в течение не менее 8 ч)  $> 7,1$  ммоль/л ( $> 126$  мг%);
- через 2 ч после нагрузки глюкозой внутрь (75 г глюкозы) —  $\geq 11,1$  ммоль/л ( $\geq 200$  мг%).



Пациенты с уровнем HbA1c  $>6$ , но  $<6,5\%$  имеют высокую вероятность (риск) развития СД.

Диагностические критерии СД и других категорий гипергликемии приведены в табл. 12.10. Для эпидемиологических или скрининговых целей достаточно одного значения уровня глюкозы натощак или 2-часового уровня глюкозы в ходе теста толерантности к глюкозе. Для клинических целей диагноз СД всегда должен быть подтвержден повторным тестированием в последующий день, за исключением случаев несомненной гипергликемии с острой метаболической декомпенсацией или очевидными симптомами.

Диагностическое значение имеют следующие уровни глюкозы плазмы венозной крови натощак (для постановки диагноза рекомендуется использовать только результаты исследования венозной плазмы):

- нормальное содержание глюкозы плазмы крови натощак составляет до  $6,1$  ммоль/л ( $<110$  мг%);
- содержание глюкозы в плазме крови натощак от  $\geq 6,1$  до  $<7,0$  ммоль/л (от  $\geq 110$  до  $<128$  мг%) определяют как нарушенную гликемию натощак;
- уровень гликемии в плазме крови натощак  $>7,0$  ммоль/л ( $>128$  мг%) расценивают как предварительный диагноз СД, который должен быть подтвержден по приведенным выше критериям.

Таблица 12.10. Диагностические критерии сахарного диабета и других категорий гипергликемии

Категория	Концентрация глюкозы, ммоль/л			
	цельная кровь		плазма	
	венозная	капиллярная	венозная	капиллярная
Сахарный диабет: натощак и/или через 120 мин после приема глюкозы	$>6,1$ $>10,0$	$>6,1$ $>11,1$	$>7,0$ $>11,1$	$>7,0$ $>12,2$
Нарушение толерантности к глюкозе: натощак и через 120 мин после приема глю- козы	$<6,1$ $>6,7$ и $<10,0$	$<6,1$ $>7,8$ и $<11,1$	$<7,0$ $>7,8$ и $<11,1$	$<7,0$ $>8,9$ и $<12,2$
Нарушенная гликемия: натощак через 120 мин после приема глюкозы	$>5,6$ и $<6,1$ $<6,7$	$>5,6$ и $<6,1$ $<7,8$	$>6,1$ и $<7,0$ $<7,8$	$>6,1$ и $<7,0$ $<8,9$

избыточное увеличение концентрации глюкозы в крови. Это обстоятельство отражает важность постоянного поддержания минимального уровня глюкозы в крови для нормального функционирования головного мозга.

Вместе с тем это определяет и то, что нормальный гормональный ответ на повышение уровня глюкозы в крови зависит от двух факторов:

- секреции адекватного количества инсулина, то есть от нормального функционирования  $\beta$ -клеток поджелудочной железы;
- количества и функциональной активности (чувствительности) инсулиновых рецепторов на поверхности инсулиночувствительных клеток.

Если секреция инсулина будет неадекватна (недостаточна) или функциональная активность инсулиновых рецепторов снизится, концентрация глюкозы в крови будет повышена, что может перейти в заболевание — СД. В свою очередь, избыточная секреция инсулина (например, при опухоли  $\beta$ -клеток поджелудочной железы — инсулиноме) приведет к развитию тяжелой гипогликемии — состоянию, угрожающему жизни пациента.

#### 12.4.1.2. ПРИЧИНЫ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ УРОВНЯ ГЛЮКОЗЫ В КРОВИ

При целом ряде состояний содержание глюкозы в крови повышается (гипергликемия) или снижается (гипогликемия). Практически всегда патологические изменения уровня глюкозы крови — результат недостатка или избытка одного из гормонов, участвующих в регуляции ее уровня. Именно поэтому к гипергликемии может приводить недостаток инсулина или избыток адреналина, кортизола, СТГ либо глюкагона.

Наиболее часто гипергликемия развивается у больных сахарным диабетом (недостаток инсулина). Однако повышенный уровень глюкозы в крови необязательно свидетельствует о его наличии. Кроме СД, гипергликемию наблюдают при следующих состояниях и заболеваниях: эпидемическом энцефалите, сифилисе ЦНС, повышении гормональной активности щитовидной железы, коры и мозгового слоя надпочечников, гипофиза, травмах и опухолях мозга, эпилепсии, отравлении оксидом углерода, сильных эмоциональных и психических возбуждениях.

Гипергликемия может быть следствием некоторых видов лекарственной терапии. Использование в лечении пациента глюкокорти-

коидов (гидрокортизон), фенитоина, некоторых диуретиков, а также внутривенное введение глюкозосодержащих растворов сопровождается временной гипергликемией.

Гипогликемия у людей, не болеющих сахарным диабетом, служит следствием опухоли  $\beta$ -клеток поджелудочной железы — инсулиномы, которая синтезирует инсулин в повышенном количестве.

Гипогликемию может вызвать дефицит какого-либо из трех гормонов (кортизол, СТГ, катехоламины), повышающих концентрацию глюкозы в крови. Например, недостаточность коры надпочечников, сопровождаемая дефицитом кортизола, нередко приводит к развитию эпизодов гипогликемии.

Иногда гипогликемические состояния наблюдают у пациентов с заболеваниями ЦНС:

- с распространенными сосудистыми нарушениями;
- с острым пиогенным, туберкулезным и криптококковым менингитом;
- с энцефалитом при эпидемическом паротите, первичной или метастатической опухоли мягкой мозговой оболочки;
- при небактериальном и первичном амебном менингоэнцефалите.

### 12.4.1.2.1. Сахарный диабет

Сахарный диабет (СД) — заболевание, которое характеризуется гипергликемией, возникающей вследствие абсолютной или относительной инсулиновой недостаточности. В результате недостаточности инсулина глюкоза накапливается в крови, так как не может проникать в клетки (за исключением клеток печени и головного мозга).

Выделяют два основных типа СД. СД 1-го типа (инсулинозависимый) встречаются у 10–15% всех больных диабетом. Гипергликемия при СД 1-го типа развивается вследствие инсулиновой недостаточности, обусловленной аутоиммунной деструкцией (антителами к собственным клеткам) инсулинопродуцирующих  $\beta$ -клеток поджелудочной железы. СД 2-го типа встречаются значительно чаще — в 85–90% случаев. Гипергликемия при данном типе обусловлена не недостаточной продукцией инсулина (у большинства больных концентрация инсулина в крови даже повышена), а неэффективностью его действия на клетки органов и тканей. Этот феномен называют инсулиновой резистентностью. Рост заболеваемости СД 2-го типа наблюдают после 50 лет жизни, в то время как пики СД 1-го типа отмечают в возрасте 3–5 и 11–14 лет. Основные различия между СД 1-го и 2-го типа приведены в табл. 12.8.

Таблица 12.8. Основные различия между сахарным диабетом 1-го и 2-го типа

Сахарный диабет 1-го типа	Сахарный диабет 2-го типа
Возникает в детстве	Возникает у взрослых людей
Для большинства пациентов характерно острое начало заболевания	Характерно постепенное развитие заболевания
Пациенты имеют худощавый внешний вид	Заболеванию часто сопутствует ожирение
Уровень инсулина в крови снижен или не определяется	Уровень инсулина в крови в норме или повышен
На его долю приходится 10–15% больных сахарным диабетом	На его долю приходится 85–90% больных
В возникновении генетические факторы имеют меньшее значение, чем при сахарном диабете 2-го типа	Генетическая предрасположенность очень часто носит семейный характер
Кетоацидоз (накопление в организме продуктов метаболизма жирных кислот и их токсическое действие на организм) может быть первым проявлением болезни и часто сопровождает течение заболевания	Кетоацидоз развивается крайне редко
Больные абсолютно зависимы от инъекций инсулина	Нет абсолютной зависимости от инсулина; в большинстве случаев лечение включает диету и прием сахароснижающих препаратов внутрь

Помимо СД 1-го и 2-го типа, выделяют другие специфические типы. СД у таких больных служит следствием определенного первичного заболевания (генетического или приобретенного), и эту форму называют вторичным СД. Основными его причинами считаются следующие заболевания.

- Генетические дефекты  $\beta$ -клеток или действия инсулина.
- Акромегалия (гигантизм), обусловленная опухолью гипофиза, которая продуцирует избыточное количество СТГ (гормона роста); СТГ нарушает захват глюкозы жировой и мышечной тканью путем подавления действия инсулина и способствует развитию гипергликемии.
- Феохромоцитома (как правило, опухоль мозгового вещества надпочечников), секретирует избыточное количество катехоламинов (адреналин, норадреналин). Их действие направлено на мобилизацию глюкозы из депо и подавление эффектов инсулина, что приводит к развитию гипергликемии.

- Синдром Иценко–Кушинга (гиперплазия коркового слоя надпочечников), сопровождается повышенной секрецией кортизола, который, в свою очередь, угнетает захват глюкозы многими тканями и способствует развитию гипергликемии.
- Хронический панкреатит или операция на поджелудочной железе вызывает повреждение ткани железы (в том числе и  $\beta$ -клеток), приводит к снижению секреции инсулина и развитию гипергликемии.
- Токсическое воздействие на поджелудочную железу лекарственных средств или химикатов.

Нормально протекающая беременность сопровождается многочисленными гормональными сдвигами, предрасполагающими к гипергликемии и соответственно развитию СД. От 1 до 14% беременных страдают преходящим (транзиторным) СД. Диагноз, установленный во время беременности, называют гестационным СД. У большинства женщин с гестационным СД в конце беременности, когда гормональные уровни возвращаются к исходным, проявления болезни исчезают. Тем не менее примерно у 30–50% женщин с гестационным СД в анамнезе в дальнейшем развивается СД 2-го типа.

#### 12.4.1.2.2. Диагностика сахарного диабета

Задачей лабораторного обследования при подозрении на наличие сахарного диабета считают обнаружение или подтверждение наличия у пациента абсолютной или относительной недостаточности инсулина. Основные биохимические признаки недостаточности инсулина: гипергликемия натощак или выходящее за пределы нормы повышение уровня глюкозы после еды, глюкоз- и кетонурия. При наличии клинических симптомов сахарного диабета лабораторные исследования необходимы прежде всего для подтверждения клинического диагноза. В отсутствие симптомов результаты лабораторных исследований сами по себе позволяют установить точный диагноз.

##### Исследование глюкозы в крови

Исследование концентрации глюкозы в крови — самый распространенный метод диагностики СД. Глюкоза равномерно распределяется между плазмой и форменными элементами крови с некоторым превышением ее концентрации в плазме. Содержание глюкозы в артериальной крови выше, чем в венозной, что обусловлено непрерывным ее использованием клетками тканей и органов. Этим же объясняется и преимущество исследования глюкозы в плазме или сыворотке венозной крови перед ее определением в капиллярной крови для диагностики СД. Венозная кровь дополнительно отражает такой важный момент,

как использование глюкозы клетками тканей и органов. Именно поэтому для диагностики СД предпочтительно определение глюкозы в венозной крови. Референтные величины концентрации глюкозы в крови представлены в табл. 12.9.

Таблица 12.9. Референтные величины концентрации глюкозы в крови

Возраст	Концентрация глюкозы в плазме крови	
	ммоль/л	мг/дл
Новорожденные	2,8–4,4	50–115
Дети	3,9–5,8	70–105
Взрослые	3,9–6,1	70–110

### Методические особенности определения глюкозы в крови

- Существующие в настоящее время портативные глюкометры (с использованием тестовых полосок) не могут обеспечить точность измерения концентрации глюкозы с достаточной аналитической надежностью. Именно поэтому для диагностики СД их не следует использовать. Концентрацию глюкозы в крови необходимо исследовать в лицензированной КДЛ.
- КДЛ должны использовать для определения концентрации глюкозы в крови методы, имеющие аналитическую вариацию не более 3,3% (0,23 от 7,0 ммоль/л), а общую неточность ниже 7,9%.

### Глюкозотолерантный тест

Наиболее информативным методом диагностики СД считают динамику изменения уровня глюкозы в крови пациентов в ответ на сахарную нагрузку — глюкозотолерантный тест (тест на переносимость глюкозы).

Глюкозотолерантный тест необходимо проводить у больных, если содержание глюкозы в плазме крови натощак составляет от 6,1 до 7,0 ммоль/л, а также у пациентов с выявленными факторами риска в отношении развития СД [СД у близких родственников, рождение крупного плода, нарушение толерантности (переносимости) к глюкозе в анамнезе, ожирение, гипертоническая болезнь].

Для проведения теста больной 3 дня должен получать диету, содержащую не менее 125 г углеводов (этому требованию отвечают все столы больничного питания). Пробу проводят утром после 10–14 ч голодания. Берут исходную пробу крови натощак, больной принимает 75 г глюкозы, растворенной в 200 мл воды, а ребенок — из расчета 1,75 г глюкозы на 1 кг массы тела, но не более 75 г. Затем повторно берут кровь через 120 мин и исследуют пробы на содержание глюкозы.

### Исследование мочи на глюкозурию

У здоровых людей глюкоза, попадающая в первичную мочу, почти полностью реабсорбируется в почечных канальцах и в моче общепринятыми методами ее не определить. При превышении концентрации глюкозы в крови выше почечного порога (8,88–9,99 ммоль/л) глюкоза начинает поступать в мочу, и возникает глюкозурия.

Глюкозу можно обнаружить в моче в двух случаях: при значительном увеличении гликемии и снижении почечного порога для глюкозы — почечном диабете. Очень редко эпизоды умеренной глюкозурии можно наблюдать у здоровых людей после значительной алиментарной нагрузки продуктами с высоким содержанием углеводов.

Вне зависимости от типа СД в отсутствие лечения у больных сохраняется гипергликемия. При этом если уровень глюкозы в крови превышает почечный порог, глюкоза начинает выводиться с мочой.

В лаборатории обычно определяют процентное содержание глюкозы в моче, что само по себе несет недостаточную информацию, так как величина диуреза и соответственно истинная потеря глюкозы с мочой могут широко варьировать. Именно поэтому необходимо, чтобы лаборатория выдавала результат с расчетом суточной глюкозурии (количество глюкозы, г). Для этого в лабораторию необходимо направлять всю суточную мочу.

У больных СД исследование глюкозурии проводят в целях оценки эффективности проводимого лечения и в качестве дополнительного критерия компенсации СД. Уменьшение суточной глюкозурии свидетельствует об эффективности лечебных мероприятий.

*Критерием компенсации СД типа 2 (инсулиннезависимого) считают достижение аглюкозурии (отсутствие глюкозы в моче).*

*При СД типа 1 (инсулинзависимого) допускают потерю глюкозы с мочой 20–30 г/сут.*

У больных СД глюкозурия обуславливает развитие ряда характерных для заболевания клинических симптомов. Из-за выраженного осмотического эффекта глюкозы (осмотически активное вещество, которое притягивает воду в сосудистое русло) вода начинает поступать вслед за ней в мочу, что приводит к увеличению объема последней, проявляется полиурией и развитием дегидратации (обезвоживания), что стимулирует центр жажды в гипоталамусе с последующим увеличением потребления пациентом воды. Выраженная гипергликемия у больных СД сопровождается пятью классическими симптомами:

- глюкозурией (выведение глюкозы с мочой);
- полиурией (увеличение количества мочи);
- никтурией (опорожнение мочевого пузыря ночью);

- полидипсией (увеличение объема потребляемой жидкости);
- дегидратацией (обезвоживание организма).

Определение глюкозы в моче обычно не используют для диагностики СД. Тем более что с возрастом почечный порог для глюкозы увеличивается и у пожилых людей может составлять выше 16,6 ммоль/л, прежде чем появится глюкозурия. Именно поэтому у пожилых людей исследование мочи на глюкозу для диагностики СД не эффективно. Однако СД 2-го типа, а также вторичный имеют длительный субклинический период без проявления симптомов. В связи с этим СД нередко диагностируют по обнаружению глюкозы в моче при профилактических осмотрах.

### Гликозилированный гемоглобин

У человека имеются три основных типа нормального гемоглобина: эмбриональный — U, фетальный — F и гемоглобин взрослого человека — A. Гемоглобин U (назван по начальной букве латинского слова *uterus* — матка) встречается в эмбрионе между 7-й и 12-й недель жизни, затем он исчезает и появляется фетальный гемоглобин, который после 3-го месяца служит основным гемоглобином плода. Вслед за этим появляется постепенно обыкновенный гемоглобин взрослого человека, называемый гемоглобином A (HbA) по начальной букве английского слова *adult* (взрослый, зрелый).

Гемоглобин взрослого человека (HbA) характеризуется структурной неоднородностью. В норме вместе с основной фракцией гемоглобина (HbA) в крови существует небольшое количество других его «минорных» фракций. В дополнение к основному гемоглобину HbA1 в крови взрослого человека присутствует гемоглобин HbA2, который также состоит из 4 субъединиц: двух  $\alpha$ - и двух  $\delta$ -цепей (дельта). На долю HbA2 приходится около 2,5% всего гемоглобина.

Белки, в том числе и гемоглобин, если их долго выдерживать в растворе, содержащем глюкозу, связываются с ней, и, что принципиально, такое связывание происходит самопроизвольно — без участия ферментов. Гликозилированию преимущественно подвержен гемоглобин A1 (HbA1), при определении которого методом хроматографии катионного обмена и обнаруживают несколько его вариантов: HbA1a, HbA1b и HbA1c. Наиболее распространенным является HbA1c, составляющий приблизительно 60–80% всего количества гликозилированного гемоглобина. Именно в нем молекулы глюкозы присоединяются к аминокислоте валину  $\beta$ -цепи гемоглобина A, вследствие чего он обозначен как HbA1c.

Гликозилированный (или гликированный) гемоглобин (HbA1c) образуется в результате медленной, неферментативной (неэнзиматической) реакции между гемоглобином A, содержащимся в эритроцитах,



и глюкозой сыворотки крови. Степень гликозилирования гемоглобина (а следовательно, его концентрация) зависит от концентрации глюкозы в крови и длительности контакта глюкозы с гемоглобином (срока жизни эритроцита). Клиническое и научное значение этих метаболических особенностей не было оценено вплоть до 1968 г., когда S. Rajbarg обнаружил повышение гликозилированных фракций гемоглобина у больных СД. Поскольку гликозилированная форма гемоглобина HbA<sub>1c</sub> количественно преобладает и дает более тесную корреляцию со степенью выраженности СД, ее определение используют для диагностики и мониторинга течения заболевания. Референтные величины содержания HbA<sub>1c</sub> в крови — 4,0–5,2% общего гемоглобина.

Срок жизни эритроцитов определяет длительность контакта глюкозы с гемоглобином. Эритроциты, циркулирующие в крови, имеют разный возраст, поэтому для усредненной характеристики уровня связанной с ними глюкозы ориентируются на полупериод жизни эритроцитов — 60 сут, или 2 мес. Именно поэтому минимальный срок между повторными исследованиями HbA<sub>1c</sub> в крови должен составлять не менее 2 мес.

Почему измерения глюкозы в крови недостаточно для диагностики и эффективного мониторинга лечения СД?

Наглядный ответ на этот вопрос представлен на рис. 12.7. Какой вывод о реальной компенсации диабета можно сделать, если измерение концентрации глюкозы в крови состоялось, например, в момент ее максимума? Или в момент ее минимума? Действительно, измерение глюкозы в крови оценивает текущий (сиюминутный) уровень глюкозы, который может зависеть от приема (или неприема) пищи, ее состава, физических нагрузок и их интенсивности, эмоционального состояния пациента, времени суток. Очевидна высокая вероятность того, что определение текущего уровня глюкозы в крови не будет отражать действительную степень компенсации СД, а это может привести либо к передозировке лекарственных препаратов, либо к неоправданному уменьшению их количества. Ценность определения гликозилированного гемоглобина (HbA<sub>1c</sub>) в том, что он характеризует средний уровень глюкозы в крови на протяжении длительного промежутка времени, то есть действительную степень компенсации СД на протяжении последних 1–2 мес.

В целом определение HbA<sub>1c</sub> дает усредненное, интегрированное представление об уровне гликемии при всех формах СД.

Результаты исследования HbA<sub>1c</sub> оценивают следующим образом: 4–6% свидетельствуют о хорошей компенсации СД в последние 1–2 мес, 6,2–7,5% — удовлетворительный уровень, выше 7,5% —

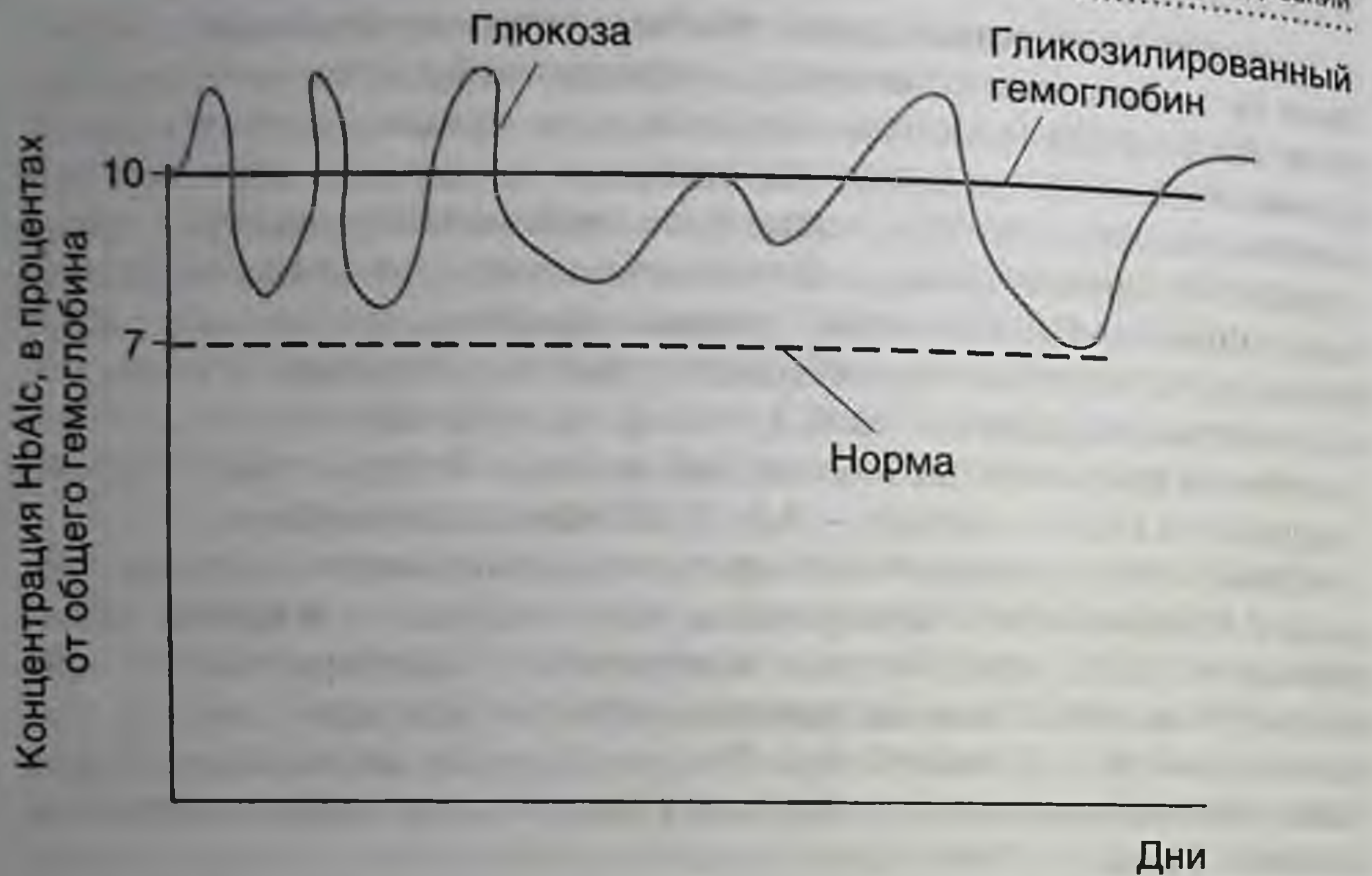


Рис. 12.7. Динамика концентрации глюкозы в крови на протяжении 9 нед. Концентрация глюкозы изменяется между 7 и 12 ммоль/л. Уровень HbA1c в течение всего периода постоянен – 10%

неудовлетворительный уровень. Для оценки эффективности лечения целесообразно повторить исследование через 2–3 мес.

Ложные сниженные значения HbA1c отмечают при уремии, острых и хронических геморрагиях, а также при состояниях с уменьшением длительности жизни эритроцитов (например, при гемолитической анемии).

### 12.4.1.2.3. Критерии диагностики сахарного диабета

Диагноз СД может быть установлен при наличии одного из нижеприведенных критериев:

- HbA1c >6,5%;
- клинические симптомы СД (полиурия, полидипсия и необъяснимая потеря массы тела) и случайно выявленное повышение концентрации глюкозы в плазме крови  $\geq 11,1$  ммоль/л ( $\geq 200$  мг%);
- уровень глюкозы в плазме крови натощак (состояние натощак — отсутствие приема любой пищи в течение не менее 8 ч)  $> 7,1$  ммоль/л ( $> 126$  мг%);
- через 2 ч после нагрузки глюкозой внутрь (75 г глюкозы) —  $\geq 11,1$  ммоль/л ( $\geq 200$  мг%).

Пациенты с уровнем HbA1c  $>6$ , но  $<6,5\%$  имеют высокую вероятность (риск) развития СД.

Диагностические критерии СД и других категорий гипергликемии приведены в табл. 12.10. Для эпидемиологических или скрининговых целей достаточно одного значения уровня глюкозы натощак или 2-часового уровня глюкозы в ходе теста толерантности к глюкозе. Для клинических целей диагноз СД всегда должен быть подтвержден повторным тестированием в последующий день, за исключением случаев несомненной гипергликемии с острой метаболической декомпенсацией или очевидными симптомами.

Диагностическое значение имеют следующие уровни глюкозы плазмы венозной крови натощак (для постановки диагноза рекомендуется использовать только результаты исследования венозной плазмы):

- нормальное содержание глюкозы плазмы крови натощак составляет до  $6,1$  ммоль/л ( $<110$  мг%);
- содержание глюкозы в плазме крови натощак от  $\geq 6,1$  до  $<7,0$  ммоль/л (от  $\geq 110$  до  $<128$  мг%) определяют как нарушенную гликемию натощак;
- уровень гликемии в плазме крови натощак  $>7,0$  ммоль/л ( $>128$  мг%) расценивают как предварительный диагноз СД, который должен быть подтвержден по приведенным выше критериям.

Таблица 12.10. Диагностические критерии сахарного диабета и других категорий гипергликемии

Категория	Концентрация глюкозы, ммоль/л			
	цельная кровь		плазма	
	венозная	капиллярная	венозная	капиллярная
Сахарный диабет: натощак и/или через 120 мин после приема глюкозы	$>6,1$ $>10,0$	$>6,1$ $>11,1$	$>7,0$ $>11,1$	$>7,0$ $>12,2$
Нарушение толерантности к глюкозе: натощак и через 120 мин после приема глю- козы	$<6,1$ $>6,7$ и $<10,0$	$<6,1$ $>7,8$ и $<11,1$	$<7,0$ $>7,8$ и $<11,1$	$<7,0$ $>8,9$ и $<12,2$
Нарушенная гликемия: натощак через 120 мин после приема глюкозы	$>5,6$ и $<6,1$ $<6,7$	$>5,6$ и $<6,1$ $<7,8$	$>6,1$ и $<7,0$ $<7,8$	$>6,1$ и $<7,0$ $<8,9$

При проведении глюкозотолерантного теста важными считаются следующие показатели:

- нормальная толерантность к глюкозе характеризуется содержанием глюкозы в плазме крови через 2 ч после нагрузки глюкозой  $< 7,8$  ммоль/л ( $< 140$  мг%);
- повышение концентрации глюкозы в плазме крови через 2 ч после нагрузки глюкозой —  $\geq 7,8$  ммоль/л ( $\geq 140$  мг%), но ниже  $11,1$  ммоль/л ( $< 200$  мг%), свидетельствует о нарушенной толерантности к глюкозе;
- содержание глюкозы в плазме крови через 2 ч после нагрузки глюкозой внутрь —  $> 11,1$  ммоль/л ( $> 200$  мг%) свидетельствует о предварительном диагнозе СД, который должен быть подтвержден согласно критериям, приведенным выше.

Для получения достоверных результатов анализа плазма во взятой пробе крови должна быть отделена от форменных элементов в течение 60 мин. Если такой возможности нет, то кровь необходимо забирать в моноветт или вакутейнер с ингибитором гликолиза (натрия фторид). ВОЗ рекомендует лабораториям для постановки диагноза СД исследовать концентрацию глюкозы в плазме.

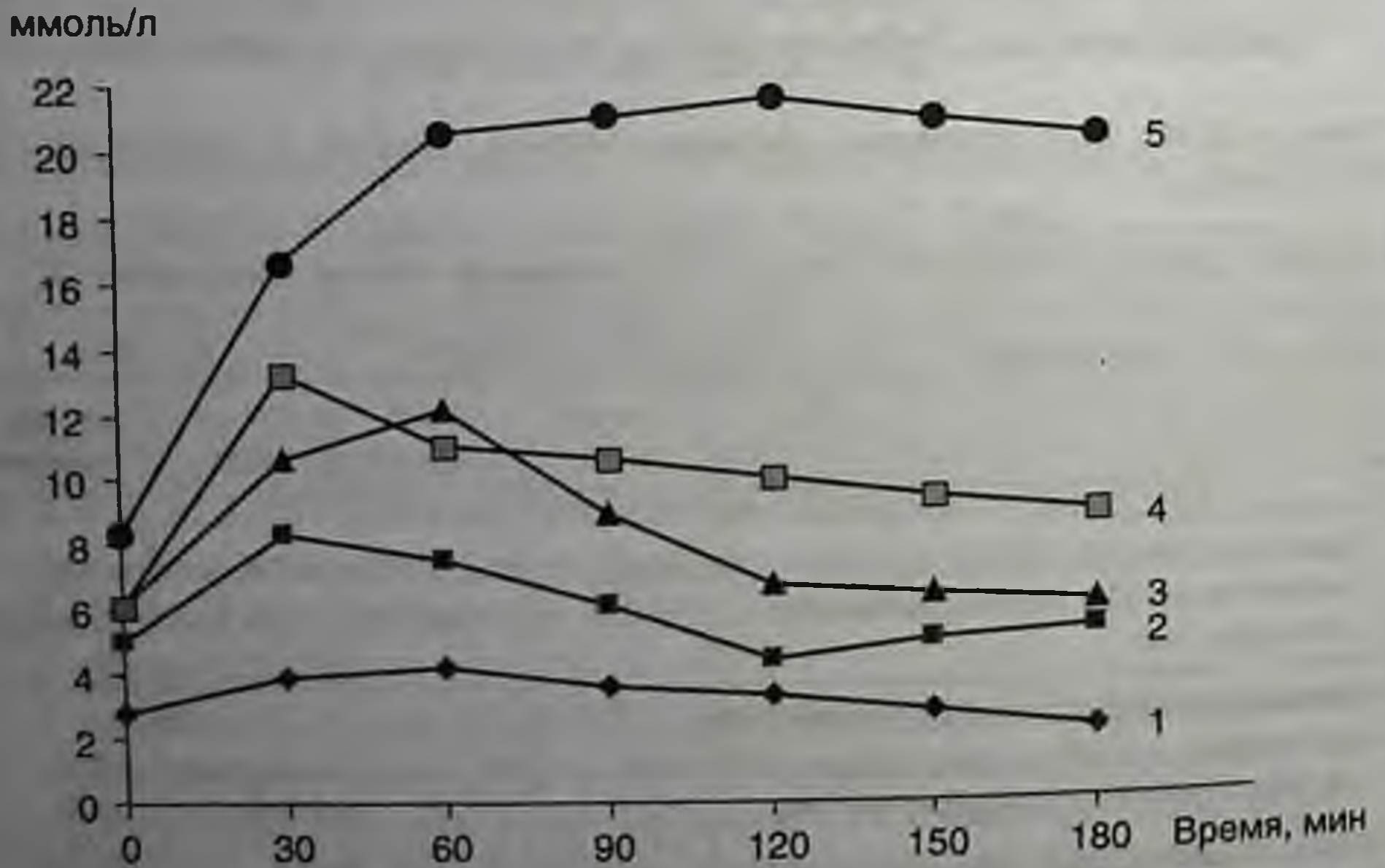


Рис. 12.8. Типы кривых содержания глюкозы в крови при глюкозотолерантном тесте. Изменение концентрации глюкозы: 1 — при гиперинсулинизме; 2 — у здоровых лиц; 3 — при тиреотоксикозе; 4 — при легкой форме сахарного диабета; 5 — при тяжелой форме сахарного диабета

Типы кривых содержания глюкозы в крови при проведении глюкозотолерантного теста приведены на рис. 12.8, а на рис. 12.9 представлен алгоритм диагностики СД.

Для оценки результатов глюкозотолерантного теста вычисляют два коэффициента — гипер- и гипогликемический.

Гипергликемический коэффициент — отношение содержания глюкозы через 30 или 60 мин (берут наибольшую величину) к ее уровню натощак. В норме этот коэффициент не должен быть выше 1,7.

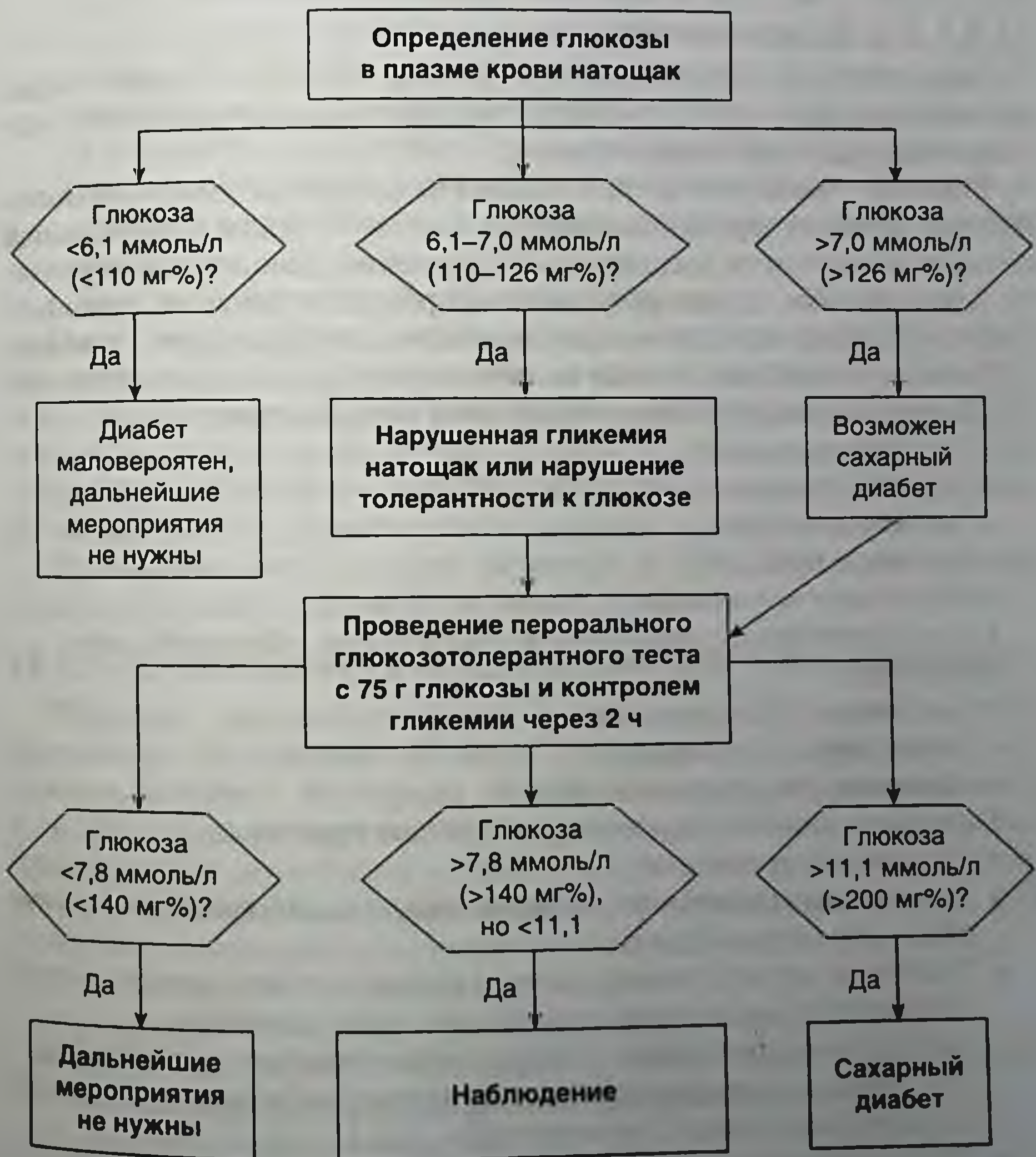


Рис. 12.9. Алгоритм диагностики сахарного диабета (венозная кровь)

Гипогликемический коэффициент — отношение содержания глюкозы через 2 ч к ее уровню натощак. В норме этот коэффициент должен быть менее 1,3.

Если по изложенным выше критериям ВОЗ у больного не находят нарушений толерантности к глюкозе, но величина одного или обоих коэффициентов превышает нормальные величины, кривую нагрузки глюкозой трактуют как сомнительную. Такому пациенту следует рекомендовать воздержаться от злоупотребления углеводами и повторить тест через 1 год.

#### 12.4.1.2.4. Гипогликемия

Гипогликемия развивается при уровне глюкозы в крови ниже 2,2 ммоль/л, но у части пациентов ее симптомы могут наблюдаться и при более высоких концентрациях.

Глюкоза — основной энергетический источник для головного мозга. Именно поэтому функционирование головного мозга в наибольшей степени зависит от ее адекватного поступления. Клинические признаки гипогликемии служат результатом нарушения функции головного мозга и влияния катехоламинов (адреналин, норадреналин), которые выбрасываются в кровь в ответ на понижение концентрации глюкозы. Наиболее яркие клинические проявления гипогликемии:

- чувство голода;
- чувство тревоги;
- заторможенность;
- головная боль;
- спутанность сознания;
- состояние опьянения (неуверенная походка, сбивчивая речь);
- тремор;
- усиленное потоотделение;
- учащенное сердцебиение;
- судороги и потеря сознания.

Гипогликемию могут вызывать следующие причины.

- Длительное голодание.
- Нарушение всасывания углеводов (заболевания желудка и кишечника, демпинг-синдром).
- Хронические заболевания печени вследствие нарушения синтеза гликогена и уменьшения печеночного депо углеводов.
- Заболевания, связанные с нарушением секреции контринсулярных гормонов (гипопитуитаризм, хроническая недостаточность коры надпочечников, гипотиреоз).
- Передозировка или неоправданное назначение препаратов инсулина и противодиабетических внутрь. У больных СД, получаю-

щих инсулин, наиболее тяжелые гипогликемические состояния, вплоть до гипогликемической комы, обычно развиваются при нарушении режима питания — пропуске приема пищи, а также рвоте после еды.

- Легкие гипогликемические состояния могут быть при заболеваниях, протекающих с так называемой функциональной гиперинсулинемией: ожирении, СД типа 2 легкой степени. Для последнего характерны чередование эпизодов умеренной гипергликемии и небольшой гипогликемии через 3–4 ч после приема пищи, когда развивается максимальный эффект инсулина, секретиремого в ответ на алиментарную нагрузку.
- Наиболее тяжелые гипогликемии (за исключением случаев передозировки инсулина) наблюдаются при гиперинсулинизме у пациентов с инсулиномой или гиперплазией  $\beta$ -клеток островков поджелудочной железы. В некоторых случаях содержание глюкозы в крови больных гиперинсулинизмом составляет менее 1 ммоль/л.
- Спонтанные гипогликемии при саркоидозе.

Самая частая причина гипогликемии — передозировка инсулина. Такая гипогликемия может возникать в отсутствие приема пищи после инъекции инсулина. Кроме того, физическая нагрузка у больных СД приводит к понижению уровня глюкозы в крови, поэтому пациент нуждается в меньшей дозе инсулина. Введение его в прежней дозировке может приводить к развитию гипогликемии.

Без лечения гипогликемия переходит в кому. Это потенциально угрожающее жизни больного состояние.

#### 12.4.1.2.5. Осложнения сахарного диабета и их мониторинг

Наиболее распространенные осложнения СД — сосудистые поражения, получившие название диабетических ангиопатий. Это понятие включает поражение крупных артерий (макроангиопатии) и мелких сосудов: капилляров, венул, артериол (микроангиопатии). Диабетические ангиопатии служат основной причиной инвалидизации и в большинстве случаев определяют прогноз для больных СД.

Различают следующие виды диабетических ангиопатий:

- ишемическая болезнь сердца (ИБС);
- нарушения мозгового кровообращения;
- облитерирующие атеросклероз артерий нижних конечностей и сосудистые поражения других локализаций;
- диабетическая нефропатия;
- диабетическая ретинопатия.

Поражение коронарных, церебральных и периферических сосудов представляет собой основу макрососудистых осложнений СД 1-го и 2-го типа. Диабетические макроангиопатии по своему механизму развития являются атеросклеротическими. Атеросклероз у больных СД протекает более тяжело, имеет большую распространенность и возникает в более молодом возрасте.

Атеросклероз коронарных сосудов и, как следствие, ИБС служат ведущей причиной высокой смертности больных СД. Частота развития ИБС у страдающих СД мужчин в 2 раза, а у женщин — в 3 раза превышает частоту ИБС в общей популяции.

Облитерирующий атеросклероз артерий нижних конечностей — второе по клинической значимости проявление диабетических макроангиопатий. У больных СД его наблюдают значительно раньше (с 20 лет), он служит непосредственной причиной смерти у 9,9% больных.

Атеросклероз мозговых артерий у больных СД начинается рано и быстро прогрессирует.

Частота развития диабетической нефропатии у больных СД 1-го типа колеблется от 40 до 50%, 2-го типа — от 15 до 30%. Опасность этого осложнения в том, что оно развивается медленно и постепенно, поэтому диабетическое поражение почек долгое время остается незамеченным. Наиболее ранним критерием развития диабетической нефропатии (до появления протеинурии) служит микроальбуминурия (повышенный уровень альбумина в моче).

Диабетический кетоацидоз — одно из наиболее острых и тяжелых осложнений СД. В основе развития кетоацидоза и кетоацидотической комы лежит, с одной стороны, нарастающий дефицит инсулина, с другой — резкая активация контринсулярных гормонов (глюкагона, СТГ, кортизола, катехоламинов).

В отсутствие инсулина глюкоза не может проникать в клетки различных тканей, кроме мозга и печени, и, следовательно, требуется другой источник энергии для выживания. Таким альтернативным источником служат жиры (триглицериды), хранящиеся в клетках жировой ткани. Многие из симптомов кетоацидоза являются результатом мобилизации жиров для обеспечения энергетических потребностей клеток в отсутствие глюкозы.

В результате расщепления триглицеридов (липолиз) в жировой ткани образуется много жирных кислот, которые поступают в кровь и транспортируются к органам и тканям. В печени и тканях жирные кислоты окисляются с получением молекул АТФ. При диабетическом кетоацидозе липолиз усиливается настолько, что кровь и печень буквально заполнены липидами. Вызванное дефицитом инсулина



энергетическое клеточное голодание приводит к повышению активности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (стрессу), в результате чего увеличивается секреция гормонов (адреналин, кортизол), обладающих жиромобилизующим действием, что еще больше увеличивает поступление жирных кислот в кровоток. В результате окисления жирных кислот в избытке образуются и накапливаются в крови токсичные продукты — прежде всего D-3-гидроксибутират, ацетоуксусная кислота, ацетон, которые называют кетоновыми телами. Все они являются обычными продуктами обмена жиров, в норме метаболизирующимися дальше и не оказывающими токсического действия на органы и ткани. При диабетическом кетоацидозе, однако, кетоновые тела накапливаются в избыточном количестве в крови и выводятся с мочой. Часть избыточного ацетона выводится через легкие, поэтому его запах может чувствоваться в воздухе, выдыхаемом больным СД. Накапливаемые в тканях и крови кетокислоты (ацетоуксусная кислота), кроме прямого токсического действия, приводят к изменению рН крови и развитию метаболического ацидоза.

Основным механизмом компенсации метаболического ацидоза служит усиление дыхания (гипервентиляция) для максимального удаления углекислого газа (угольная кислота) из крови, что позволяет поддерживать нормальное значение рН крови. У больных диабетическим кетоацидозом гипервентиляция проявляется в виде глубокого дыхания (дыхание Куссмауля).

Вследствие гипергликемии увеличивается осмотическое давление во внеклеточной жидкости и развивается внутриклеточная дегидратация, так как вода и клеточные электролиты (калий, фосфор и др.) поступают из клеток в межклеточное пространство. Одновременно с нарушениями КОС при диабетическом кетоацидозе развивается водно-электролитный дисбаланс. Когда гипергликемия превышает почечный порог для глюкозы, наступает осмотический диурез, в результате чего происходит интенсивная потеря жидкости и электролитов, что ведет к дегидратации и гиповолемии с развитием сердечно-сосудистой и почечной недостаточности. При кетоацидотической коме содержание глюкозы в крови нередко превышает 30,6 ммоль/л, достигая 55,5 и даже 111 ммоль/л (2000 мг%). При этом имеется четкая корреляция между уровнем гликемии и наличием комы. Решающее значение в диагностике кетоацидоза имеет определение в крови концентрации глюкозы и кетоновых тел в моче.

В заключение необходимо отметить, что, кроме классических симптомов гипергликемии (глюкозурия, полиурия, жажда, полидипсия и дегидратация), у больных диабетическим кетоацидозом выявляют:

- повышенный уровень кетоновых тел в крови и моче (кетонемия и кетонурия);
- запах ацетона при дыхании;
- метаболический ацидоз (низкий уровень рН крови);
- гипервентиляцию (дыхание Куссмауля);
- гипотензию вследствие существенного нарушения водно-электролитного баланса (потеря калия и натрия с мочой) и рвоты.

#### **Кетоновые тела в моче**

К кетоновым телам относят D-3-гидроксибутират, ацетоуксусную кислоту и ацетон, которые в избытке образуются при диабетическом кетоацидозе в крови и выводятся с мочой. В норме кетоновые тела в моче отсутствуют.

Наиболее частая причина кетонурии — выраженная декомпенсация СД 1-го типа, а также длительно протекающий СД 2-го типа при истощении  $\beta$ -клеток поджелудочной железы и развитии абсолютной инсулиновой недостаточности. Резко выраженную кетонурию отмечают при гиперкетонемической диабетической коме.

У больных СД мониторинг кетонурии используют для контроля правильности подбора пищевого режима: если количество вводимых жиров не соответствует количеству усваиваемых углеводов, то кетонурия увеличивается. При уменьшении введения углеводов (лечение без инсулина) и обычном количестве жиров начинает выделяться ацетон. При лечении инсулином снижения глюкозурии достигают лучшим усвоением углеводов, что не сопровождается кетонурией.

#### **Альбумин в моче (микроальбуминурия)**

Микроальбуминурия — экскреция альбумина с мочой, превышающая допустимые нормальные значения, но не достигающая степени протеинурии. В норме экскретируется не более 30 мг/сут альбумина, что эквивалентно концентрации альбумина в моче менее 20 мг/л при ее разовом анализе. При появлении протеинурии экскреция альбумина с мочой превышает 300 мг/сут. Именно поэтому диапазон колебаний концентрации альбумина в моче при микроальбуминурии составляет от 30 до 300 мг/сут или от 20 до 200 мкг/мин (табл. 12.11). Появление у больного СД постоянной микроальбуминурии свидетельствует о вероятном развитии (в течение ближайших 5–7 лет) выраженной стадии диабетической нефропатии.

Исследование на микроальбуминурию используют для скрининга поражения почек и необходимости лечения диабетической нефропатии. Своевременное начало лечения нефропатии существенно снижает затраты и улучшает прогноз в отношении развития почечной недостаточности.

Таблица 12.11. Классификация видов альбуминурии

Вид альбуминурии	Экскреция альбумина с мочой		Концентрация альбумина в моче, мг/л
	при однократном сборе мочи, мкг/мин	за сутки, мг	
Нормоальбуминурия	<20	<30	<20
Микроальбуминурия	20–200	30–300	20–200
Макроальбуминурия	>200	>300	>200

#### 12.4.1.2.6. Мониторинг глюкозы в крови самим пациентом

Важнейшей составляющей адекватного лечения больных инсулинозависимым СД 1-го и 2-го типа является поддержание уровня глюкозы в крови как можно ближе к норме. Основная трудность в проведении инсулинотерапии связана с вероятностью развития гипогликемии при необходимости снижения уровня глюкозы в крови. Хороший контроль СД подразумевает поддержание уровня глюкозы в крови не ниже 4,4 и не выше 10,0 ммоль/л. Нормализация уровня глюкозы в крови не только предупреждает развитие основных симптомов СД (дегидратация, полиурия, жажда, кетоацидоз, эпизоды гипогликемии), но и существенно снижает риск развития отдаленных осложнений — заболеваний почек (диабетическая нефропатия), расстройств нервной системы (диабетическая нейропатия) и нарушений зрения (диабетическая ретинопатия). В связи с этим больные СД, особенно те, кому необходима инсулинотерапия, должны регулярно, в том числе и сами, следить за уровнем глюкозы в крови. Для проведения регулярного мониторинга уровня глюкозы в крови пациенты используют диагностические тест-полоски и портативные глюкометры.

Специалисты лаборатории часто контактируют с такими больными. Нередко у них возникает ряд вопросов, связанных с правильным проведением измерения глюкозы в крови и контролем работы глюкометров. Приведенная ниже информация будет полезна для специалистов лаборатории и позволит им правильно проконсультировать пациентов по возникшим проблемам.

В настоящее время существует разнообразное количество диагностических тест-полосок и портативных глюкометров. Время исследования составляет 1–2 мин, и для определения глюкозы достаточно одной капли капиллярной крови. В основе всех тестов лежит один принцип. Каплю крови помещают на реагентную зону тест-полоски, которая пропитана цветочувствительными реактивами. Изменение цвета реагентной зоны тест-полоски — результат реакции между глюкозой, присутствующей в исследуемой крови, и реактивами, иммо-

близованными на полоске. Степень изменения цвета реакгентной зоны определяется уровнем глюкозы в крови. Результаты можно оценивать двумя способами. При первом способе сравнивают получившуюся в результате реакции окраску реакгентной зоны с прилагаемой цветной шкалой и визуально определяют концентрацию глюкозы. При втором способе тест-полоску помещают в глюкометр, который измеряет интенсивность развившейся окраски и обеспечивает, таким образом, определение уровня глюкозы в крови. Использование глюкометров позволяет получить более точные результаты анализа. Выработанный навык нанесения крови на тест-полоску и правильная работа глюкометра — необходимые условия получения достоверных результатов.

**При использовании глюкометров необходимо соблюдать приведенные ниже правила.**

- Кровь на анализ следует брать из сухого чистого пальца или мочки уха.
- Кровь после прокола должна капать на тест-полоску свободно, так как при сжимании пальца получаются заниженные результаты. Для стимуляции тока крови палец можно растереть или согреть.
- При нанесении капли крови на реакгентную зону тест-полоски необходимо точно следовать прилагаемой инструкции. Различные фирмы-производители глюкометров и тест-полосок используют тонкие модификации метода, поэтому даже нюансы в нанесении капли крови на полоску могут существенно сказаться на результате измерения.
- Необходимо очень точно соблюдать время реакции, которое начинается сразу после того, как капля крови соприкасается с реакгентной зоной полоски. Если время реакции увеличивается, могут быть получены ложновысокие результаты, если уменьшается — ложнонизкие.
- Реактивы, нанесенные на реакгентную зону, могут инактивироваться, поэтому их надо хранить в соответствии с прилагаемой инструкцией. Нельзя использовать тест-полоски с истекшим сроком годности, который указан на упаковке.
- Портативный глюкометр требует контроля своей работы. Главное — правильная калибровка прибора. В зависимости от его марки это может быть калибровка глюкометра с использованием раствора глюкозы определенной концентрации (необходимо следить за его сроком годности). Некоторые глюкометры имеют внутреннюю калибровку. Тем не менее все виды глюкометров необходимо регулярно (через определенный промежуток вре-

мени) тестировать, используя внешний стандартный раствор. Проведение такого тестирования позволяет проверить качество прибора и обеспечивает получение надежных результатов определения концентрации глюкозы крови больного. Обычно тестированием глюкометров занимаются КДЛ.

Специалисты лаборатории должны знать, что все существующие в настоящее время глюкометры не могут обеспечить точность измерения концентрации глюкозы с достаточной аналитической надежностью. Именно поэтому для диагностики СД у пациентов с повышенным риском развития заболевания концентрацию глюкозы в крови необходимо исследовать в лицензированной КДЛ.

Портативные глюкометры с тест-полосками можно применять для установления факта гипергликемии, тяжелой гипогликемии, а также для мониторинга содержания глюкозы в крови у пациентов с установленным диагнозом СД.

Глюкометры рекомендуют использовать всем пациентам, получающим инсулин. Пациенты с СД 1-го типа должны измерять концентрацию глюкозы крови по крайней мере 3 раза в день. Эффективность применения глюкометров у пациентов с СД 2-го типа, не получающих инсулин, не установлена.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ

1. Назовите основные группы углеводов, которые присутствуют в организме человека.
2. Каким обменным превращениям подвергается глюкоза в организме человека?
3. Назовите клетки, которые служат основными депо глюкозы в организме человека.
4. Какие гормоны участвуют в регуляции уровня глюкозы в организме человека?
5. Где синтезируется инсулин и какова его основная функция?
6. Какие значения концентрации глюкозы крови указывают на гипергликемию?
7. Что такое гипогликемия?
8. Что такое гликозилированный гемоглобин?
9. Что такое глюкозотолерантный тест и как его проводят?
10. Перечислите основные клинические проявления сахарного диабета.
11. Назовите критерии диагностики сахарного диабета.
12. Что собой представляют кетоновые тела?
13. Перечислите основные осложнения сахарного диабета.
14. Для чего применяют тест на микроальбуминурию?

## 12.4.2. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ГЛЮКОЗЫ И МЕТАБОЛИТОВ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА

Более 90% всех растворимых низкомолекулярных углеводов в крови приходится на глюкозу, поэтому ее концентрация в крови в большинстве случаев служит «зеркалом», объективно отражающим состояние углеводного обмена у пациента в день обследования. Практически аналогичную функцию выполняет гликозилированный гемоглобин, но, в отличие от глюкозы, он служит интегральным показателем состояния углеводного обмена за более продолжительный отрезок времени — 2–3 мес. Существует множество методов определения концентрации глюкозы и гликозилированного гемоглобина в крови. Необходимо использовать только те, которые соответствуют современным требованиям доказательной медицины.

### 12.4.2.1. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ГЛЮКОЗЫ

Использование правильного метода определения концентрации глюкозы в крови — важнейшее условие диагностики СД и нарушений углеводного обмена. Согласно принципам доказательной медицины, чтобы результаты определения концентрации глюкозы в крови можно было использовать в диагностических целях, необходимо следующее.

- Концентрацию глюкозы в крови необходимо определять в лицензированной КДЛ.
- Для получения достоверных результатов анализа плазма во взятой пробе крови должна быть отделена от форменных элементов в течение 60 мин. Если такой возможности нет, то кровь необходимо забирать в вакутейнер с ингибитором гликолиза (натрия фторид).
- КДЛ должны использовать для определения концентрации глюкозы в крови методы, имеющие аналитическую вариацию не более 2,9% (0,20 от 7,0 ммоль/л). Данным требованиям отвечают три метода:
  - ▶ глюкозооксидазный;
  - ▶ глюкозогексокиназный;
  - ▶ глюкозодегидрогеназный.
- Общая неточность определения концентрации глюкозы должна быть  $\leq 6,9\%$ .

**Глюкозооксидазный метод** — самый распространенный в практике лабораторий. Принцип его в том, что глюкозооксидаза окисляет глюкозу с образованием перекиси водорода. При этом в ходе реакции перекись образуется в эквимольных количествах, то есть концентрация

образовавшейся перекиси водорода равна определяемой концентрации глюкозы. В зависимости от способа регистрации образовавшейся перекиси водорода глюкозооксидазный метод подразделяют на:

- фотометрический по конечной точке;
- фотометрический кинетический;
- отражательная фотометрия — сухая химия;
- электрохимический.

Среди вышеперечисленных способов регистрации наибольшее распространение получил фотометрический метод, в котором молекулы перекиси водорода под действием фермента пероксидазы расщепляются с образованием активной формы кислорода — супероксид анион-радикала —  $O_2^-$ , который, в свою очередь, окисляет хромоген (красящее вещество, вносимое в реакционную смесь), что приводит к значительному изменению интенсивности окраски хромогена. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации глюкозы. Таким образом, последовательность специфических реакций следующая:

- [глюкоза +  $O_2$ ] (глюкозооксидаза→) [глюконолактон +  $H_2O_2$ ];
- [хромогенный субстрат +  $H_2O_2$ ] (пероксидаза→) [хромогенный субстрат окисленный +  $H_2O$ ].

В качестве хромогенного субстрата используют орто-толидин или ортодианизидин (химические вещества, принимающие различную окраску при действии окислителей: желто-оранжевую в кислой среде, синюю в слабокислой).

Наряду с методом фотометрирования по конечной точке используют кинетический. Суть метода в том, что при определенном соотношении активностей глюкозооксидазы и пероксидазы скорость образования окрашенного соединения некоторое время после внесения пробы в рабочий раствор будет пропорциональна концентрации глюкозы в пробе. Преимущество такого метода в том, что результат не зависит от наличия в пробе других соединений, так как поглощение последних стабильно во времени. Этот метод требует применения кинетического фотометра, полуавтоматических или автоматических биохимических анализаторов для регистрации результатов исследования.

Регистрацию результатов глюкозооксидазного метода измерения концентрации глюкозы в крови можно осуществлять с помощью анализаторов, работа которых основана на амперометрическом принципе измерения при помощи специальных ферментных датчиков. Перекись водорода, которая образуется при окислении глюкозы кислородом под действием глюкозооксидазы, является крайне нестабильным химическим соединением, и она может служить источником заряженных частиц (супероксид анион-радикал кислорода). Именно это и исполь-

зуют в ферментных датчиках мембранного типа или электрохимических элементах в портативных анализаторах глюкозы.

В измерительной ячейке анализатора глюкозы, сконструированной как проточная, находится измерительная камера, с одной стороны ограниченная ферментной мембраной. На мембрану толщиной около 60 мк специальным образом сорбирована глюкозооксидаза. С другой стороны мембраны к ней прижимается платиновый электрод. Проба цельной крови (обычно 20 мкл) разводится в системном буферном растворе (эритроциты при этом разрушаются), после чего подается по трубке в проточную ячейку. Глюкоза, содержащаяся в пробе крови, подвергается окислению под воздействием фермента глюкозооксидазы, находящейся на мембране. Образовавшаяся перекись водорода диффундирует через мембрану и окисляется далее в каталитической реакции под действием платины. Диффузия перекиси водорода на поверхность платины формирует ток, пропорциональный числу молекул  $H_2O_2$ . Полученный таким образом сигнал обрабатывается прибором в соответствующее значение напряжения. Это измеренное значение пропорционально концентрации глюкозы в пробе (рис. 12.10).

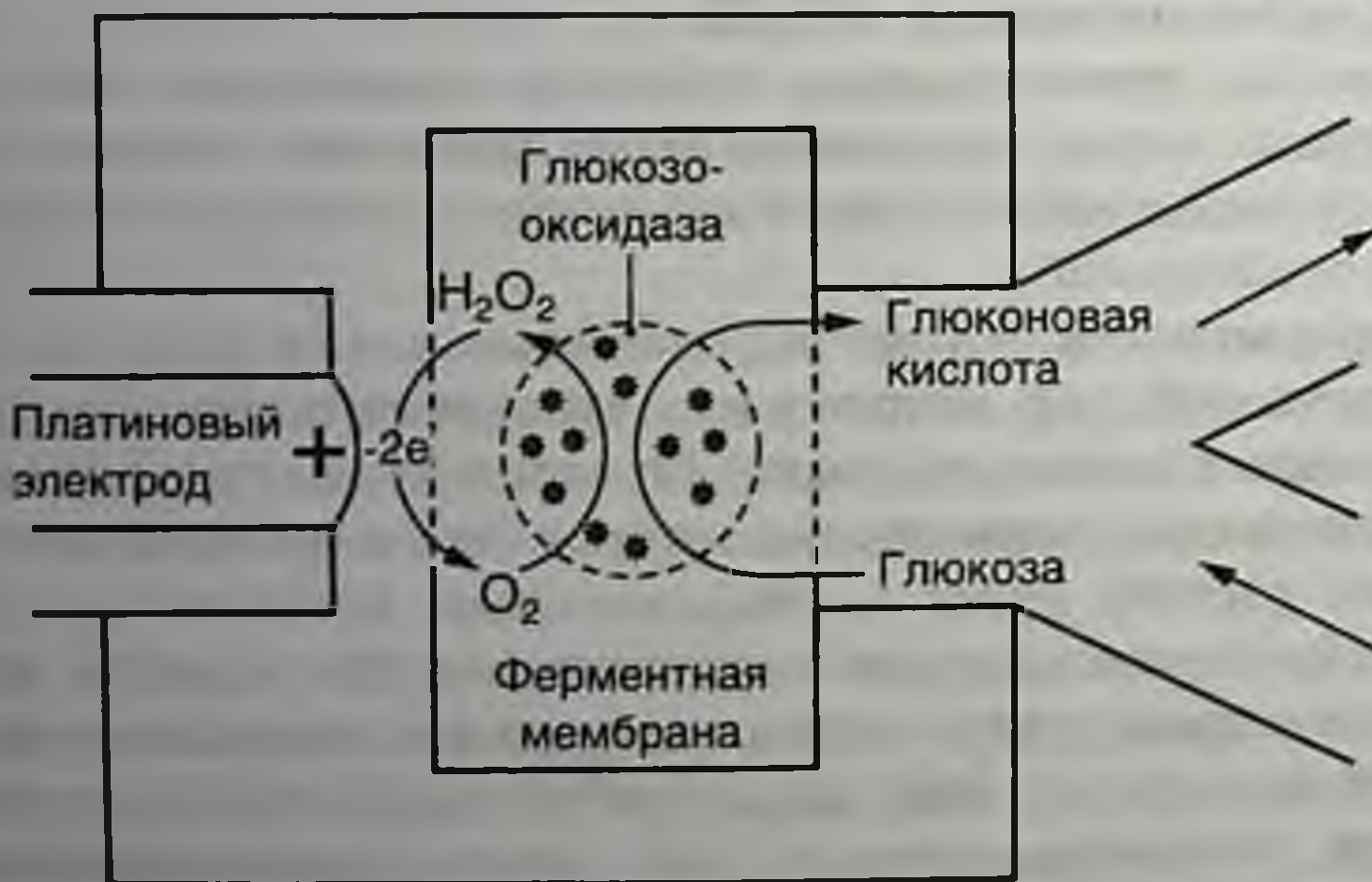


Рис. 12.10. Измерительная ячейка

Данный метод определения концентрации глюкозы реализован в анализаторах глюкозы ЭКСАН (Латвия), БИОСЕН 5030/5040 (Германия) и отечественном АГКМ-01 (рис. 12.11).

В методах «сухой» химии используют тест-полоски и отражательные фотометры. Они уступают по точности всем вышеописанным методам определения концентрации глюкозы, в их отношении невозможно осуществить процедуры внутрилабораторного контроля качества (ВКК),



поэтому они получили название «глюкометры», а не «анализаторы глюкозы».

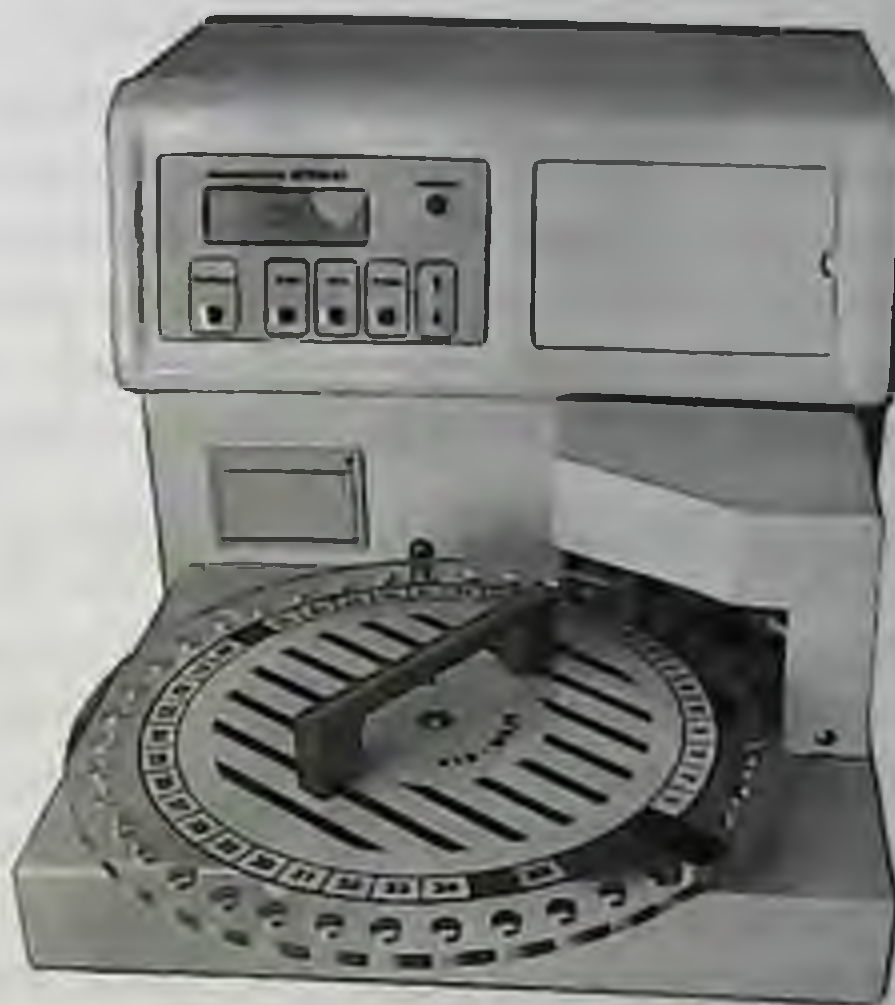


Рис. 12.11. Анализатор глюкозы АГКМ-01

**Глюкозогексокиназный (гексокиназный) метод** определения концентрации глюкозы также состоит из двух последовательных реакций: сначала глюкоза фосфорилируется за счет АТФ благодаря действию гексокиназы; образовавшийся глюкозо-6-фосфатный эфир в присутствии глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы восстанавливает НАД, количество которого определяется по увеличению светопоглощения в УФ-области:

- [глюкоза + АТФ] (гексокиназа→) [глюкоза-6-фосфат + АДФ];
- [глюкоза-6-фосфат + НАД<sup>+</sup>] (глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа→) [6-фосфат-глюконат + НАДН + Н<sup>+</sup>].

Результаты реакций регистрируют при 340 нм по образованию НАДН. Этот метод высокоспецифичный и не дает реакции с другими компонентами сыворотки крови.

Аналогично глюкозооксидазному гексокиназный метод в зависимости от способа регистрации НАДН подразделяют на фотометрический:

- по конечной точке;
- кинетический.

**Глюкозодегидрогеназный метод** определения концентрации глюкозы. В нем используют фермент глюкозодегидрогеназу совместно с кофактором флавинадениндинуклеотидом (ФАД) или пирролохинолинохиноном (ПХХ), который выполняет роль акцепторов электронов. Глюкозодегидрогеназа переносит электроны с глюкозы на эти окислительные субстраты (рис. 12.12).

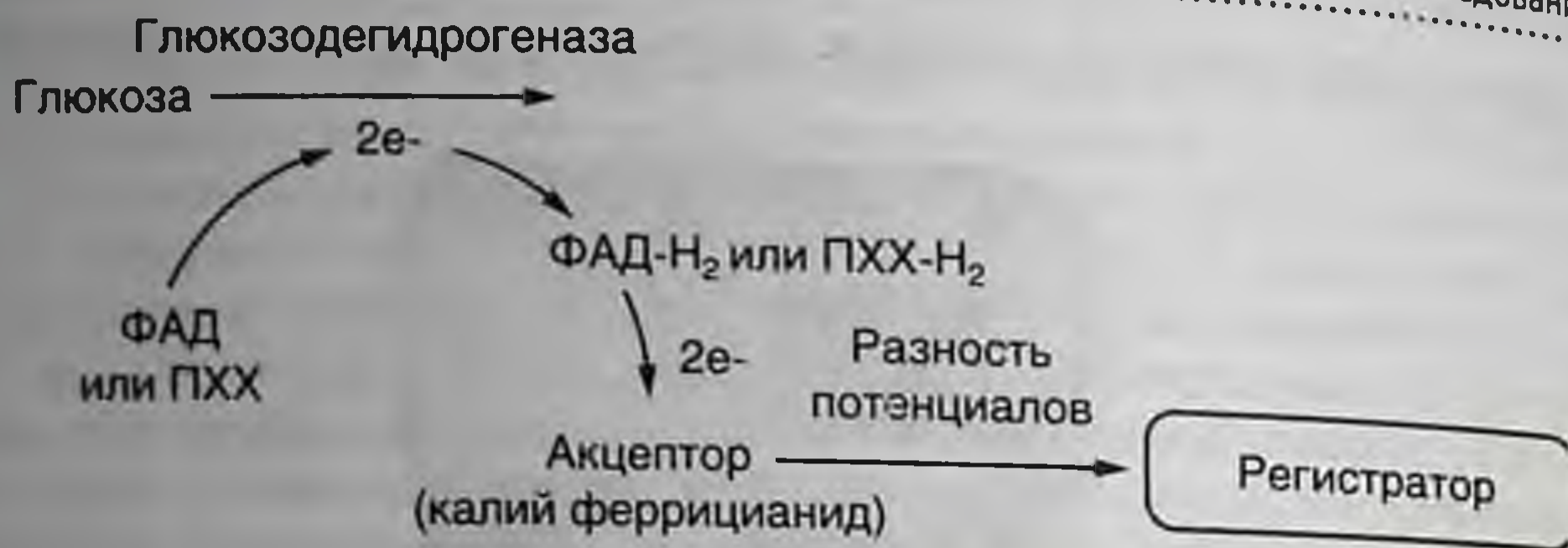


Рис. 12.12. Глюкозодегидрогеназный метод определения концентрации глюкозы (схема)

Глюкозодегидрогеназный метод сходен с глюкозооксидазным, но электроны от ФАД- $N_2$  или ПХХ- $N_2$  переносятся не на кислород, а на другой вторичный окислитель или акцептор (например, калий феррицианид), и перекись водорода не образуется. Именно поэтому для детекции конечных продуктов реакции применяют не фотометрический, а электрохимический (амперометрический или вольтамперометрический) способ.

#### 12.4.2.2. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ГЛИКОЗИЛИРОВАННОГО ГЕМОГЛОБИНА

Основной фракцией гемоглобина в крови служит гемоглобин А1 (HbA1), и именно он преимущественно подвержен гликозилированию. На его долю приходится 60–80% всего количества гликозилированного гемоглобина. Однако в крови взрослого человека присутствует 2–3% гемоглобина А2 (HbA2), который также подвержен гликозилированию с образованием HbA2c и может повышать результаты определения гликозилированного гемоглобина — HbA1c. Эти особенности гликозилирования важны для специалистов лаборатории при выборе метода определения HbA1c.

Для определения гликозилированного гемоглобина в крови в КДЛ используют следующие методы.

- Ионообменная высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) — референтный метод, при помощи которого определяют отдельно HbA1c, HbA1a, HbA1b. Содержание отдельной фракции пропорционально площади соответствующего пика.
- Катион-обменная хроматография (измеряет HbA1c) — разделение достигается за счет использования различий в ионных взаимодействиях группы катионообменной поверхности смолы в колонке с компонентами гемоглобина в образце.

- Аффинная хроматография (измеряет общий гликозилированный гемоглобин) — борная кислота реагирует с цис-диол-группой глюкозы, связанной с гемоглобином; негликированный гемоглобин не связывается в колонке и вымывается первым.
- Иммунный анализ (измеряет HbA1c) — агглютинация покрытых моноклональными антителами латексных частиц (иммунотурбидиметрия) — HbA1c в образце реагирует с антителами: измеряется снижение мутности. Данный метод используют в современных биохимических анализаторах.

Из рис. 12.13 видно, что при использовании в КДЛ метода аффинной хроматографии для определения уровня HbA1c у пациента можно получить завышенные результаты вследствие интерференции, обусловленной другими вариантами гемоглобина А.

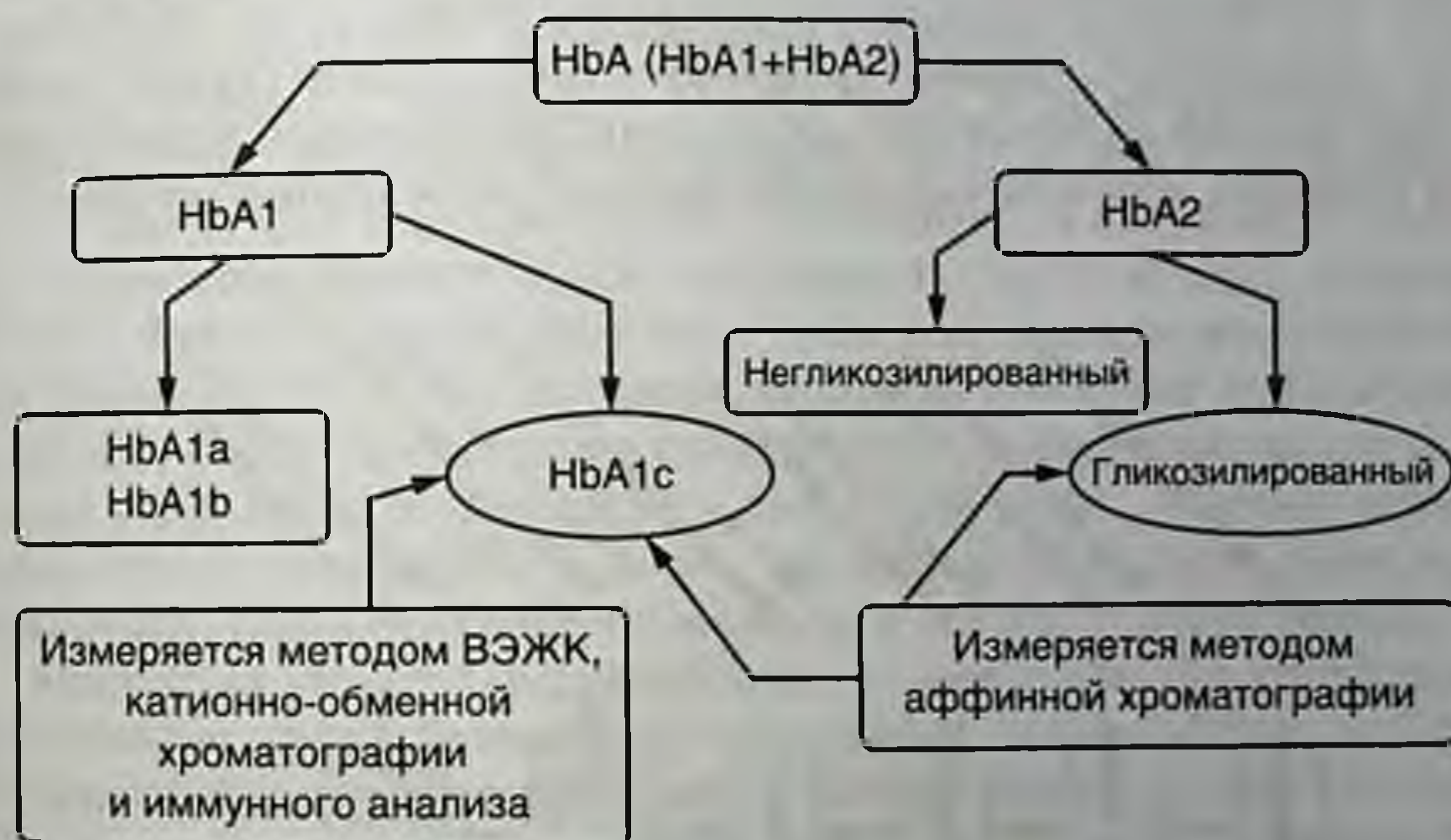


Рис. 12.13. Возможности методов по определению гликозилированного гемоглобина

Еще одна характеристика, о которой должен знать специалист лаборатории, — точность метода, степень близости результата измерений к принятому опорному значению. В настоящее время понятие «точность» в лабораторной диагностике заменено понятием «смещение» (неправильность метода измерений) — систематическая погрешность в показаниях метода измерения. На примере определения уровня HbA1c методы, используемые в КДЛ, должны иметь смещение  $\pm 0,75\%$  в диапазоне 4–10% для HbA1c. Если смещение для метода превышает указанные значения, то метод в КДЛ, используемый для определения уровня HbA1c, необходимо заменить.

В настоящее время выпускают множество моделей анализаторов, предназначенных только для определения HbA<sub>1c</sub>. Необходимо отдавать предпочтение тем из них, которые используют в своей работе метод ВЭЖХ. Такие анализаторы осуществляют автоматизацию процесса приготовления образцов из цельной крови путем добавления реактивов, внесения приготовленных образцов на хроматографическую колонку (картридж), экспозицию, разделение гемоглобина методом ВЭЖХ, получение фракций гемоглобина и фотометрическое их определение (измерение). Анализатор создает градиент концентрации за счет изменения скорости подачи буферов на хроматографическую колонку, благодаря чему происходит разделение различных фракций гемоглобина (A<sub>1c</sub>, A<sub>1a</sub>, A<sub>1b</sub>, A<sub>2</sub>, F) на ионообменной смоле колонки, затем осуществляется их регистрация путем фотометрии при длине волны 415 нм. Схема анализа представлена на рис. 12.14. Сам анализатор определения гликозилированного гемоглобина служит только частью сложной диагностической системы, включающей диагностические реагенты, хроматографическую колонку и расходные материалы.

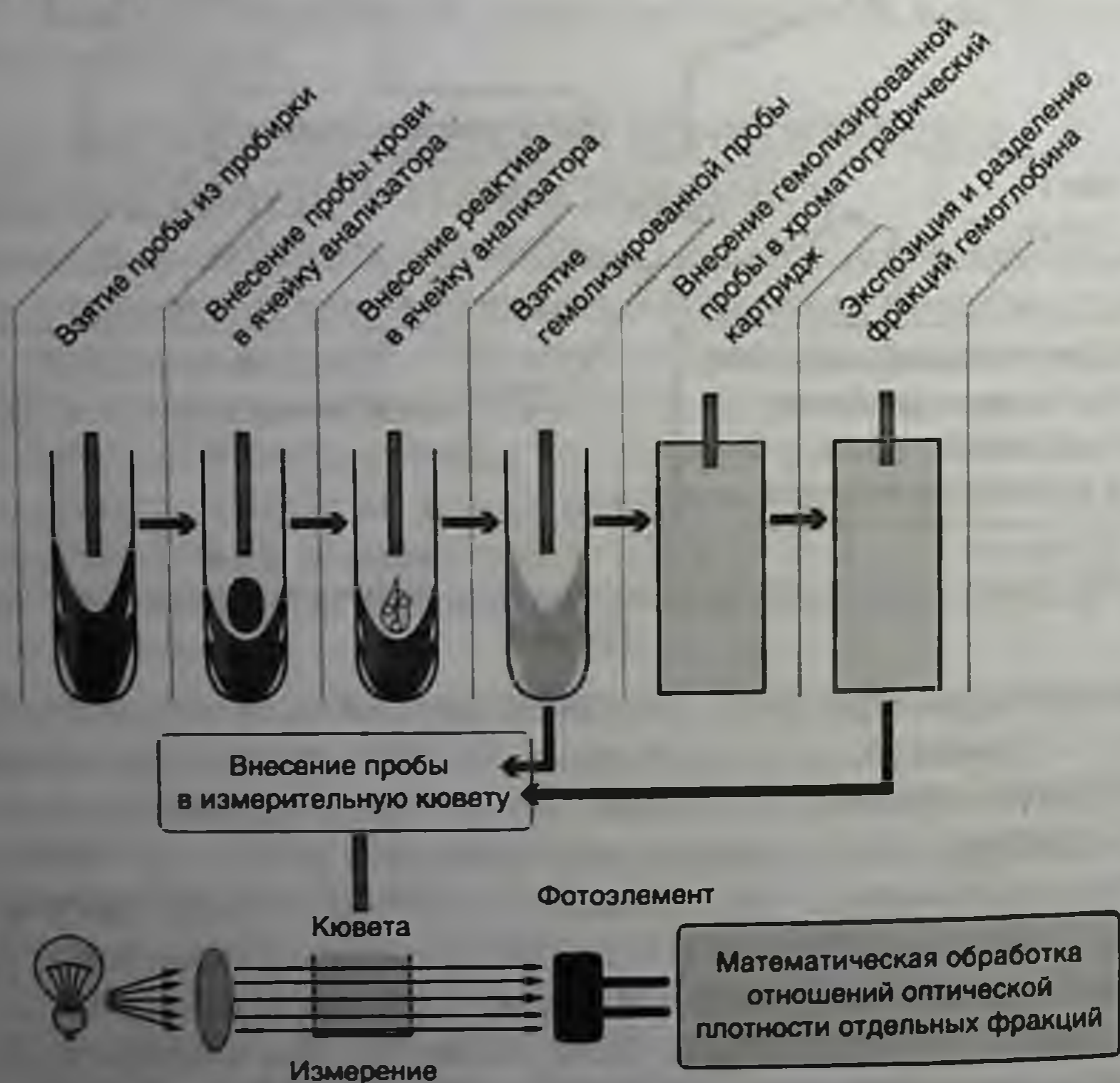


Рис. 12.14. Ход определения гликозилированного гемоглобина

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ

1. Какие методы определения глюкозы можно применять в практике лабораторий?
2. Какой аналитической вариацией и общей неточностью должны обладать методы определения глюкозы для их использования в лаборатории?
3. Перечислите методы определения гликозилированного гемоглобина.

## 12.5. ХОЛЕСТЕРИН, ТРИГЛИЦЕРИДЫ И ЛИПОПРОТЕИНЫ

Липиды в плазме крови представлены в основном жирными кислотами, триглицеридами, холестерином и фосфолипидами. Они поступают в организм человека в составе мяса и молочных продуктов. Холестерином особенно богаты куриные яйца. Кроме того, триглицериды, холестерин и фосфолипиды синтезируются в организме человека. Холестерин синтезируется преимущественно в печени, триглицериды — в печени и жировой ткани. Треть холестерина, который нужен организму человека, он получает с пищей, две трети синтезируется в печени. Синтез холестерина стимулируют насыщенные жиры, а они также содержатся в животной и молочной пище. Именно поэтому пища, если она содержит жиры, не только поставляет холестерин в организм, но и стимулирует его синтез в печени и других тканях.

Поскольку липиды нерастворимы в воде, они транспортируются в плазме крови (водно-солевой раствор) в комплексе с белками. Основным переносчиком свободных жирных кислот служит альбумин, в то время как триглицериды и холестерин циркулируют в составе белковых комплексов, известных под названием «липопротеины».

В клинической практике исследования липидов (триглицеридов и холестерина) и липопротеинов используют для оценки риска развития ИБС. В настоящее время достоверно установлено, что чем выше в крови уровень триглицеридов и холестерина, тем выше риск возникновения ИБС. Эти тесты имеют также большое значение для определения стратегии лечения ИБС и оценки его эффективности.

### 12.5.1. ФУНКЦИИ ХОЛЕСТЕРИНА, ТРИГЛИЦЕРИДОВ И ЛИПОПРОТЕИНОВ

Главнейшее значение холестерина и триглицеридов в организме человека в том, что они незаменимые компоненты клеточных мембран.

Холестерин также служит исходным материалом при биосинтезе стероидных гормонов (кортизола в надпочечниках, прогестерона в яичниках, тестостерона в яичках). В коже из модифицированного холестерина образуется витамин D. В печени холестерин превращается в желчные кислоты и их соли и экскретируется из желчного пузыря в желудочно-кишечный тракт в составе желчи. Желчные кислоты и их соли в составе желчи необходимы для всасывания жиров, поступающих с пищей. Триглицериды состоят из глицерина и трех молекул жирных кислот. Они синтезируются в печени и жировой ткани. Главная функция триглицеридов (вернее, жирных кислот, входящих в состав триглицеридов) — энергетическая. Триглицериды служат альтернативным глюкозе источником энергии, используемым при голодании, когда запасы гликогена и глюкозы истощаются. В условиях относительного недостатка глюкозы триглицериды, находящиеся в клетках жировой ткани (адипоцитах), расщепляются при участии фермента липазы в процессе, называемом липолизом. Освобожденные в результате липолиза свободные жирные кислоты доставляются кровью в другие клетки органов и тканей, где окисляются (сжигаются) с выделением энергии, запасаемой в АТФ. Одновременно другой продукт липолиза — глицерин превращается в печени в глюкозу.

Как все липиды, холестерин и триглицериды нерастворимы в воде, поэтому транспортируются плазмой крови в связанном с растворимыми белками виде. Эти белки, транспортирующие липиды, называют апопротеинами, а комплексы липидов (в том числе холестерина и триглицеридов) с ними — липопротеинами. Каждая липопротеиновая частица состоит из липидной сердцевины, окруженной растворимым апопротеином. Липопротеины — частицы сферической формы, оболочка которых состоит из фосфолипидов, а внутри содержится транспортируемый холестерин (если точно, то эфир холестерина) и триглицериды. Апопротеины — белки, которые расположены на поверхности липопротеинов. Иногда для краткости их называют апобелками. Именно апопротеины и определяют, что станет с холестерином: или он высвободится из «упаковки» и будет поглощен клетками, чтобы потом выполнить свои жизненно важные функции, или, наоборот, излишний холестерин, содержащийся в организме, будет удален из тканей и крови и упакован внутрь липопротеиновой частицы, которая затем унесет его в печень. Апопротеины не только направляют метаболизм липопротеинов путем связывания со специфическими рецепторами, но и действуют в качестве кофакторов (активаторов) ферментов, участвующих в этих процессах. Липопротеиновые рецепторы, которые присутствуют на плазматических мембранах клеток,

контролируют скорость поглощения клетками и деградацию липопротеиновых частиц.

Липопротеины, содержащие холестерин, все привыкли называть холестерином. Это определенная условность, так как холестерин в свободном виде в плазме крови никогда не присутствует. Это водонерастворимый спирт, поэтому в плазме крови холестерин всегда связан с липопротеинами.

## 12.5.2. ТРАНСПОРТ ХОЛЕСТЕРИНА И ТРИГЛИЦЕРИДОВ

В крови циркулирует четыре типа липопротеинов, различающихся содержанием в них холестерина, триглицеридов и апобелков. Они имеют разную относительную плотность и размеры. В соответствии с данными характеристиками различают следующие типы липопротеинов.

- **Хиломикроны** представляют собой богатые жиром частицы, поступающие в кровь из лимфы и транспортирующие пищевые триглицериды. Они содержат около 2% апобелка, около 5% холестерина, около 3% фосфолипидов и 90% триглицеридов. Хиломикроны являются самыми крупными липопротеиновыми частицами.

Хиломикроны синтезируются в эпителиальных клетках тонкой кишки, а их основная функция состоит в транспорте поступивших с пищей триглицеридов. Триглицериды доставляются в жировую ткань, где они депонируются, и в мышцы, где ими пользуются в качестве источника энергии.

Плазма крови здоровых людей, не принимавших пищи в течение 12–14 ч, хиломикроны не содержит или содержит их ничтожные количества.

- **Липопротеиды очень низкой плотности (ЛПОНП)** содержат около 10% апобелка, около 15% холестерина, около 15% фосфолипидов и 60% триглицеридов. ЛПОНП синтезируются в печени, а их основная функция состоит в транспорте триглицеридов, синтезированных в печени, в жировые и мышечные клетки. Они служат предшественниками ЛПНП.
- **Липопротеиды низкой плотности (ЛПНП)** содержат около 25% апобелка, около 55% холестерина, около 10% фосфолипидов и 8–10% триглицеридов. ЛПНП — ЛПОПН после того, как они доставят триглицериды в жировые и мышечные клетки. Они служат основными переносчиками синтезированного в организме холестерина ко всем тканям (рис. 12.15). Основным белком ЛПНП — апопротеин В (апо-В). Поскольку ЛПНП поставляют холестерин, синтези-

роваемый в печени, в ткани и органы и тем самым способствуют развитию атеросклероза, их называют атерогенными липопротеинами.



Рис. 12.15. Строение липопротеинов низкой плотности

- **Липопротеины высокой плотности (ЛПВП)** содержат до 50% апо-белка, около 25% фосфолипидов, примерно 20% холестерина и очень немного триглицеридов (3%). По своим размерам это самые маленькие липопротеиновые частицы. Они синтезируются в печени и при поступлении в кровоток состоят преимущественно из апопротеина, но по мере циркуляции в крови обогащаются холестерином (рис. 12.16). Основной белок ЛПВП — апопротеин А (апо-А). Основная функция ЛПВП состоит в связывании и транспортировке излишка холестерина из всех непеченочных клеток обратно в печень для дальнейшего выделения в составе желчи. В связи со способностью связывать и удалять холестерин ЛПВП называют антиатерогенными (препятствуют развитию атеросклероза).



Рис. 12.16. Строение липопротеинов высокой плотности



Атерогенность холестерина в первую очередь определяется его принадлежностью к тому или иному классу липопротеинов. В этой связи особо следует выделить ЛПНП, которые наиболее атерогенны в силу следующих причин.

ЛПНП транспортируют около 70% всего холестерина плазмы и являются частицами, наиболее богатыми холестерином, содержание которого в них может достигать до 45–50%. Размеры частиц (их диаметр 21–25 нм) позволяет ЛПНП наряду с ЛПВП проникать в стенку сосуда через эндотелиальный барьер. Однако, в отличие от ЛПВП, которые легко выводятся из стенки, способствуя выведению избытка холестерина, ЛПНП задерживаются в ней, так как обладают избирательным сродством к ее структурным компонентам. Последнее объясняют, с одной стороны, наличием в составе ЛПНП белка апо-В, а с другой — существованием на поверхности клеток стенки сосуда рецепторов к этому апопротеину. В силу указанных причин ЛПНП служат основной транспортной формой холестерина для нужд клеток сосудистой стенки, а при патологических условиях — источником накопления его в стенке сосуда. Именно поэтому при гиперлипопропротеинемии, характеризующейся высоким уровнем холестерина ЛПНП, часто наблюдают относительно ранний и резко выраженный атеросклероз и ИБС.

При анализе результатов исследования холестерина важно отличать холестерин, входящий в состав ЛПНП, от холестерина ЛПВП.

### 12.5.3. РЕКОМЕНДУЕМЫЕ ВЕЛИЧИНЫ УРОВНЯ ХОЛЕСТЕРИНА И ТРИГЛИЦЕРИДОВ В КРОВИ

В лаборатории при назначении исследования холестерин-липопротеинового профиля определяют концентрацию холестерина общего (то есть холестерина, входящего и в ЛПНП, и в ЛПВП), входящего в ЛПВП, ЛПНП и содержание триглицеридов (входящих в состав ЛПНП, ЛПОНП и ЛПВП) в сыворотке крови. В ряде лабораторий из-за технической сложности уровень холестерина ЛПНП не определяют, а рассчитывают по уровню триглицеридов и холестерина ЛПВП.

Нормальные значения концентрации триглицеридов в сыворотке крови составляют 0,45–2,3 ммоль/л.

В отличие от других лабораторных тестов, концепция нормы не вполне применима для определения уровня холестерина и холестерина в составе различных фракций липопротеинов в сыворотке крови. Это обусловлено тем, что при определении референтных значений в группу обследуемых практически здоровых людей попадают и те, которые имеют повышенный риск развития атеросклероза и ИБС, но еще не имеют клинических проявлений этих заболеваний. Другими

словами, нормальный уровень холестерина в сыворотке крови нельзя четко отождествлять со здоровыми людьми. Именно поэтому для оценки результатов исследования уровня холестерина в сыворотке крови используют оптимальные или целевые, а не референтные значения. Оптимальный холестерин-липопротеиновый профиль предусматривает следующий уровень показателей в сыворотке крови:

- общий холестерин — менее 5,2 ммоль/л (200 мг/дл);
- ЛПВП-холестерин — более 1,3 ммоль/л (50 мг/дл);
- ЛПНП-холестерин — менее 3,4 ммоль/л (130 мг/дл);
- триглицериды — менее 1,7 ммоль/л (150 мг/дл).

У пациентов с ИБС целевой уровень общего холестерина в крови должен быть менее 5,0 ммоль/л (190 мг/дл), а целевой уровень холестерина ЛПНП — менее 3,0 ммоль/л (115 мг/дл).

О гиперхолестеринемии свидетельствуют значения общего холестерина выше 5,2 ммоль/л, а о гипертриглицеридемии — выше 1,7 ммоль/л. При этом повышение уровня триглицеридов в крови до 1,7–5,6 ммоль/л расценивают как гипертриглицеридемию выраженную, а более 5,6 ммоль/л — как тяжелую.

**Особенности взятия проб крови.** На концентрацию холестерина и триглицеридов в крови оказывают влияние многие факторы, такие как диета, курение, прием алкоголя, инфекции и даже изменение положения тела при взятии проб крови. Именно поэтому важно соблюдать стандартные условия и минимизировать влияние этих факторов. К особенностям взятия крови для исследования относят следующие:

- перед взятием крови пациент должен в течение 2 нед придерживаться своей обычной диеты;
- вечером накануне взятия крови должен быть исключен прием алкоголя (это распространенная причина гипертриглицеридемии даже у голодавших пациентов);
- кровь для исследования липидов следует брать утром, натощак, после 12–14-часового ночного голодания;
- если пациент перенес тяжелое заболевание (например, ИМ) или обширное оперативное вмешательство, то взятие крови необходимо перенести на 3 мес, либо брать ее в течение 24 ч после эпизода (при заболеваниях средней степени тяжести исследование переносят на 2–3 нед);
- пациент должен быть отдохнувшим и посидеть в течение 5–10 мин перед взятием крови;
- наложение жгута при взятии крови не должно превышать 1 мин, так как более длительное удержание жгута может привести к искажению результатов.

#### 12.5.4. ПОСЛЕДСТВИЯ ПОВЫШЕНИЯ УРОВНЯ ХОЛЕСТЕРИНА И/ИЛИ ТРИГЛИЦЕРИДОВ В КРОВИ

В настоящее время общепринято, что повышение уровня холестерина в плазме крови служит основной причиной атеросклероза и его следствия — ИБС. Основной виновник атеросклероза — так называемый атерогенный холестерин (холестерин ЛПНП), тот, который поступает из печени в ткани и органы. Однако атерогенным он становится только при наличии определенных факторов, которые способствуют развитию атеросклероза и в последующем ИБС. Атеросклероз представляет собой сложный процесс, который начинает развиваться за много лет до появления симптомов ИБС. Первоначально на внутренних стенках артерий образуются жировые образования — бляшки. Маленькие бляшки остаются «мягкими», но более «старые», большие бляшки имеют тенденцию образовывать фиброзные шляпки, в которых откладывается кальций. Происходит кальцификация артерий, что приводит к атеросклерозу: сужению артерий и их затвердеванию. А это может вести к двум последствиям: кальцинированные и неэластичные артерии становятся узкими (именно это и называют стенозом), скорость кровотока в них замедляется, что не дает крови, обогащенной кислородом, поступать к мышце сердца. Возникает кислородная недостаточность — ишемия, за ней — ИБС. Клиническими симптомами кислородного дефицита служит стенокардия — преходящие приступы боли за грудиной или дискомфорта в груди в ответ на усиление сердечной деятельности при физической нагрузке либо стрессе. Боль обычно исчезает, когда увеличенная потребность в кислороде после отдыха снижается. Однако нестабильные бляшки могут разорваться, что приводит к образованию тромба на их поверхности. Тромбы могут закупорить коронарную артерию, и тогда кровь перестает достигать некоторых участков миокарда. В отсутствие кислорода кардиомиоциты погибают и развивается ИМ. Такое поражение сердца может стать причиной внезапной смерти. Стенокардия, ИМ и внезапная смерть — три основных проявления ИБС.

Липиды крови, прежде всего холестерин, имеют прямое отношение к заболеваемости ИБС. Это обусловлено их активным участием в патогенезе атеросклероза.

Атеросклероз начинается с повреждения внутренней оболочки артерий — эндотелия. Именно повреждение эндотелия служит тем необходимым условием, которое обеспечивает проникновение в этот слой богатых холестерином ЛПНП, циркулирующих в крови. Наиболее частыми агентами, вызывающими повреждение эндотелия, служат раз-

личные вирусы (цитомегаловирус, вирус герпеса, гриппа и др.) и бактерии (хламидии, микоплазмы, *Helicobacter pylori* и др.). В результате накопления холестерина ЛПНП в эндотелии к местам повреждения мигрируют макрофаги, которые захватывают частицы ЛПНП и аккумулируют их внутри себя. В течение многих лет внутри повреждений продолжает накапливаться холестерин ЛПНП, что приводит к формированию мягких бляшек в стенке сосудов. Нормальные мышечные клетки стенки артерий начинают замещаться белком соединительной ткани — коллагеном, придающим стенкам сосудов жесткость. Со временем коллаген откладывается также поверх бляшек, формируя жесткие фиброзные бляшки, которые постепенно накапливают кальций (кальцифицируются). Эндотелий становится тонким и ломким. Он легко повреждается (например, при растяжении артерий вследствие повышения АД) с проникновением крови внутрь бляшек и формированием на их основе тромбов, способных частично или полностью закупорить сосуд (рис. 12.17).

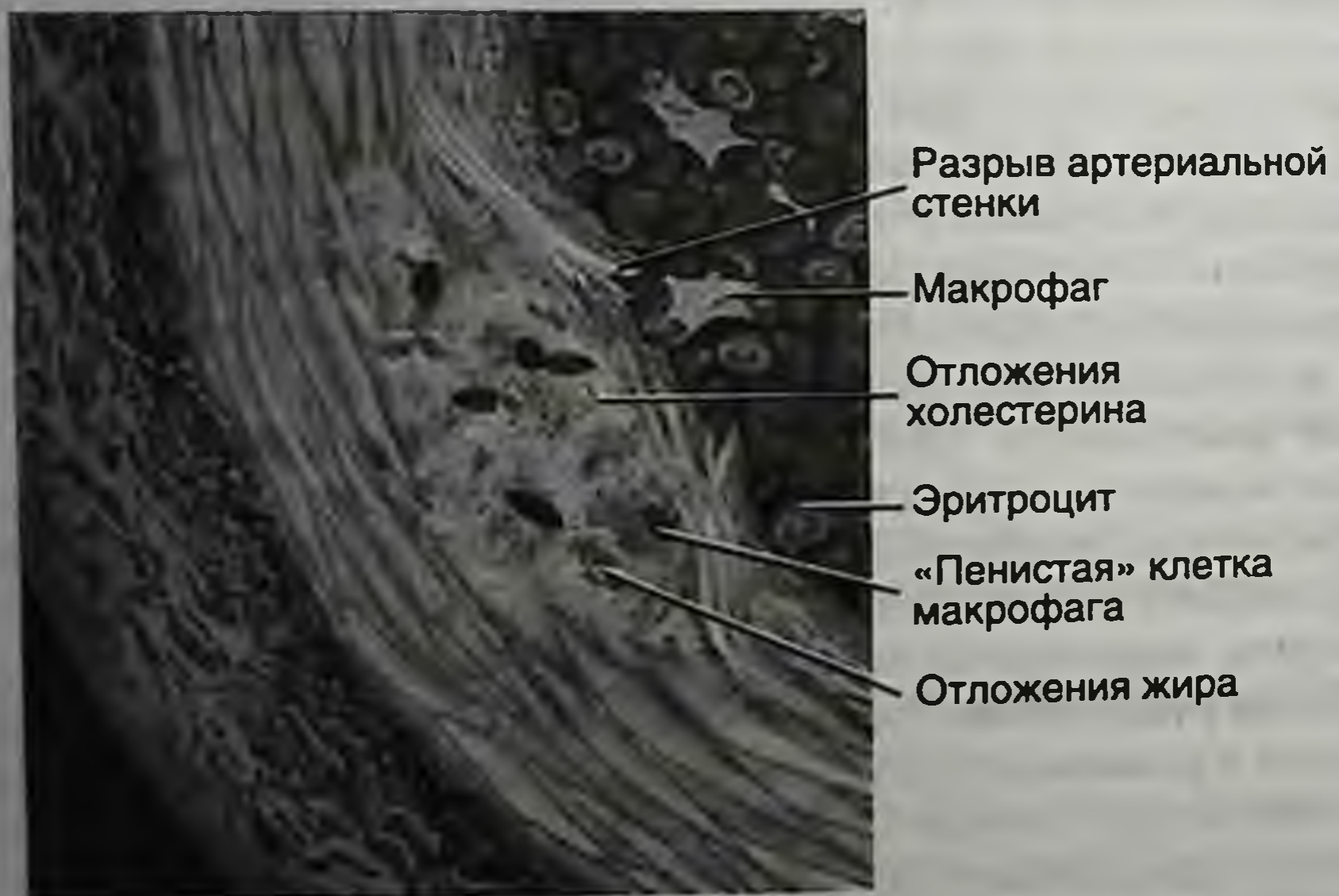


Рис. 12.17. Строение атеросклеротической бляшки

Роль холестерина в процессах атерогенеза в том, что накопление холестерина в составе ЛПНП в эндотелии служит необходимым условием для его начала. Холестерин ЛПНП, обнаруживаемый в составе атеросклеротических бляшек, происходит из крови, и чем выше его уровень в крови, тем выше вероятность развития ИБС. Формирование атеросклеротических бляшек вызывает именно холестерин ЛПНП.

В настоящее время установлена четкая корреляция между уровнем общего холестерина в крови и смертностью от сердечно-сосудистых заболеваний, то есть повышение его уровня сопровождается ростом смертности среди мужчин и женщин. При содержании холестерина в крови ниже 5,2 ммоль/л риск развития атеросклероза наименьший. Если уровень холестерина ЛПНП в крови ниже 2,59 ммоль/л, сердечные приступы возникают очень редко.

Неправильное питание, курение и артериальная гипертензия служат совместно действующими факторами, повышающими риск ИБС. Сочетание одного из этих факторов с любым другим примерно на 10 лет ускоряет развитие коронарного атеросклероза.

ЛПВП, напротив, играют защитную роль в отношении развития ИБС. Чем ниже уровень холестерина ЛПВП, тем выше риск развития ИБС. Высокий уровень холестерина ЛПВП в крови ассоциируется с уменьшением риска ИБС. Повышение уровня холестерина ЛПВП в процессе лечения на 0,03 ммоль/л снижает риск коронарной патологии на 2–3% у мужчин и женщин.

У пациентов с повышенным уровнем в крови холестерина ЛПНП или пониженным уровнем холестерина ЛПВП повышенное содержание триглицеридов увеличивает риск развития ИБС.

Для клинической практики следует иметь в виду следующие моменты:

- снижение уровня холестерина ЛПНП и повышение холестерина ЛПВП способствуют уменьшению частоты атеросклероза;
- избыточное питание, ожирение, курение и низкая физическая активность оказывают неблагоприятное воздействие на липидный профиль крови;
- лечение липидных нарушений должно предусматривать не просто коррекцию уровня холестерина, а нормализацию неблагоприятного липидного профиля;
- снижение массы тела и физические упражнения повышают уровень холестерина ЛПВП, одновременно снижая уровень холестерина ЛПНП и триглицеридов в крови;
- развитие атеросклероза начинается еще в молодом возрасте, поэтому его проявления на более поздних этапах жизни можно предотвратить, ведя здоровый образ жизни с юных лет.

В табл. 12.12 приведены значения основных липидных показателей для взрослых людей и их взаимосвязь с риском возникновения заболеваний.

Необходимо отметить, что с помощью определения уровня липидов в крови можно только в общем виде оценить риск развития ИБС. Эти

результаты не могут быть использованы для диагностики или определения точного прогноза для конкретного пациента. Можно только констатировать: чем выше в крови уровень холестерина ЛПНП, тем выше риск развития ИБС. Этот риск увеличивается, если повышение холестерина ЛПНП дополняется увеличением содержания триглицеридов в крови пациента. Наоборот, риск заболевания уменьшается при высоком уровне холестерина ЛПВП.

**Таблица 12.12.** Уровни липидов в крови, обуславливающие риск возникновения ишемической болезни сердца и панкреатита у взрослых лиц

Показатель, ммоль/л	Референтные значения	Пограничные значения высокого риска ИБС	Высокий риск ИБС	Высокий риск панкреатита
Общий холестерин	<5,2	5,2–6,2	≥6,2	–
Холестерин ЛПНП	<3,4	3,4–4,1	≥4,1	–
Холестерин ЛПВП	>1,6	–	<0,9	–
Триглицериды	<1,7	1,7–4,5	>4,5	>11,3
Холестерин общий/ЛПВП	<5,0	5,0–6,0	>6,0	–

### 12.5.5. ПРИЧИНЫ ПОВЫШЕНИЯ УРОВНЯ ХОЛЕСТЕРИНА И/ИЛИ ТРИГЛИЦЕРИДОВ В КРОВИ

Причины, приводящие к повышению уровня липидов в крови, делятся на первичные — генетически обусловленные и вторичные — проявление другого патологического процесса.

Генетические нарушения обмена липидов могут сопровождаться повышением в крови уровня холестерина, триглицеридов или обоих показателей. Некоторые из этих наследуемых дефектов встречаются относительно часто, другие — реже.

Большинство пациентов с повышенным уровнем холестерина ЛПНП в крови имеют наследуемый дефект, называемый полигенной гиперхолестеринемией. В основе этого состояния лежат нарушения во многих генах. При данном нарушении концентрация общего холестерина в крови увеличивается незначительно, а уровень триглицеридов при этом обычно в норме. Выраженность гиперхолестеринемии во многом зависит от диеты.

Семейная гиперхолестеринемия — еще одна из форм наследственной патологии. Это состояние характеризуется высокими концентрациями общего холестерина (в пределах 7,8–12 ммоль/л) и ЛПНП (часто более 9,0 ммоль/л) в крови, которые наблюдаются с раннего детства, и они не зависят от питания.

Вторичные гиперлипидемии считаются распространенным состоянием. Самая частая причина вторичной гиперлипидемии — СД. Это во многом объясняет повышение риска заболеваемости ИБС у больных СД. Вторичную гиперлипидемию могут вызывать также заболевания печени, внутри- и внепеченочный холестаза, злокачественные опухоли поджелудочной железы, гломерулонефрит, гипотиреоз, нефротический синдром, хроническая почечная недостаточность, алкоголизм и ожирение.

## 12.5.6. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ ХОЛЕСТЕРИНА И ТРИГЛИЦЕРИДОВ

Из всех классов липидов, присутствующих в плазме крови человека, исследование уровня холестерина и триглицеридов имеет наибольшее клиническое значение. Существует множество методов определения концентрации холестерина и триглицеридов. Однако в практике КДЛ применяют только фотометрические методы, которые можно разделить на ферментативные, основанные на действии специфических ферментов, и химические (колориметрические), использующие для регистрации результатов анализа цветные реакции.

### 12.5.6.1. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХОЛЕСТЕРИНА

Холестерин, или холестерол, — стероид, характерный только для животных организмов. Относится к классу стероидов (стероидов) и является ненасыщенным спиртом. Эфиры холестерина — форма, в которой они депонируются в клетках или транспортируются кровью. В крови около 75% холестерина находится в виде эфиров. Холестерин присутствует в организме человека как в виде свободного стерина, так и в форме сложного эфира — в соединении с одной из длинноцепочечных жирных кислот.

В настоящее время для определения холестерина большинство КДЛ использует ферментативный метод, в котором реализуется несколько последовательных реакций.

- Стадия I — гидролиз эфиров холестерина под действием специфических ферментов (чаще всего используют холестеринэстеразу):  
[эфиры холестерина +  $H_2O$ ] (холестеринэстераза→) [холестерин + жирные кислоты].
- Стадия II — окисление холестерина растворенным в реакционной смеси кислородом воздуха в присутствии холестериноксидазы, в результате чего образуется холестенон и перекись водорода:  
[холестерин +  $O_2$ ] (холестериноксидаза→) [холест-4-ен-3-он +  $H_2O_2$ ].

- Стадия III — определение продуктов реакции ( $H_2O_2$  или холестерин-4-ен-3-она) либо убыли кислорода в процессе ее протекания.

Чаще всего содержание холестерина устанавливают, определяя  $H_2O_2$ , образующуюся в ходе реакции (аналогичными методами, которые используют для определения глюкозы). Для этого в методике определения холестерина дополнительно используют пероксидазу, которая катализирует в присутствии фенола окисление перекисью водорода 4-аминоантипирина (или 4-гидроксибензоата, или 4-аминофеназона) с образованием окрашенного продукта розово-малинового цвета.

Накопление холестенона в процессе реакции количественно можно оценить спектрофотометрически по изменению светопоглощения при длине волны 240 нм.

При окислении холестерина, так же как и при дегидратировании, могут образовываться самые разнообразные окрашенные или флуоресцирующие продукты. На этом феномене (образование цветных комплексов) основано множество (>150) химических (колориметрических) методов определения холестерина. Из них, до эпохи ферментативных методов, широко использовали реакцию Либерманна—Бурхарда и Златкиса—Зака. Первая из них заключается в том, что в сильноокислой среде в присутствии уксусного ангидрида от холестерина отщепляется вода, и образуется окрашенное в зеленовато-синий цвет соединение. Реакция Златкиса—Зака основана на том, что при окислении холестерина хлорным железом в уксусной и концентрированной серной кислоте развивается красно-фиолетовое окрашивание раствора.

Из химических методов определения холестерина на основе реакции Либерманна—Бурхарда в КДЛ использовали унифицированный метод Илька: в сильноокислой среде в присутствии уксусного ангидрида происходит дегидратация холестерина с образованием окрашенного в зеленовато-синий цвет бисхолестадиенилмоносульфоновой кислоты.

Реакция Златкиса—Зака стала основой метода определения холестерина этих авторов: свободный и эфирносвязанный холестерин окисляется хлорным железом в присутствии уксусной, серной и фосфорной кислоты с образованием ненасыщенных продуктов, окрашенных в фиолетово-красный цвет.

### 12.5.6.2. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРИГЛИЦЕРИДОВ

Триглицериды или нейтральные жиры представляют собой сложные эфиры глицерина и трех остатков жирных кислот. Не существует хими-



ческих реакций для молекулы триглицерида в целом, поэтому их количество определяют по содержанию глицерина, который образуется при щелочном или ферментативном гидролизе. Второй сложностью при определении концентрации триглицеридов считают то, что глицерин входит в состав не только триглицеридов, но и фосфолипидов. Именно поэтому для точного измерения триглицеридов первоначально необходимо выделить из сыворотки крови фракции нейтрального жира, свободные от фосфолипидов, или провести гидролиз с использованием очень специфического фермента, который отщеплял бы глицерин только от триглицеридов, но не от фосфолипидов.

Для определения триглицеридов в сыворотке крови применяют химические и ферментные методы. Химические методы основаны на определении глицерина, который окисляют йодной кислотой до формальдегида, дающего темно-фиолетовое окрашивание при взаимодействии с хромотроповой кислотой или желтое с ацетилацетоном. В унифицированном методе определения триглицеридов используют реакцию с ацетилацетоном. Химические методы требуют проведения предварительной экстракции триглицеридов смесью гептана и изопропилового спирта, в которую переходят нейтральные жиры, а полярные фосфолипиды остаются в водной фазе. Затем триглицериды гидролизуются щелочью, а образовавшийся глицерин окисляется йодной кислотой до формальдегида, который определяют по цветной реакции с ацетилацетоном. Интенсивность окраски оценивают фотометрически при длине волны 425 нм.

В ферментативном методе для определения концентрации триглицеридов используют последовательное протекание четырех реакций, осуществляемых липопротеиновой липазой, глицеринкиназой, глицеринфосфатоксидазой и пероксидазой.

- На первом этапе липопротеинлипаза катализирует гидролиз триглицеридов с образованием свободных жирных кислот и эквимолярного количества глицерина:  
[триглицериды] (липопротеиновая липаза →) [глицерин + жирные кислоты].
- Глицерин посредством глицеринкиназы в присутствии АТФ преобразуется в глицерин-3-фосфат и аденозин-5-дифосфат (АДФ):  
[глицерин] (глицеринкиназа →) [глицерил-3-фосфат + АДФ].
- Затем глицерил-3-фосфат преобразуется под действием глицеринфосфо-3-оксидазы в дигидроацетонфосфат и эквимолярное количество перекиси водорода:  
[глицерил-3-фосфат + O<sub>2</sub>] (глицеринфосфатоксидаза →) [дигидроацетонфосфат + 2H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>].

- Перекись водорода в присутствии пероксидазы вступает в реакцию с р-хлорфенолом и р-аминофеназоном (р-аминоантипирин) с образованием окрашенного хинониминового остатка. Интенсивность окраски производного хинонимина прямо пропорциональна концентрации триглицеридов в пробе:  
 $[H_2O_2 + 4\text{-аминофеназон} + 4\text{-хлорфенол}] \text{ (пероксидаза} \rightarrow \text{) [хинонимин} + 4H_2O]$ .

Концентрация хинонимина, определяемая фотометрически при длине волны 505 нм, пропорциональна концентрации триглицеридов в пробе.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ

1. Какие липиды представлены в плазме крови?
2. Перечислите функции холестерина, триглицеридов и липопротеинов в организме человека.
3. Какие типы липопротеинов присутствуют в сыворотке крови?
4. Какие липопротеины определяют атерогенность холестерина?
5. Назовите рекомендуемые величины уровня холестерина и триглицеридов в крови.
6. Какие концентрации холестерина в сыворотке крови указывают на гиперхолестеринемию?
7. Каковы последствия повышения уровня холестерина и триглицеридов в крови для организма человека?
8. Назовите методы определения холестерина в крови.
9. Какова последовательность реакций, используемых в ферментативном методе определения триглицеридов?

## 12.6. ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ

Ферменты — специфические белки, выполняющие в организме роль биологических катализаторов, то есть ускорителей химических реакций. Они содержатся во всех клетках организма, где их концентрация значительно выше, чем в плазме крови. Вместе с тем высокодифференцированные клетки, выполняющие специализированные функции в организме, имеют свой собственный набор ферментов. Например, клетки миокарда отличаются от клеток печени, жировой ткани, почек. Практически все метаболические реакции в организме человека катализируются ферментами. Именно поэтому в каждой клетке организма находится от 1000 до 4000 ферментов (в зависимости от типа ткани). Действие ферментов высокоспецифично: каждый из них катализирует

только одну или ограниченное количество сходных реакций. Почти все ферменты функционируют внутри тех клеток, в которых они синтезируются. Однако ряд ферментов, например ренин, факторы свертывания и комплемента, активно секретятся в кровь, где и выполняют свою физиологическую функцию.

### 12.6.1. СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ ФЕРМЕНТОВ

Все ферменты являются белками, различающимися по размеру и структуре. Самые простые из них представляют цепочки аминокислот (полипептиды), с молекулярной массой 10 000–20 000 Да, а самые сложные — комплексы, состоящие из нескольких белковых субъединиц. Ферменты могут состоять из одной, двух или более идентичных белковых субъединиц. Каждая субъединица имеет два важных функциональных участка: связывающий и каталитический центр.

Некоторые ферменты могут существовать в двух молекулярных формах или более, близких по свойствам, но несколько отличающихся друг от друга. Эти различные формы получили название изоферментов. Их исследование в клинической практике представляет интерес, когда отдельные изоферменты образуются в разных тканях (например, в сердце и печени преобладают различные изоферменты лактатдегидрогеназы).

Выполняя свою функцию, каждый фермент взаимодействует с определенным веществом, которое называют субстратом. В результате ферментативной реакции с субстратом образуется определенный продукт. Например, субстратом пищеварительного фермента липазы служат пищевые жиры. Липаза катализирует расщепление жиров, а продуктом реакции являются моноглицериды и жирные кислоты. Специфичность (способность связываться с определенным субстратом) любого фермента зависит от строения его связывающего центра, который полностью соответствует структуре субстрата. При связывании каталитический центр фермента приближается к субстрату, и фермент выполняет свою функцию. В результате образуется нестабильный комплекс фермент—продукт, который быстро распадается на продукт и неизменный фермент. Фермент может снова реагировать с молекулами субстрата, высвобождая фермент много раз в секунду.

Такие факторы внутриклеточной среды, как рН и температура, оказывают существенное влияние на активность ферментов. Именно поэтому нормальный клеточный метаболизм (совокупность клеточных ферментативных реакций) зависит от поддержания постоянства внутренней среды клеток органов и тканей.

Название почти всех ферментов состоит из двух частей (названия субстрата и типа катализируемой реакции) и заканчивается на «аза» (липаза, аланинаминотрансфераза, гаммаглутамилтранспептидаза). Например, субстратом аланинаминотрансферазы (АСТ) служит аспарагиновая кислота. АСТ специфически катализирует перенос аминогруппы с аспарагиновой кислоты на  $\alpha$ -кетоглутаровую кислоту. Продуктами этой реакции служат глутаминовая аминокислота и оксалоацетат. Название фермента отражает его функцию.

Правда, некоторые ферменты были открыты задолго до разработки современной классификации. Именно поэтому для них сохранены старые названия. В качестве примеров могут служить ферменты (факторы) свертывающей системы крови — тромбин, плазмин, а также пищеварительные ферменты — пепсин, трипсин, химотрипсин.

Определение активности ферментов в сыворотке крови служит чувствительным методом диагностики повреждения органов и тканей. Для количественной оценки активности ферментов Комиссия по ферментам Международного биохимического союза рекомендовала стандартную международную единицу (МЕ). За единицу активности любого фермента принимают то его количество, которое в оптимальных условиях катализирует превращение 1 мкмоль субстрата в 1 мин (мкмоль/мин). Об активности фермента судят по скорости катализируемой реакции при определенных температуре, рН среды, концентрации субстрата. Именно поэтому при определении активности ферментов в лаборатории строго соблюдают одни и те же условия, иначе нормальные результаты будут существенно отличаться. Кроме того, ферментативная реакция чувствительна к изменениям температур. Обычно ферментативную реакцию принято проводить при температуре в пределах 25–40 °С. Однако при разной температуре оптимальные значения рН, концентрации буфера, субстрата и других параметров различны, и соответственно различны значения нормальных результатов анализа. Максимальную активность большинства ферментов в организме человека наблюдают при температуре около 37 °С. Вот почему в целях международной стандартизации температуры измерения активности ферментов в лаборатории используют ее значение 37 °С. Нормальные величины активности ферментов приведены ниже для 37 °С.

## 12.6.2. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

Исследование ферментов применяют в клинической практике для решения различных задач: установления диагноза, проведения диффе-

ренциальной диагностики (различения похожих болезней) заболеваний, оценки динамики течения болезни, определения эффективности лечения и степени выздоровления, с прогностической целью.

Наиболее часто в качестве объекта для исследования используют сыворотку крови, ферментный состав которой относительно постоянен. Нормальные уровни активности ферментов в сыворотке крови отражают соотношение между биосинтезом и высвобождением ферментов (при обычном обновлении клеток), а также их удалением из кровотока. Повышение скорости обновления ферментов, повреждения клеток или нарушение их выведения обычно приводят к повышению активности ферментов в сыворотке крови. В сыворотке крови выделяют три группы ферментов: внутриклеточные, секреторные и экскреторные.

Из 4000 ферментов человеческого организма в повседневной клинической практике определяют активность около 30. Почти все они являются внутриклеточными. Внутриклеточные ферменты, в зависимости от локализации в тканях, делят на две группы:

- неспецифические, которые катализируют общие для всех тканей реакции обмена и находятся в большинстве органов и тканей (например, АСТ, АЛТ, ЛДГ, амилаза, липаза и др.);
- органоспецифические, присутствуют только в определенном типе тканей (например, панкреатическая  $\alpha$ -амилаза присутствует только в поджелудочной железе).

В сыворотке крови активность клеточных ферментов низка или вообще отсутствует. Относительно небольшое количество ферментов, в норме присутствующих в крови, поступает туда вследствие процесса клеточного обновления (когда клетка погибает, ее содержимое, в том числе внутриклеточные ферменты, попадает в плазму крови). Ферменты с низкой молекулярной массой удаляются из организма в процессе почечной фильтрации, но большинство их разрушается в клетках ретикулоэндотелиальной системы. При патологических процессах активность внутриклеточных ферментов в сыворотке крови зависит от скорости высвобождения из клеток, которая, в свою очередь, определяется скоростью и степенью повреждения клетки. Любое значительное увеличение количества гибнущих клеток (некроз) вследствие патологического процесса или повреждения характеризуется увеличенным высвобождением внутриклеточных ферментов в плазму крови, где их активность повышается. Усиленное клеточное размножение (например, при росте злокачественной опухоли) также приводит к повышению содержания внутриклеточных ферментов в плазме крови. Уровень ферментативной активности

в кровяном русле после повреждения ткани определяется в первую очередь содержанием фермента в этой ткани, а также стадией патологического процесса.

Большинство внутриклеточных ферментов, которые используют в клинической практике как маркеры (указатели) повреждения клеток, являются неспецифическими. Однако, хотя они находятся во многих или по крайней мере в нескольких тканях, их наибольшую концентрацию наблюдают только в одном либо нескольких определенных типах тканей. Именно поэтому повышение в плазме крови уровня какого-либо определенного фермента указывает на повреждение клеток той ткани, в которой этот фермент представлен в наибольшем количестве. Например, креатинкиназа (КК) в наибольших количествах находится в клетках скелетной мускулатуры, сердечной мышцы, значительно меньших — в мозге, щитовидной железе, матке, легких. Соответственно при обнаружении повышенных значений КК в сыворотке крови в первую очередь необходимо предполагать наличие у пациента повреждения миокарда или скелетной мускулатуры.

Секреторные ферменты (церулоплазмин, псевдохолинэстераза, ренин) поступают непосредственно в плазму крови и выполняют в ней специфические функции. Эти ферменты синтезируются в печени и постоянно высвобождаются в плазму. Их активность в сыворотке крови выше, чем в клетках или тканях. В клинической практике они представляют интерес, когда их активность в сыворотке крови становится ниже нормы за счет нарушения функции печени.

Экскреторные ферменты образуются органами пищеварительной системы (поджелудочной железой, слизистой оболочкой кишечника, печенью, эндотелием желчных путей). К ним относят  $\alpha$ -амилазу, липазу, щелочную фосфатазу и др. В норме их активность в сыворотке крови низка и постоянна. Однако при патологии, когда блокирован любой из обычных путей экскреции, активность этих ферментов в сыворотке крови значительно увеличивается.

### 12.6.3. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

В сыворотке крови ферменты обладают низкой активностью, поэтому в практике лабораторий для определения активности измеряют их каталитический эффект путем определения скорости реакции, при которой субстрат под действием фермента превращается в продукт реакции. Эта величина — скорость реакции, при определенных условиях прямо пропорциональна количеству присутствующего в пробе фермента.

Основные требования, предъявляемые к ферментативной реакции:

- активность фермента необходимо определять в условиях его насыщения субстратом;
- до конца измерения должна быть израсходована только небольшая часть субстрата;
- субстрат не должен содержать примесей, влияющих на течение реакции.

Целый ряд факторов может оказывать влияние на создание оптимальных условий для определения активности ферментов.

- Соблюдение температурного режима. Температурным оптимумом большинства ферментов в организме является  $37^{\circ}\text{C}$ . Увеличение температуры реакционной смеси на  $1^{\circ}\text{C}$  увеличивает скорость реакции на 10%. Обязательным условием при проведении реакции служит прогревание субстрата до необходимой температуры, и должна быть уверенность, что анализатор держит нужную температуру. Если температура реакционной смеси будет повышена, то результаты получатся заниженными.
- Поддержание pH реакционной среды. Каждый фермент имеет свой pH-оптимум, при котором проявляет наибольшую каталитическую активность. Для его поддержания в наборах для определения активности ферментов содержатся буферы, определяющие pH реакционной смеси. Оптимум для большинства ферментов находится в пределах от 6 до 8.
- Время протекания ферментативной реакции (если реакцию оценивают по конечной точке). Увеличение времени протекания реакции приводит к увеличению активности фермента.

Зависимость скорости ( $V$ ) ферментативной реакции от различных факторов приведена на рис. 12.18.

В реальной практике для определения активности ферментов используют готовые наборы реактивов, в которых подобраны оптимальные концентрация субстрата, pH, вид буфера и его концентрация. Регистрацию результатов ферментативных реакций осуществляют с применением спектрофотометрических (колориметрических) методов, основанных на поглощении света в определенных участках спектра многими соединениями, служащими активными группами ферментов, субстратами или продуктами реакции.

Существует большое количество методических принципов определения активности ферментов, различаемых по технике исполнения, аналитическим качествам, способу измерения активности ферментов. По способу измерения активности ферментов методы, используемые в КДЛ, можно разделить на две группы: конечноточечные и кинетические.

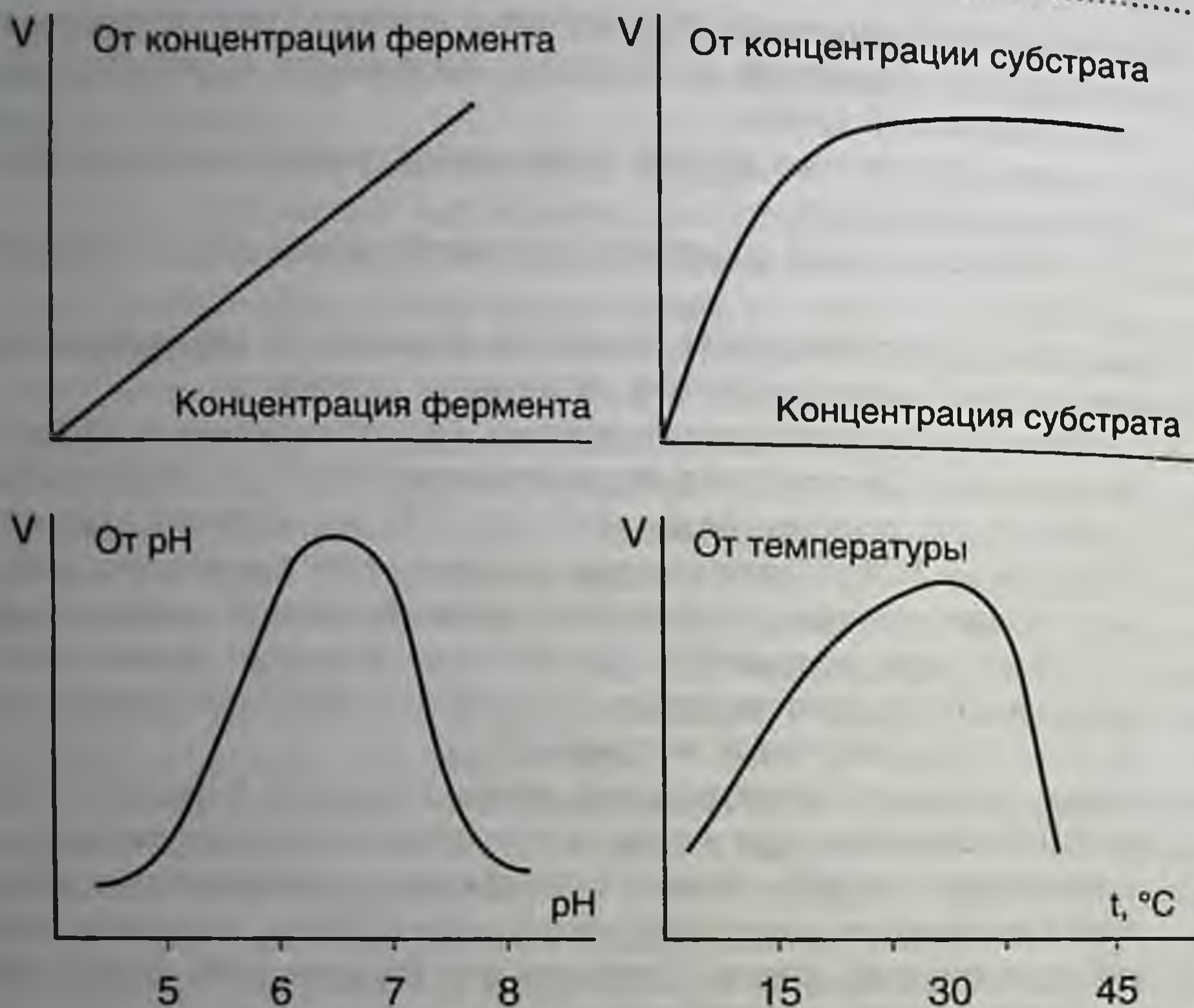


Рис. 12.18. Зависимость скорости ферментативной реакции от различных факторов

### 12.6.3.1. КОНЕЧНОТОЧЕЧНЫЕ МЕТОДЫ

Принцип измерения «по конечной точке» заключается в измерении оптической абсорбции на линейном участке кинетической кривой по истечении определенного четко фиксированного отрезка времени ( $t$ ) от начала реакции (внесения исследуемой пробы в реакционную смесь). Такой способ называют еще одноточечной кинетикой (рис. 12.19). По истечении определенного отрезка времени ( $t$ ) в реакционную смесь добавляют реагент, останавливающий ферментативную реакцию, например щелочь или кислоту. Отсюда и название метода — «по конечной точке», то есть с остановкой реакции. Этот способ применяют в большинстве рутинных методов (в методе Райтмана-Френкеля, при определении активности фосфатаз и др.) определения активности ферментов.



Скорость изменения оптической абсорбции рассчитывают по формуле:

$$\Delta A/\text{мин} = (A - A_{\text{хол}})/t,$$

где  $A_{\text{хол}}$  — оптическая абсорбция холостой пробы;  $A$  — оптическая абсорбция опытной пробы;  $t$  — время реакции.

При двухточечном измерении оптическую абсорбцию определяют на линейном участке кинетической кривой дважды, четко фиксируя интервал времени ( $t$ ) между измерениями (рис. 12.20).

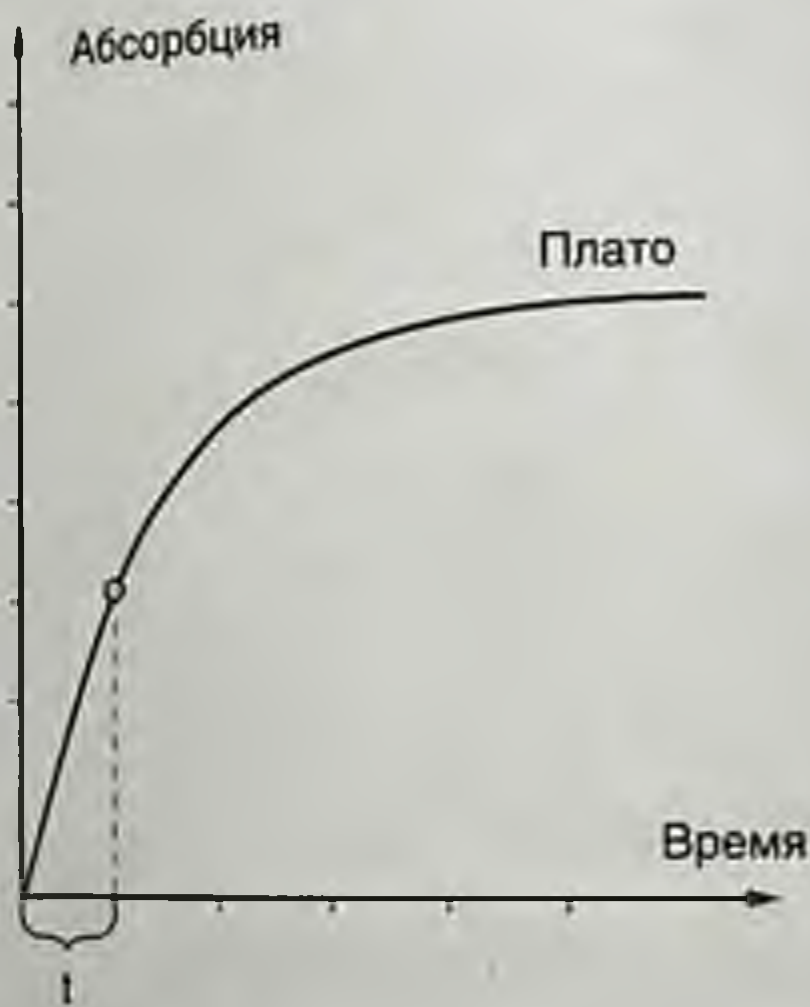


Рис. 12.19. Принцип измерения «по конечной точке»

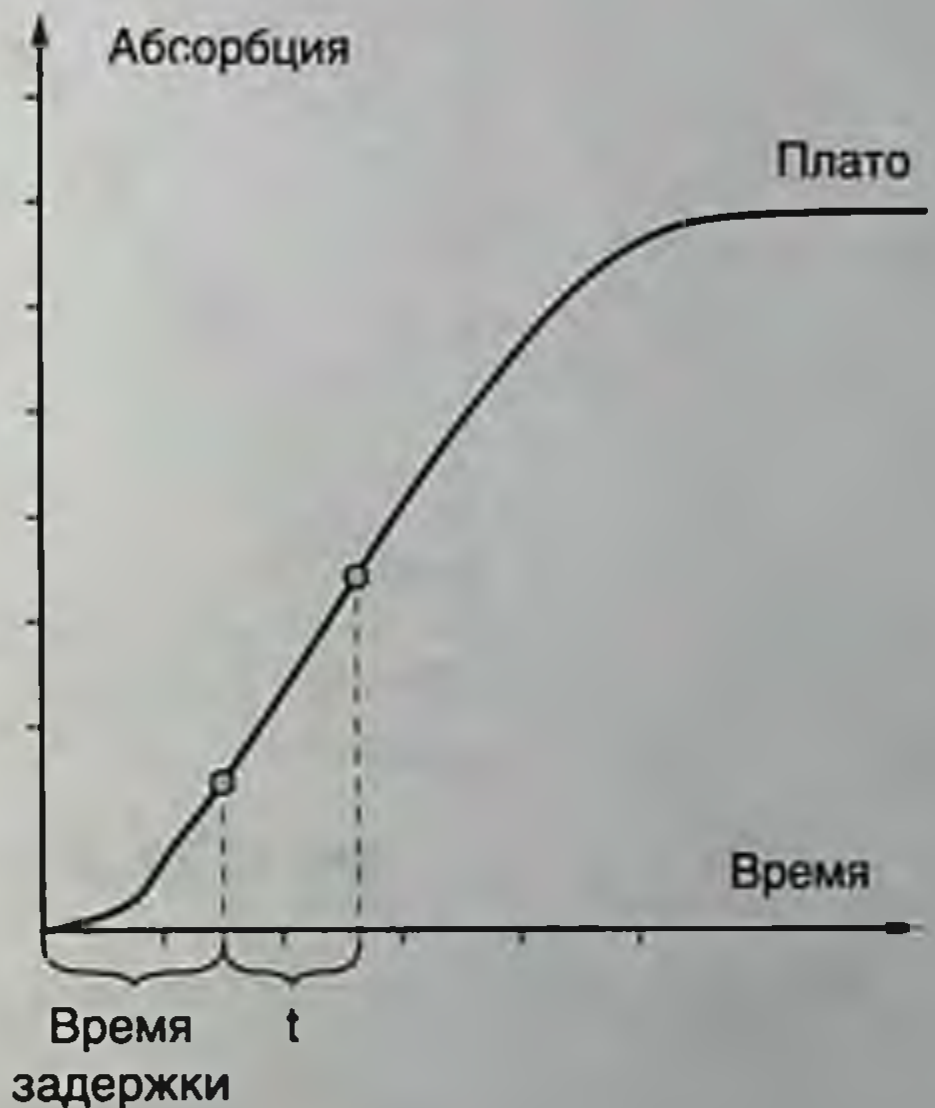


Рис. 12.20. Принцип двухточечного измерения

Скорость изменения оптической абсорбции рассчитывают по формуле:

$$\Delta A/\text{мин} = (A_2 - A_1)/t,$$

где  $A_1$  — оптическая абсорбция опытной пробы в первый раз, через установленный промежуток времени;  $A_2$  — оптическая абсорбция опытной пробы во второй раз, через установленный промежуток времени.

Этот способ используют, например, в современных методах определения активности  $\alpha$ -амилазы и щелочной фосфатазы.

### 12.6.3.2. КИНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Кинетические методы — группа методов, при которых периодически или непрерывно определяют потребление субстрата, кофермента

или образование метаболита. При этом способе оптическую абсорбцию на линейном участке кинетической кривой определяют 3 раза и более через четко фиксированные равные интервалы времени  $t$  (рис. 12.21).



Рис. 12.21. Кинетический метод

Изменение оптической абсорбции рассчитывают по формуле:

$$\Delta A / \text{мин} = \Delta A_{\text{ср}} / t.$$

Из полученных значений рассчитывают среднюю величину изменения абсорбции ( $A_{\text{ср}}$ ) и с использованием определенных коэффициентов (в зависимости от температуры реакции) производят расчет активности фермента, выражая результат в МЕ или каталах. Некоторые из этих методов основаны на измерении скорости изменения концентрации субстрата в реакционной смеси. Концентрация субстрата в реакционной смеси может уменьшаться — нисходящая кинетика (например, метод Каравея для определения активности  $\alpha$ -амилазы по гидролизу крахмала) или увеличиваться — восходящая кинетика. Многоточечную кинетику используют только в автоматических биохимических анализаторах, так как при ручном проведении анализа это достаточно трудоемко. На этом способе основано, например, определение активности АЛТ и АСТ УФ-методами. Многоточечную кинетику считают наиболее точным способом измерения скорости и соответственно активности ферментов.

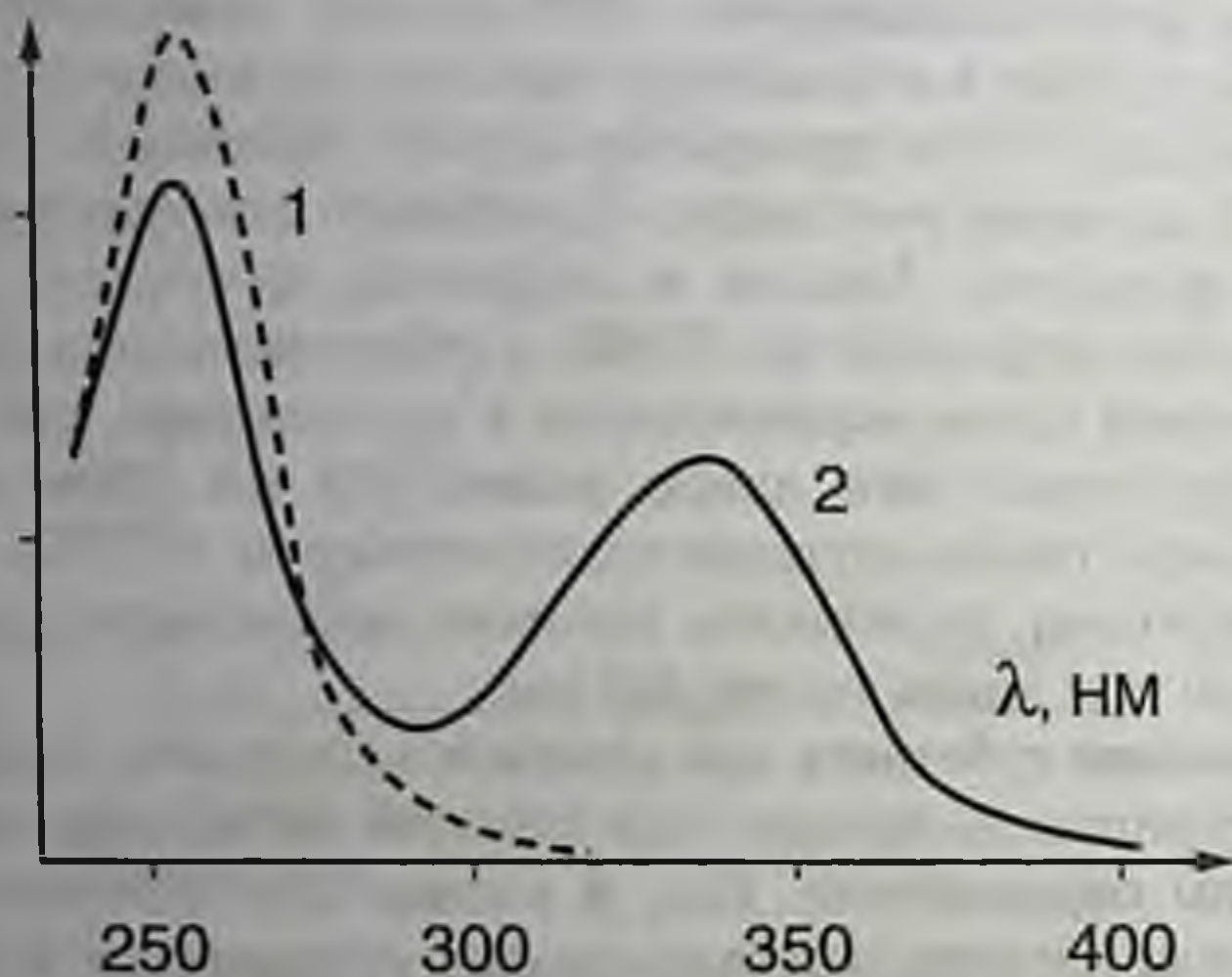
### 12.6.3.3. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ПРОДУКТА РЕАКЦИИ ИЛИ СУБСТРАТА

Об активности фермента судят по количеству превращенного субстрата или образовавшегося продукта реакции за определенный промежуток времени. Существует несколько способов определения концентрации продукта реакции или субстрата.

- **Прямое фотометрирование.** Этот способ применяют, если субстрат или один из продуктов реакции можно определить фотометрически. Таким продуктом служит, например, *p*-нитрофенол (*p*-НФ), поэтому этот подход используют при определении активности фосфатаз. Кислая и щелочная фосфатаза гидролизует *p*-нитрофенилфосфат (*p*-НФФ) с образованием *p*-НФ, который в щелочной среде окрашивается в желтый цвет, его определяют фотометрически при длине волны 405 нм. При определении активности гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТП) также образуется продукт, количество которого можно определить фотометрически при длине волны 405 нм.
- **Окрашивание субстрата или продукта красителем.** Если напрямую фотометрировать продукт или субстрат не удастся, то его дополнительно окрашивают. Так, в методе определения активности  $\alpha$ -амилазы Каравея субстрат-крахмал окрашивают йодом. В методе Райтмана–Френкеля при определении активности трансаминаз продукт пируват окрашивают 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ).
- **Тест Варбурга.** В биохимии фотометрические измерения в большинстве случаев проводят непосредственно при протекании биохимических реакций, в процессе которых потребляются субстраты, повышается концентрация продуктов реакций или меняются кофакторы реакций. В некоторых методах используют ферментативную реакцию с участием кофермента никотинамидадениндинуклеотид (НАД) или НАДФ. Оказалось, что восстановленные и окисленные формы коферментов НАД и НАДФ имеют различные спектры абсорбции при длине световой волны 340 нм. Для простоты обычно восстановленные формы НАД и НАДФ изображают символами НАДН<sub>2</sub> и НАДФН<sub>2</sub>.

В окисленной форме НАД и НАДФ имеют одну узкую полосу абсорбции с максимумом при 260 нм (зависит от аденина в их структуре), в восстановленной форме (НАДН<sub>2</sub> и НАДФН<sub>2</sub>) абсорбция света в этой зоне понижается, и появляется широкая полоса абсорбции при 340 нм (обусловлена исчезновением одной двойной связи

в никотинамидном комплексе кофермента при его восстановлении), что отражено на рис. 12.22. На основе этого феномена немецким биохимиком О. Варбургом был разработан оптический тест. В настоящее время этот тест широко используют для быстрого количественного определения содержания низкомолекулярных компонентов (например, глюкозы в гексокиназном методе) и активности многих ферментов.



**Рис. 12.22.** Оптический тест О. Варбурга. Спектры абсорбции: 1 — никотинамидадениндинуклеотида (сплошная линия) и никотинамидадениндинуклеотидфосфата (пунктирная линия); 2 — восстановленные формы никотинамидадениндинуклеотида и никотинамидадениндинуклеотидфосфата

Различают прямой и непрямой оптический тест Варбурга. В прямом оптическом тесте в инкубационную среду добавляют кофермент НАД или НАДН<sub>2</sub>, буферный раствор, источником фермента служит исследуемый материал — чаще всего сыворотка или плазма крови. В зависимости от выбранных условий (в данном случае значение рН) реакция, катализируемая ферментом (в данном случае ЛДГ), может протекать в обоих направлениях (рис. 12.23).

Непрямой оптический тест Варбурга включает, помимо основной реакции, индикаторную и вспомогательные реакции, то есть феномен Варбурга используют не прямо в ходе основной реакции, а только на этапе индикаторной реакции для регистрации конечного результата. Типичным примером такого типа реакции может служить используемый для определения активности АЛТ вариант сопряжения этих реакций (рис. 12.24).

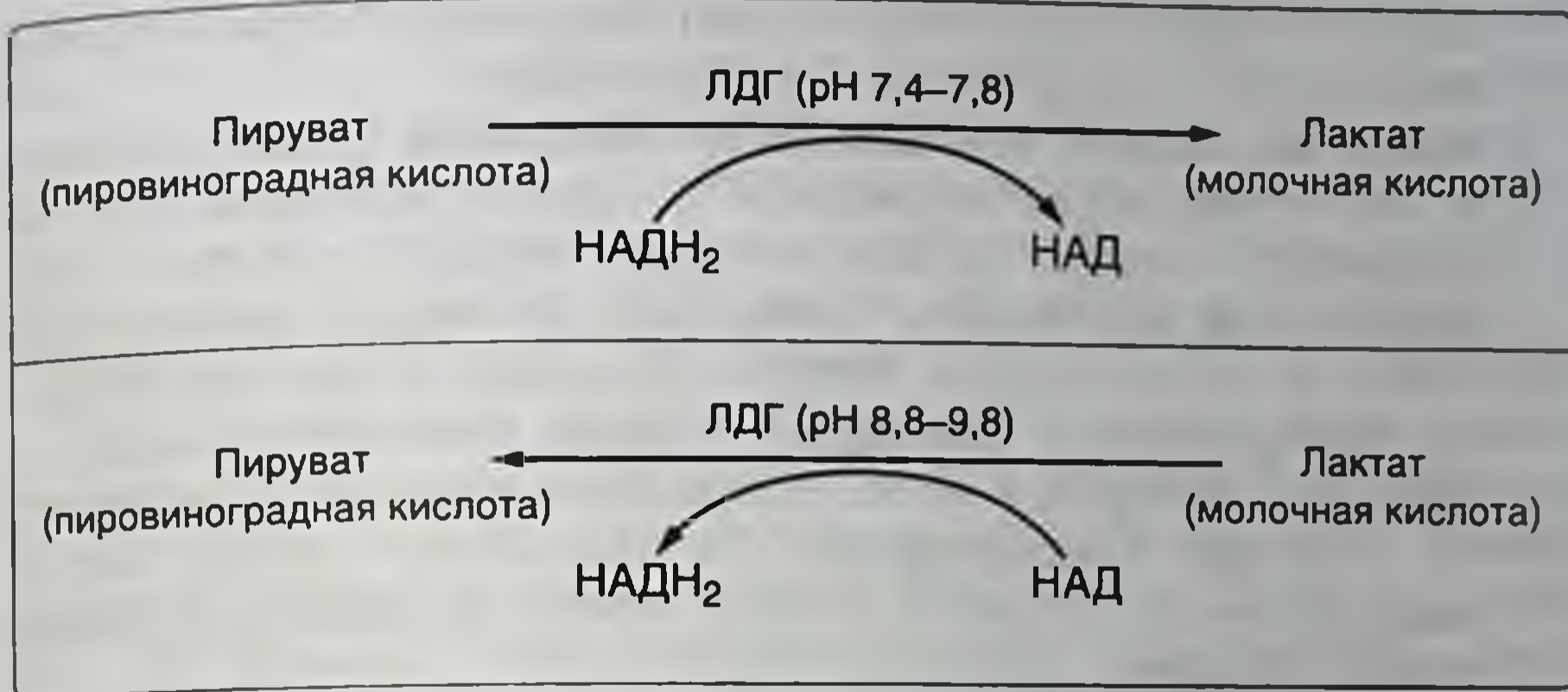
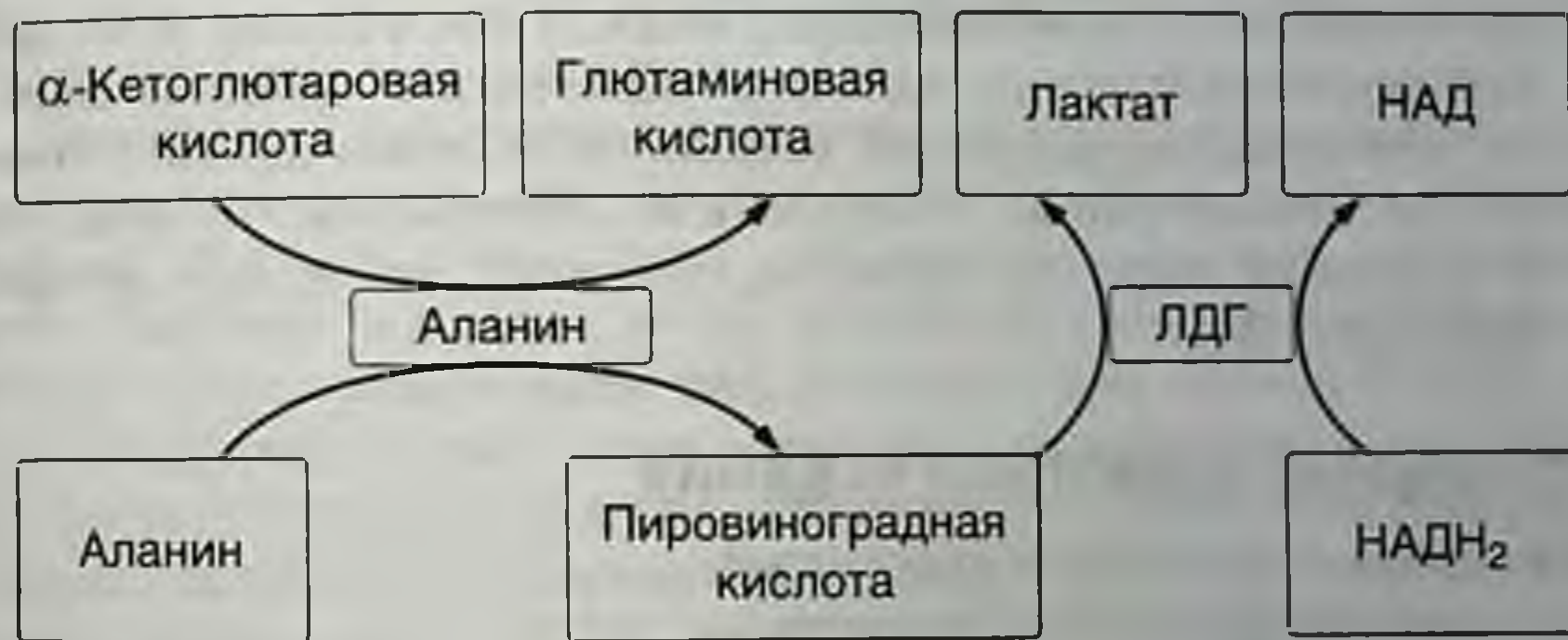


Рис. 12.23. Прямой оптический тест Варбурга



Аминотрансферазная реакция  
 Образование кетокислоты  
 Основная реакция

Дегидрогеназная реакция  
 Определение кетокислоты  
 Индикаторная реакция

Рис. 12.24. Определение активности аланинаминотрансферазы непрямым оптическим тестом Варбурга

#### 12.6.3.4. СПОСОБЫ РАСЧЕТА АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

В зависимости от метода определения активности фермента применяют различные варианты расчета.

- Расчет по стандарту.** Данный метод расчета используют, если в состав набора реактивов входит стабильный калибратор. Как правило, им служит раствор продукта реакции известной концентрации. При этом на всей области определения активности фермента оптическая абсорбция реакционной смеси должна

линейно зависеть от концентрации продукта (субстрата), то есть подчиняться закону Бугера–Ламберта–Бера.

- **Расчет активности фермента по калибровочной кривой** проводят в том случае, когда оптическая абсорбция реакционной смеси нелинейно зависит от концентрации продукта реакции. При нелинейной зависимости оптической абсорбции реакционной смеси от концентрации продукта реакции в процессе анализа одновременно с опытными пробами инкубируют не менее четырех стандартных проб, содержащих продукт в различных, но известных концентрациях. По полученным данным строят калибровочный график и по нему находят активность фермента в опытной пробе.
- **Расчет по коэффициенту абсорбции продукта или кофермента.** Данный метод расчета активности фермента применяют, если продукты реакции обладают оптической абсорбцией, и их прямое фотометрирование можно осуществить в процессе анализа, а оптическая абсорбция реакционной смеси линейно зависит от концентрации продукта или кофермента, то есть, как и в первом варианте расчетов, подчиняется закону Бугера–Ламберта–Бера.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ

1. Что собой представляют ферменты?
2. Перечислите функции ферментов.
3. Как формулируют название ферментов?
4. Для каких целей используют определение активности ферментов в сыворотке крови?
5. В каких единицах выражают активность ферментов сыворотки крови?
6. Назовите группы методов, используемых в КДЛ для определения активности ферментов.
7. Что такое тест Варбурга?
8. Перечислите способы расчета активности ферментов.

### 12.6.4. МАРКЕРЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Значительную долю среди пациентов, обращающихся за неотложной медицинской помощью, занимают больные с острой болью в животе. Последняя почти всегда служит признаком неотложных хирургических

состояний, таких как острый аппендицит, острый холецистит, кишечная непроходимость, перфоративная язва желудка или расслаивающая аневризма аорты. Часть пациентов, у которых главным симптомом является боль в животе, могут страдать острым панкреатитом — воспалительным заболеванием поджелудочной железы, потенциально угрожающим жизни больного. За последние годы частота этого заболевания значительно увеличилась. Оно занимает теперь 3-е место в структуре острых хирургических заболеваний органов брюшной полости после острого аппендицита и острого холецистита, составляя 9–12,5% частоты ургентных заболеваний (требующих оказания неотложной медицинской помощи) органов брюшной полости (от 235 до 331 случая на 1 млн жителей). Острый послеоперационный панкреатит — также весьма часто встречаемое и наиболее тяжелое осложнение в хирургии органов пищеварения. Он возникает, как правило, в раннем послеоперационном периоде в 6,4–12,4% случаев по отношению к операциям на органах брюшной полости.

При остром панкреатите клинические проявления болезни могут широко варьировать, что не позволяет быстро и точно установить диагноз. В связи с этим роль лабораторных методов исследования имеет большое, а в ряде случаев решающее значение (например, при остром послеоперационном панкреатите, когда патологический процесс в поджелудочной железе «прикрыт» клиническими проявлениями послеоперационного периода). Диагностика острого панкреатита сложна, ошибки на догоспитальном этапе составляют 48,3%, в приемном отделении — 21,7%, стационаре при поступлении — 14,7%. Изменение в лабораторных тестах в виде значительного повышения активности  $\alpha$ -амилазы и/или липазы в сыворотке крови при острой боли в животе предполагает наличие острого панкреатита.

#### 12.6.4.1. СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Поджелудочная железа расположена забрюшинно на уровне I–II поясничного позвонка, простираясь в поперечном направлении от двенадцатиперстной кишки до ворот селезенки. Длина ее от 15 до 23 см, ширина от 3 до 9 см, а толщина от 2 до 3 см. Масса железы в среднем составляет 70–90 г. В поджелудочной железе различают головку, тело и хвост. Головка расположена в изгибе двенадцатиперстной кишки и имеет молоткообразную форму. Тело поджелудочной железы передней поверхностью прилежит к задней стенке желудка. Хвост поджелудочной железы нередко глубоко вдается в ворота селезенки (рис. 12.25).



Рис. 12.25. Анатомия поджелудочной железы: 1 — селезеночная вена; 2 — главный панкреатический проток

В гистологическом строении поджелудочной железы различают две функционально различные ткани, что отражает ее двойную роль. Поджелудочная железа — орган внешней и внутренней секреции. Около 90% паренхимы железы представлено так называемой ацинарной (железистой) тканью, которая отвечает за продукцию панкреатического сока, необходимого для нормального пищеварения в кишечнике. В этом состоит экзокринная функция поджелудочной железы. Среди паренхиматозных клеток поджелудочной железы располагаются особые клетки, которые образуют скопления величиной около 1 мм, так называемые панкреатические островки (островки Лангерганса). Они не имеют выводных протоков и синтезируют и секретируют непосредственно в кровь гормоны — инсулин и глюкагон, которые играют важнейшую роль в регуляции уровня глюкозы в крови. Секретируя в кровь инсулин и глюкагон, поджелудочная железа тем самым выполняет свою эндокринную функцию.

Экзокринная секреция поджелудочной железы состоит в выделении пищеварительных ферментов и жидкости, богатой электролитами. Ацинарные клетки железы отвечают за синтез и секрецию пищеварительных ферментов, а centroacinarные и эпителиальные клетки протоков — за секрецию жидкости, которая транспортирует ферменты



в двенадцатиперстную кишку, где они активируются. Ацинарные клетки располагаются вокруг микроскопических выводных протоков, образуя функциональные единицы — ацинусы. Ацинарная ткань состоит из миллионов таких функциональных единиц. Протоки постепенно сливаются во все большие по размеру. Они собирают панкреатический сок из всех ацинусов в один большой главный (вирсунгов) проток. В головке поджелудочной железы главный проток соединяется с общим желчным протоком, который проходит через головку железы ближе к ее задней поверхности и открывается на вершине большого дуоденального (фатерова) соска в двенадцатиперстную кишку. Панкреатический сок и желчь поступают в двенадцатиперстную кишку, что регулируется сфинктером Одди. Такое анатомическое расположение главного панкреатического протока имеют около 80% всех пациентов. У значительно меньшего числа пациентов определяется отдельный от желчного проток поджелудочной железы, который впадает в двенадцатиперстную кишку на 1 см выше фатерова соска.

Внешнесекреторным продуктом ацинарной ткани поджелудочной железы служит панкреатический сок, который представляет собой водянистую жидкость щелочной реакции (рН около 8,0). Она содержит смесь многих пищеварительных ферментов и электролитов (натрий, калий, хлор и бикарбонат натрия). За сутки поджелудочная железа выделяет 1500—3000 мл панкреатического сока. Его функция состоит в ферментативном расщеплении пищи в тонкой кишке, которое уже началось в ротовой полости, пищеводе и желудке.

Ферменты поджелудочной железы образуются и хранятся в ацинарных клетках в зимогенных гранулах. После стимуляции, например, пищей, происходит увеличение секреции ферментов поджелудочной железы. Каждая гранула содержит в различном соотношении все ферменты поджелудочной железы. Ферменты в гранулах обычно находятся в «уплотненном» состоянии и растворяются после их экскреции из клетки в щелочном секрете поджелудочной железы. Однако растворение ферментов происходит в неактивной (проферментной) форме, а переход в активную форму — не ранее чем они попадут в двенадцатиперстную кишку. В этом заключается механизм защиты поджелудочной железы от самопереваривания.

Поджелудочная железа обладает большой метаболической активностью и секретирует различные ферменты, состоящие из трех группы в зависимости от субстрата, на который они действуют. Амилаза расщепляет углеводы, липаза — жиры, а протеолитические ферменты (протеазы) — белки. Основные пищеварительные ферменты поджелудочной железы приведены в табл. 12.13.

Таблица 12.13. Пищеварительные ферменты поджелудочной железы

Фермент	Мишень
Амилаза	$\alpha$ -1,4-Гликозидные связи крахмала, гликогена
Липаза	Триглицериды (образование моноглицеридов и жирных кислот)
Фосфолипаза А <sub>2</sub>	Фосфотидилхолин (образование лизофосфотидилолина и жирных кислот)
Карбоксилэстераза	Эфиры холестерина, жирорастворимых витаминов; три-, ди-, моноглицериды
Трипсин	Внутренние связи белка (основные аминокислоты)
Химотрипсин	Внутренние связи белка (ароматические аминокислоты)
Эластаза	Внутренние связи белка (нейтральные аминокислоты)

Протеолитические ферменты выделяются в просвет двенадцатиперстной кишки в неактивном состоянии, активация их наступает под влиянием энтерокиназы — фермента кишечного сока. Липаза также выделяется в просвет кишечника в неактивном состоянии, а активатором ее служат желчные кислоты. В присутствии последних липаза расщепляет нейтральные жиры на глицерин и жирные кислоты. Амилаза, в отличие от других ферментов, выделяется клетками поджелудочной железы в активном состоянии, расщепляет крахмал до мальтозы. Последняя под влиянием фермента мальтазы расщепляется до глюкозы.

Регуляция секреции поджелудочной железы осуществляется воздействиями различных веществ на рецепторы мембраны ацинарных клеток. Одни из них служат стимуляторами панкреатической секреции, другие — ингибиторами. К стимуляторам относят вазоактивный интестинальный пептид, холецистокинин, ацетилхолин, гастрин-рилизинг пептид, субстанцию Р. Ингибиторы панкреатической секреции представлены панкреатическим пептидом, пептидом YY, соматостатином, глюкагоном, панкреастатином (последние два секретируются клетками островков Лангерганса) и нейропептидами.

#### 12.6.4.2. ФЕРМЕНТЫ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Активация панкреатических ферментов при остром панкреатите на месте в очагах повреждения поджелудочной железы и нарушение оттока секрета поджелудочной железы по протоковой системе способствуют их попаданию в кровь. Исследование активности панкреатических ферментов в крови больного играет важнейшую роль в диагностике острого панкреатита.

Изучение ферментов поджелудочной железы в процессе развития острого панкреатита показало, что наиболее распространенным и ценным для диагностики этого заболевания служит исследование  $\alpha$ -амилазы и липазы. Определение активности  $\alpha$ -амилазы и липазы — весьма чувствительные и ценные лабораторные маркеры для диагностики острого панкреатита и контроля эффективности лечения.

#### 12.6.4.2.1. $\alpha$ -Амилаза

$\alpha$ -Амилазу относят к группе гидролаз, катализирующих гидролиз полисахаридов, включая крахмал и гликоген, до простых моно- и дисахаридов (мальтоза, глюкоза). Наиболее богаты амилазой поджелудочная и слюнные железы. Амилаза секретируется в кровь главным образом из этих органов. Плазма крови человека содержит  $\alpha$ -амилазы двух изозимных типов: панкреатическую (P-тип), вырабатываемую поджелудочной железой, и слюнную (S-тип), продуцируемую слюнными железами.

В физиологических условиях амилаза сыворотки крови состоит на 40% из амилазы панкреатической и 60% — из слюнной. Референтные величины активности  $\alpha$ -амилазы: в сыворотке крови — 25–220 МЕ/л; в моче — 10–490 МЕ/л.

С мочой выделяется в основном панкреатическая амилаза, что служит одной из причин большей информативности о функциональном состоянии поджелудочной железы уроамилазы, чем амилазы сыворотки крови. Полагают, что 65% амилазной активности мочи обусловлено панкреатической амилазой. Этим объясняют, что при остром панкреатите именно она увеличивается в сыворотке (до 89%) и особенно в моче (до 92%) без изменения показателей амилазы слюнных желез.

Определение активности  $\alpha$ -амилазы имеет особое значение в диагностике заболеваний поджелудочной железы. Повышение активности  $\alpha$ -амилазы в сыворотке крови в 2 раза и более следует расценивать как симптом поражения поджелудочной железы. Небольшая гипер-амилаземия позволяет заподозрить патологию поджелудочной железы, но иногда возможна при заболеваниях других органов.

#### 12.6.4.2.2. Липаза

Липаза — фермент, катализирующий расщепление триглицеридов на глицерин и высшие жирные кислоты. Этот фермент в организме человека вырабатывается рядом органов и тканей, что позволяет различать липазу желудочного происхождения, поджелудочной железы, легких, кишечного сока, лейкоцитов и др. Наиболее важной с клинической точки зрения является липаза поджелудочной железы. Поскольку

основным источником липазы служит поджелудочная железа, при ее заболеваниях происходит значительный выброс фермента в циркулирующую кровь. Референтные величины активности липазы в сыворотке крови составляют 0–190 МЕ/л.

### 12.6.4.3. ПРИЧИНЫ И КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПОВЫШЕНИЯ УРОВНЯ ФЕРМЕНТОВ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Острый панкреатит — основная причина повышения в крови активности амилазы и липазы. Это острое заболевание, в основе которого лежит повреждение ткани поджелудочной железы вследствие преждевременной активации протеолитических ферментов, в норме образующихся в поджелудочной железе в неактивной форме. Активация этих ферментов внутри железы ведет к ее самоперевариванию и разрушению.

Наиболее частые причины острого панкреатита — временное затруднение оттока панкреатического сока камнями желчных путей (вспомним, что перед впадением в двенадцатиперстную кишку главный проток поджелудочной железы соединяется с общим желчным протоком) и злоупотребление алкоголем. Примерно 80–90% пациентов с острым панкреатитом страдают желчнокаменной болезнью или злоупотребляют алкоголем. Другие менее частые причины острого панкреатита, а их известно более 140, включают травму железы (в том числе и операционную), вирусные инфекции (паротит, краснуха, гепатит А и В, энтеровирусы) и прием некоторых лекарств [цитостатики, ацетилсалициловая кислота (Аспирин<sup>®</sup>), тетрациклин, фуросемид и др.].

Основной клинический симптом острого панкреатита — внезапная резкая боль в верхней части живота, которая нередко иррадирует в спину. Довольно часто боль сопровождается рвотой и повышением температуры тела. Течение болезни variabelно. Острый панкреатит легкого течения, или так называемый интерстициальный (отечный), проходит при проведении медикаментозного лечения через несколько дней или неделю без отдаленных последствий. В случае тяжелого течения (такой панкреатит называют некротическим) острый панкреатит представляет собой состояние, угрожающее жизни больного. При этом самопереваривание поджелудочной железы вызывает распространенные некрозы, воспаление и кровоизлияния не только в поджелудочной железе, но и в окружающих органах (кишечник, большой сальник, брюшинное пространство). У таких больных часто развиваются шок и тяжелая артериальная гипотензия. Осложнениями тяжелого панкреатита служат сердечная и дыхательная недостаточность, желтуха, анемия, гипокалиемия, синдром диссеминированного внутрисосу-

дистого свертывания (ДВС) и сепсис с полиорганной недостаточностью. Интерстициальный панкреатит составляет около 80% всех случаев заболевания, обычно имеет сравнительно легкое, поддающееся медикаментозному лечению течение и разрешается без осложнений. Смертность низкая — от 1 до 3%, в то время как при некротическом панкреатите (20% случаев) смертность составляет от 10 до 30%, особенно если течение панкреонекроза осложнилось инфекцией.

Повреждение ацинарных клеток поджелудочной железы, выход из них ферментов и их местная активация, а также нарушение оттока панкреатического сока вследствие отека протоков сопровождаются массивным поступлением панкреатических ферментов в кровоток. Среди этих ферментов присутствует и амилаза, и липаза. Именно поэтому обнаружение в крови повышенного уровня амилазы (гиперамилаземия) и липазы (гиперлипаземия) считают маркером повреждения поджелудочной железы.

При остром панкреатите активность амилазы крови и мочи увеличивается в 10—30 раз. Гиперамилаземия наступает в начале заболевания (уже через 4—6 ч после появления клинических симптомов), достигает максимума через 12—24 ч, затем быстро снижается и приходит к норме на 2—6-е сутки. Зависимости между уровнем повышения сывороточной амилазы и тяжестью панкреатита нет. Именно поэтому высокие значения амилазы в сыворотке крови могут быть выявлены у больных с легкой формой панкреатита и, наоборот, низкие — при тяжелой форме заболевания. Если у пациента с болью в животе активность амилазы повышена более чем в 5 раз по сравнению с нормой, можно подозревать у него острый панкреатит. Поскольку у незначительной части больных с острым панкреатитом уровень фермента повышен менее значительно, этот диагноз нельзя исключить при повышениях активности фермента в 2—3 раза. Очень редко острые панкреатиты могут протекать без повышения активности амилазы (в частности, при панкреонекрозе).

Активность амилазы в моче начинает повышаться (гиперамилазурия) через 6—10 ч после острого приступа панкреатита и возвращается к норме через 3 сут.

Обнаружение гиперамилаземии и гиперамилазурии служит важным, но не специфическим феноменом для острого панкреатита; кроме того, повышение активности этих ферментов бывает кратковременным.

Оценка результатов исследования активности амилазы в крови и моче затруднена тем, что фермент содержится в слюнных железах, толстой кишке, скелетных мышцах, почках, легких, яичниках, маточных трубах, предстательной железе. Именно поэтому уровень

амилазы может быть повышен при целом ряде заболеваний, имеющих сходную клиническую картину с острым панкреатитом: острым аппендиците, перитоните, перфоративной язве желудка и двенадцатиперстной кишки, кишечной непроходимости, холецистите, тромбозе брыжеечных сосудов, а также при феохромоцитоме, диабетическом ацидозе, после операций по поводу пороков сердца, резекции печени. Повышение амилазной активности при этих заболеваниях обусловлено целым рядом причин и носит в большинстве случаев реактивный характер. Вследствие значительных запасов амилазы в ацинарных клетках любое нарушение их целостности или малейшее затруднение оттока секрета поджелудочной железы может привести к значительному попаданию амилазы в кровь. Обычно активность  $\alpha$ -амилазы при перечисленных заболеваниях повышается в крови в 3–5 раз.

Хронический панкреатит, в отличие от острого, — длительно текущий воспалительный процесс, развивающийся медленно и необратимо. Наиболее частой причиной хронического панкреатита служит длительное злоупотребление алкоголем. Основной клинический симптом хронического панкреатита — постоянная или периодическая боль в животе. Заболевание проявляется нарушением всасывания пищи вследствие недостатка панкреатических ферментов и потерей массы тела.

На ранних стадиях хронического панкреатита активность амилазы в крови и моче повышается (у 10–88 и 21–70% больных соответственно) в период обострения процесса. Однако по мере прогрессирования заболевания, так как продукция ферментов снижается, уровень амилазы в сыворотке крови уменьшается до нормы, а иногда даже ниже ее. Поскольку активность амилазы при хроническом панкреатите у многих пациентов может быть в норме, ее исследование считают малоинформативным для диагностики этого заболевания.

Кроме острого и хронического панкреатита, серьезным заболеванием поджелудочной железы считают рак. При раке поджелудочной железы уровень амилазы в крови и моче иногда повышается, в других случаях их активность в пределах нормы или даже снижена. Этот тест считают малоинформативным для диагностики рака поджелудочной железы.

Определение активности липазы в крови — наиболее информативный критерий диагностики острого панкреатита. Существует ошибочное представление, что при остром панкреатите содержание липазы в крови увеличивается позже, чем амилазы, но остается повышенным более продолжительное время. На самом деле содержание липазы увеличивается и снижается одновременно с повышением и снижением активности амилазы, но нормализация ее уровня происходит позже,

чем у амилазы. Иногда уровень липазы в крови повышается раньше, чем увеличивается активность амилазы, и остается повышенным длительное время.

При остром панкреатите активность липазы в крови увеличивается в течение нескольких часов после острого приступа, достигая максимума через 12–24 ч (увеличивается до 200 раз), и остается повышенной в течение 10–12 дней. Прогноз заболевания считают плохим, если уровень липазы в крови повышается в 10 раз и более и не снижается до 3-кратного превышения нормы в течение ближайших нескольких дней. Одновременное определение уровня  $\alpha$ -амилазы и липазы — основа диагностики острого панкреатита. Повышение обоих или одного из ферментов определяют у 98% больных острым панкреатитом. Динамика активности  $\alpha$ -амилазы и липазы в крови при неосложненном панкреатите представлена на рис. 12.26.

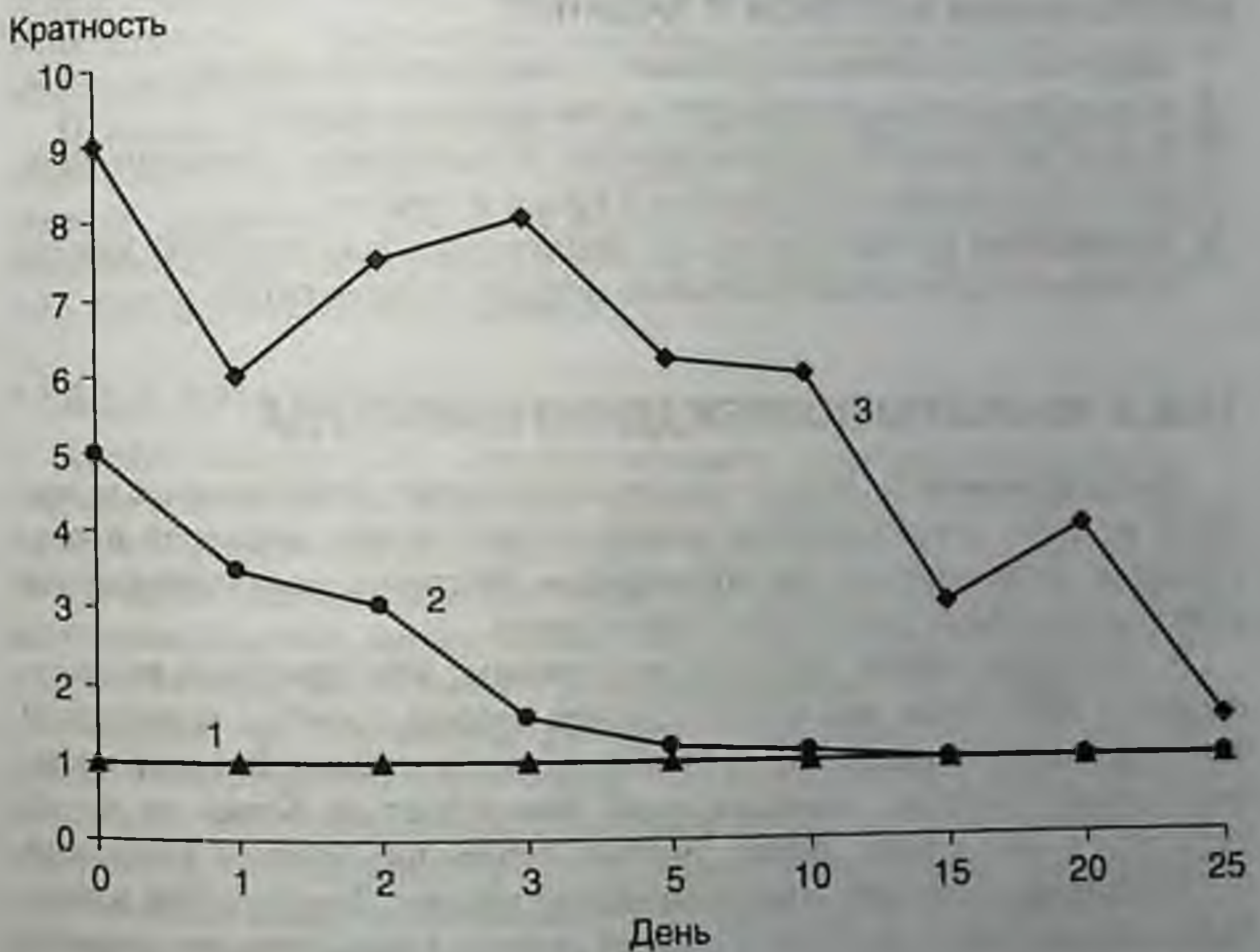


Рис. 12.26. Динамика активности  $\alpha$ -амилазы и липазы в крови при неосложненном панкреатите. На абсциссе указана кратность повышения активности ферментов, на ординате — день от начала заболевания: 1 — нормальные величины активности ферментов; 2 — динамика активности  $\alpha$ -амилазы; 3 — динамика активности липазы

В отличие от амилазы, активность липазы не повышается при паротите, внематочной беременности, раке легких, аппендиците.

Активность липазы сыворотки крови обладает высокой чувствительностью, особенно в отношении диагностики острого алкогольного панкреатита, в то время как для больных с закупоркой желчевыводящих путей, большого дуоденального сосочка и панкреатических протоков характерен высокий уровень амилазы. В связи с этим для установления этиологии острого панкреатита иногда определяют липазо-амилазовый коэффициент: отношение активности липазы к активности амилазы в сыворотке крови. Величина липазо-амилазового коэффициента выше 2,0 позволяет диагностировать острый алкогольный панкреатит. Только у пациентов с острым алкогольным панкреатитом коэффициент может быть выше 5,0.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ

1. Перечислите основные функции поджелудочной железы.
2. Какие ферменты синтезирует поджелудочная железа?
3. Какие заболевания сопровождаются повышением активности ферментов поджелудочной железы в крови и почему?
4. Повышение активности каких ферментов поджелудочной железы указывает на наличие у больного острого панкреатита?

## 12.6.5. МАРКЕРЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ МИОКАРДА

Инфаркт миокарда (ИМ) — острое заболевание, возникающее вследствие резкого несоответствия между потребностью миокарда в кислороде и доставкой его по коронарным артериям, заканчивающееся развитием некроза части сердечной мышцы.

В настоящее время считают доказанным, что причиной развивающегося ИМ более чем в 80% случаев служит тромбоз коронарной артерии, возникающий, как правило, на месте имеющейся атеросклеротической бляшки с поврежденной поверхностью. Кровь не может течь через этот сосуд, лишая участок сердечной мышцы кислорода и питательных веществ. Кардиомиоциты гибнут. Локализация и протяженность области инфаркта зависят от того, какая ветвь коронарной артерии закупорена. По мере гибели кардиомиоциты высвобождают в кровоток огромное количество биологически активных веществ, в том числе внутриклеточные ферменты, включая АСТ, КК, ЛДГ, а также ряд специфических белков, таких как миоглобин, тропонины Т и I. Активность миокардиальных ферментов и концентрация миокар-



диальных белков в плазме крови возрастает. Определение уровня некоторых из них в сыворотке крови используют в клинической практике в качестве маркеров (указателей) повреждения миокарда — миокардиальных маркеров.

### 12.6.5.1. АСПАРТАМИНОТРАНСФЕРАЗА

Аспаратаминотрансфераза (АСТ) катализирует перенос аминокислотной группы с аспарагиновой кислоты (аминокислота) на  $\alpha$ -кетоглутаровую кислоту. Продуктами этой реакции служат глутаминовая аминокислота и оксалоацетат. Эта реакция является частью обмена аминокислот и осуществляется во всех метаболически активных клетках. Именно поэтому АСТ широко распространена в тканях человека (сердце, печень, скелетная мускулатура, почки, поджелудочная железа, легкие и др.). Миокард, печень и скелетные мышцы — наиболее богатые источники АСТ. Референтные величины активности АСТ в сыворотке крови составляют 10—30 МЕ/л.

Повышение активности АСТ в крови наблюдают при целом ряде заболеваний, особенно при поражении органов и тканей, богатых данным ферментом. Наиболее резкие изменения в активности АСТ происходят при поражении сердечной мышцы. Активность фермента у 93—98% больных ИМ повышена.

### 12.6.5.2. КРЕАТИНКИНАЗА

Креатинкиназа (КК) (другое название креатинфосфокиназа) — фермент, который катализирует перенос фосфата с креатинфосфата на АДФ. Продуктами реакции служат креатин и АТФ. Наиболее богата КК скелетная мускулатура, сердечная мышца, меньше ее в мозге, щитовидной железе, матке, легких. КК состоит из двух белковых субъединиц (М и В), что позволяет идентифицировать три функционально одинаковых, но структурно различных изофермента КК: КК-ММ (мышечный), КК-МВ (сердечный), КК-ВВ (мозговой). При определении активности КК в сыворотке крови в лаборатории определяют суммарную (общую) активность всех изоферментов, но можно определить и активность каждого изофермента в отдельности. Изоферменты КК органоспецифичны. В сердечной мышце в основном представлен изофермент КК-МВ, в мышцах — КК-ММ, в головном мозге — КК-ВВ. В клинической практике нашли применение только исследование активности общей КК и МВ-изофермента КК. Они полезны для диагностики ИМ, их рассматривают как «миокардиальные ферменты». Повышение активности КК в сыворотке крови наблюдают из-за выхо-

да фермента из клеток при их повреждении. Общая КК в сердечной мышце состоит из двух изоферментов: КК-ММ и КК-МВ, КК-ВВ отсутствует. Поскольку большая часть КК-МВ в сыворотке крови происходит из миокарда, определение активности этого изофермента более специфично для повреждения миокарда, чем определение уровня общей КК (суммы всех изоферментов). Референтные величины активности общей КК в сыворотке крови составляют у мужчин — 52–200 МЕ/л, у женщин — 35–165 МЕ/л; активность МВ-фракции КК составляет 6% общей активности КК или 0–24 МЕ/л.

При ИМ поступление КК и КК-МВ из сердечной мышцы в сыворотку опережает другие ферменты. Именно поэтому определение КК нашло наиболее широкое применение в ранней диагностике ИМ.

### 12.6.5.3. ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗА

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) — фермент, катализирующий отщепление водорода от молекулы молочной кислоты (лактата). Продуктом реакции служит пировиноградная кислота (пируват). Это важнейшая реакция анаэробного метаболизма глюкозы, которая присутствует во многих клетках. Именно поэтому ЛДГ широко распространена в тканях организма человека. Наибольшая ее активность обнаружена в почках, сердечной мышце, скелетной мускулатуре и печени. ЛДГ содержится не только в сыворотке, но и в значительном количестве в эритроцитах, поэтому сыворотка для исследования должна быть без следов гемолиза. Большинство органов и тканей человека содержит 5 изоферментов ЛДГ. Характер изоферментного спектра ЛДГ и тип обмена веществ в ткани коррелируют между собой. В тканях с преимущественно аэробным обменом веществ (сердце, мозг, почки) наибольшей ЛДГ-активностью обладают изоферменты ЛДГ1 и ЛДГ2. В тканях с выраженным анаэробным обменом веществ (печень, скелетная мускулатура) преобладают изоферменты ЛДГ4 и ЛДГ5. В сыворотке крови здорового человека постоянно обнаруживают все 5 изоферментов ЛДГ. Имеется закономерность в отношении активности изоферментов: активность ЛДГ2 > ЛДГ1 > ЛДГ3 > ЛДГ4 > ЛДГ5. Повреждение того или иного органа изменяет изоферментный спектр сыворотки крови, причем эти изменения обусловлены спецификой изоферментного состава поврежденного органа. В лаборатории наиболее часто определяют активность общей ЛДГ (сумму всех 5 изоферментов), но могут определять более специфичный для сердечной мышцы изофермент ЛДГ1. Референтные величины активности общей ЛДГ в сыворотке крови составляют 208–378 МЕ/л, а ЛДГ1 — 15–25% общей активности ЛДГ.

#### 12.6.5.4. МИОГЛОБИН

Миоглобин — гемсодержащий белок, транспортирующий кислород в скелетных мышцах и миокарде. Он содержится в мышечных клетках и по структуре схож с гемоглобином. Миоглобин слабо связывается с белками крови. При повреждении миокарда и скелетных мышц миоглобин легко и быстро попадает в кровь и затем быстро экскретируется с мочой. Повышение уровня миоглобина в сыворотке крови происходит уже через 2–3 ч после появления боли при ИМ и сохраняется в течение 2–3 сут. Референтные величины содержания миоглобина в сыворотке крови составляет у мужчин 22–66 мкг/л, у женщин — 21–49 мкг/л.

#### 12.6.5.5. ТРОПОНИНЫ

Комплекс тропонина входит в состав сократительной системы клетки мышц, где функционирует как регуляторный белок при взаимодействии актина и миозина во время мышечного сокращения. Он образован тремя белками: тропонином Т (молекулярная масса 3700 Да), тропонином I (молекулярная масса 26 500 Да) и тропонином С (молекулярная масса 18 000 Да). Около 93% тропонина Т содержится в сократительном аппарате миоцитов (эта фракция может быть предшественником для синтеза тропонинового комплекса) и 7% — в цитоплазме. Тропонин Т из сердечной мышцы по аминокислотному составу и иммунным свойствам отличается от тропонина Т других мышц. Тропонин I, как и тропонин Т в сердечной и скелетных мышцах, значительно отличаются по своей аминокислотной последовательности. Это позволило создать диагностические наборы для кардиальных изоформ указанных тропонинов. В норме тропонины Т в сыворотке крови практически не определяются. Референтные величины содержания тропонина Т составляют 0–0,1 нг/мл, а тропонина I — 0–1,0 нг/мл. Именно поэтому обнаружение их уровня в сыворотке крови выше указанных пределов свидетельствует о повреждении сердечной мышцы.

Высококочувствительные (high sensitive — hs) тесты способны определять очень низкие концентрации тропонинов в сыворотке крови, составляющие от 1 до 20 нг/л и находящиеся ниже значений, соответствующих 99-му перцентилю. Следует понимать, что 99-й перцентиль — уровень аналита, при котором 99 из 100 лиц здоровой популяции будут иметь отрицательный результат тестирования (только 1 из 100 может иметь ложноположительный результат). Традиционные тесты на кардиальный тропонин из-за низкой чувствительности не улавливают в крови тропонины ниже 99-го перцентиля. Кроме того, необходимо, чтобы тесты на кардиальные тропонины I или Т имели оптимальную

точность с коэффициентом аналитической вариации (CV) меньше 10%. Чем ниже значения CV, тем меньше отличия при повторных измерениях в одном и том же образце, тем выше точность и меньше ложноположительных результатов. В итоге кардиальные тропонины высокочувствительными тестами обнаруживаются почти у 100% здоровых людей, поэтому «тропонин-отрицательных» пациентов теперь нет. Средние нормальные уровни высокочувствительного кардиального тропонина (hs cTn) составляют 2–5 нг/л, уровни 99-го перцентиля — 14–20 нг/л, в зависимости от конкретного высокочувствительного теста.

### 12.6.5.6. ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ МИОКАРДИАЛЬНЫХ МАРКЕРОВ ПРИ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА

ИМ представляет собой динамический процесс, развитие которого происходит во времени. Повышение активности миокардиальных ферментов и концентрации миокардиальных белков в плазме крови, сопровождающее ИМ, является преходящим феноменом и имеет свои динамические закономерности (рис. 12.27, табл. 12.14).

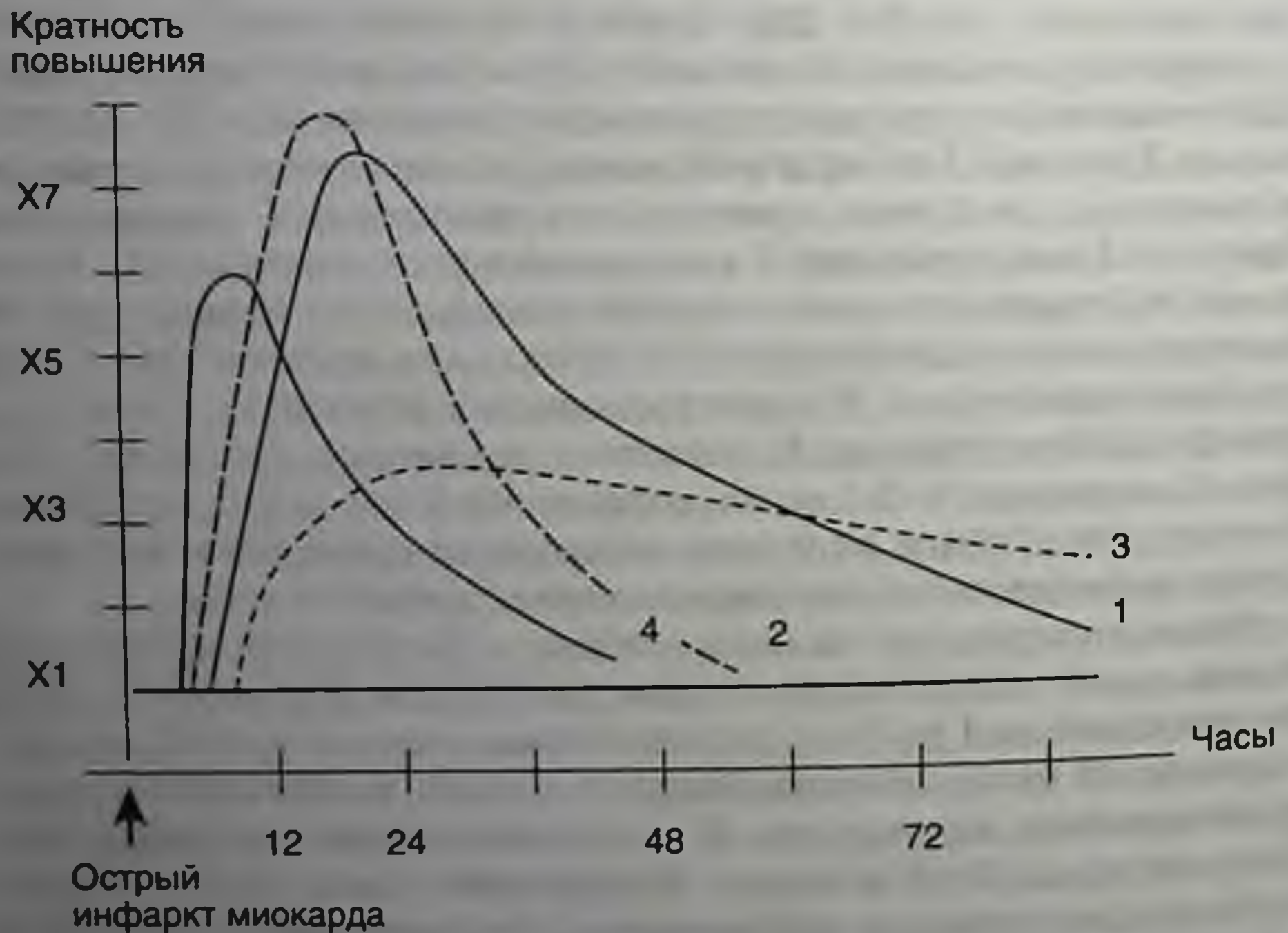


Рис. 12.27. Динамика изменений ферментов у больных с инфарктом миокарда: 1 — креатинкиназа; 2 — МВ-фракция креатинкиназы; 3 — лактатдегидрогеназа; 4 — миоглобин

Таблица 12.14. Динамика изменений маркеров острого инфаркта миокарда

Параметр	Начало увеличения активности, ч	Максимум увеличения активности, ч	Возвращение к норме, сут	Кратность увеличения, раз
АСТ	4–6	24–48	4–7	2–20
КК	2–4	24–36	3–6	3–30
КК-МВ	2–4	12–18	2–3	< 8
ЛДГ	8–10	48–72	6–15	< 8
ЛДГ1	8–10	30–72	7–20	< 8
Миоглобин	0,5–2	6–12	0,5–1	< 20
Тропонин Т	3,5–10	12–18 (и 3–5-й день)	7–20	< 400

В первые 4 ч после закупорки коронарной артерии в зоне ишемии некротизируется около 60% кардиомиоцитов, некроз остальных 40% наступает в течение последующих 20 ч. В результате дефектов, возникающих в цитоплазматических мембранах кардиомиоцитов, белки и ферменты, которые локализируются в цитоплазме, поступают в кровь больного с ИМ со скоростью, зависящей в первую очередь от размера молекул этих белков и ферментов. Выходя за пределы мембраны кардиомиоцитов, ферменты и белки попадают в межклеточную жидкость, оттекают от сердца по лимфатическим сосудам и только затем попадают в общий кровоток. Это и определяет довольно длительный промежуток времени (2–6 ч) от момента гибели кардиомиоцитов до появления миокардиальных маркеров в крови. Вторая особенность выхода в кровь маркеров гибели кардиомиоцитов — характерная динамика нарастания и убывания их концентрации в крови. Она определяется выходом белков из зоны некроза и скоростью их удаления из кровотока. Небольшие молекулы, например миоглобин, выводятся очень быстро, а большие, такие как ЛДГ, медленно. Именно поэтому содержание каждого маркера при ИМ имеет свою динамику. Вместе с тем все они имеют дугообразную динамичную кривую, но только с разными временными параметрами.

АСТ при ИМ повышается в сыворотке через 6–8 ч, максимальной активности она достигает при этом заболевании через 24–36 ч и снижается до нормального уровня к 5–6-му дню. Расширение зоны инфаркта приводит к появлению второго цикла повышения активности. Степень повышения активности АСТ служит мерой массы миокарда, вовлеченной в патологический процесс. Отсутствие снижения ее уровня после 3–4-го дня заболевания прогностически неблагоприятно. При ИМ активность АСТ в крови может увеличиваться в 2–20 раз.

Поступление КК из сердечной мышцы в плазму крови при ИМ опережает другие ферменты, поэтому определение ее нашло наиболее широкое применение в ранней диагностике ИМ. КК повышается уже через 2–4 ч после острого приступа, достигая максимума через 24–36 ч, превышая нормальные величины в 5–20 раз. Активность КК сравнительно быстро возвращается к норме (на 3–6-е сутки).

При ИМ увеличение активности КК-МВ наблюдают уже через 4–8 ч после острого приступа, максимума достигает через 12–24 ч. На 3-и сутки активность изофермента возвращается к нормальным значениям при неосложненном течении ИМ. При расширении зоны инфаркта активность КК-МВ повышена дольше, что позволяет диагностировать инфаркт пролонгированного и рецидивирующего течения. Максимум активности КК-МВ часто достигается раньше максимума активности общей КК. Величина повышения КК и КК-МВ соответствует величине пораженной зоны миокарда.

Повышение активности ЛДГ при ИМ отмечают через 8–10 ч после его начала. Спустя 48–72 ч достигается максимум активности (повышение обычно в 2–4 раза), и она остается увеличенной в течение 10 сут. Эти сроки могут варьировать в зависимости от величины участка поврежденной мышцы сердца. Увеличение активности общей ЛДГ у больных с ИМ идет за счет резкого повышения ЛДГ<sub>1</sub>.

Повышение уровня миоглобина в сыворотке крови преходящее, его наблюдают уже через 2–3 ч после появления боли при ИМ и оно сохраняется в течение 2–3 сут. Степень повышения миоглобина в крови зависит от величины повреждения миокарда. Нормализацию его уровня отмечают у больных с ИМ на 2–3-и сутки. При развитии осложнений ИМ (сердечная недостаточность) уровень миоглобина повышен более 3 сут. Повторные повышения уровня миоглобина в крови на фоне уже начавшейся нормализации могут свидетельствовать о расширении зоны ИМ или образовании новых некротических очагов.

Динамика изменений уровня тропонина Т и I в плазме крови при ИМ отличается от таковой ферментов. При ИМ тропонин Т повышается в крови уже через 3–4 ч после начала болевого приступа, пик его концентрации приходится на 3–4-е сутки, в течение 5–7 дней наблюдают «плато», затем уровень постепенно снижается, но может оставаться повышенным до 10–20-го дня. Концентрация тропонина Т увеличивается после начала ИМ значительно больше, чем КК и ЛДГ. При неосложненном течении ИМ концентрация тропонина Т снижается уже к 5–6-му дню, а к 7-му дню повышенные значения тропонина Т определяют у 60% больных.

Повышение уровня тропонина I в крови отмечают через 4–6 ч после острого приступа, достигает максимума на 2-й день и приходит к норме между 6-ми и 8-ми сутками.

Тропонины T и I служат компонентами сократительного аппарата миокарда и поэтому структурно связанными белками кардиомиоцитов, тогда как растворенные в цитозоле белки (миоглобин) относительно быстро вымываются из зоны некроза. Деструкция сократительного аппарата кардиомиоцитов более продолжительна по времени, поэтому увеличение уровня тропонинов определяют до 8–10 сут и более после начала ИМ.

### 12.6.5.7. РОЛЬ МИОКАРДИАЛЬНЫХ МАРКЕРОВ В ДИАГНОСТИКЕ ИНФАРКТА МИОКАРДА

Среди пациентов, поступающих в больницу с болями в сердце, только у 10–15% имеется ИМ. Необходимость его диагностики в ранние сроки продиктована тем, что тромболитическая терапия (введение больному препаратов, «растворяющих» тромб, который закупорил коронарную артерию) в первые 2–6 ч снижает раннюю смертность у больных в среднем на 30%, а начатая через 7–12 ч — лишь на 13%. Тромболитическая терапия, начатая через 13–24 ч после возникновения ИМ, не снижает уровень смертности.

В большинстве случаев ИМ начинают подозревать на основании выявления у пациента клинических симптомов (острый продолжительный приступ интенсивной загрудинной боли, чувство страха, одышка) и подтверждают наличием характерных изменений на электрокардиограмме (ЭКГ). Последние включают подъем сегмента ST, инверсию зубца T и формирование зубца Q. Однако и при этих условиях определение активности миокардиальных маркеров в сыворотке крови считают обязательным для подтверждения диагноза.

Вместе с тем в 30% случаев ИМ изменения на ЭКГ могут отсутствовать или быть неспецифичны для установления диагноза. Именно в этих трудных для диагностики случаях определение в крови уровня миокардиальных маркеров позволяет или подтвердить диагноз ИМ, если уровни маркеров повышены, или отвергнуть его, если они остаются нормальными.

Термин «миокардиальные маркеры» подразумевает, что используемые для диагностики ИМ ферменты и белки происходят из сердечной мышцы. В действительности это не так. Практически все так называемые миокардиальные ферменты (АСТ, КК и ЛДГ) содержатся в других тканях, и повышение их уровня может быть результатом не только

повреждения миокарда. Это во многом осложняет оценку результатов исследования ферментов, когда необходимо установить диагноз ИМ. Тем не менее на протяжении многих лет определение активности в сыворотке крови АСТ, КК и ее МВ-изофермента и ЛДГ использовали в качестве миокардиальных маркеров для диагностики ИМ. Просто другие маркеры были недоступны для лабораторий. Однако за последние 20 лет были проведены многочисленные клинические исследования с целью оценить эффективность и безопасность обследования и лечения больных с ИМ, результаты были положены в основу международных клинических рекомендаций по ведению таких пациентов.

В клинических рекомендациях указано, что миокардиальные белки (тропонины Т и I) имеют почти абсолютную специфичность для ткани миокарда, а также высокую чувствительность, что позволяет выявлять даже микроскопические участки повреждения миокарда. Исследование тропонинов обязательно для больных с подозрением на ИМ. Кардиальные тропонины должны быть определены при поступлении больного и повторно через 6–12 ч. Дальнейшие повторные исследования проводят через 12–24 ч, если результаты предыдущих исследований были отрицательными, а клиническое подозрение на ИМ высоко. В случае рецидива ИМ определение уровня тропонинов возобновляют через 4–6 ч от начала рецидива и далее повторно через 6–12 ч.

В отношении использования высокочувствительных тестов для диагностики ИМ алгоритм их использования отличается от простых тестов и приведен на рис. 12.28.

Определение уровня миоглобина в сыворотке крови и/или активности МВ-фракции КК следует проводить при недавнем (менее 6 ч от возникновения острых болей за грудиной) появлении клинических симптомов (как ранние маркеры ИМ) и у больных с повторной ишемией после недавнего (менее 2 нед) ИМ для обнаружения рецидива. В случае рецидива ИМ значение исследований миоглобина и КК-МВ возрастает, так как содержание тропонина может оставаться еще повышенным от первоначального эпизода некроза миокарда.

Пациентов с болью в груди и лабораторными результатами тропонинов Т (I) выше верхнего предела референтной величины необходимо рассматривать как с наличием «повреждения миокарда». Их необходимо госпитализировать и интенсивно наблюдать, чтобы снизить риск, связанный с этим повреждением.

Клинические рекомендации однозначно указывают на то исследование активности АСТ, ЛДГ и ее изоферментов не должны использоваться для диагностики ИМ.



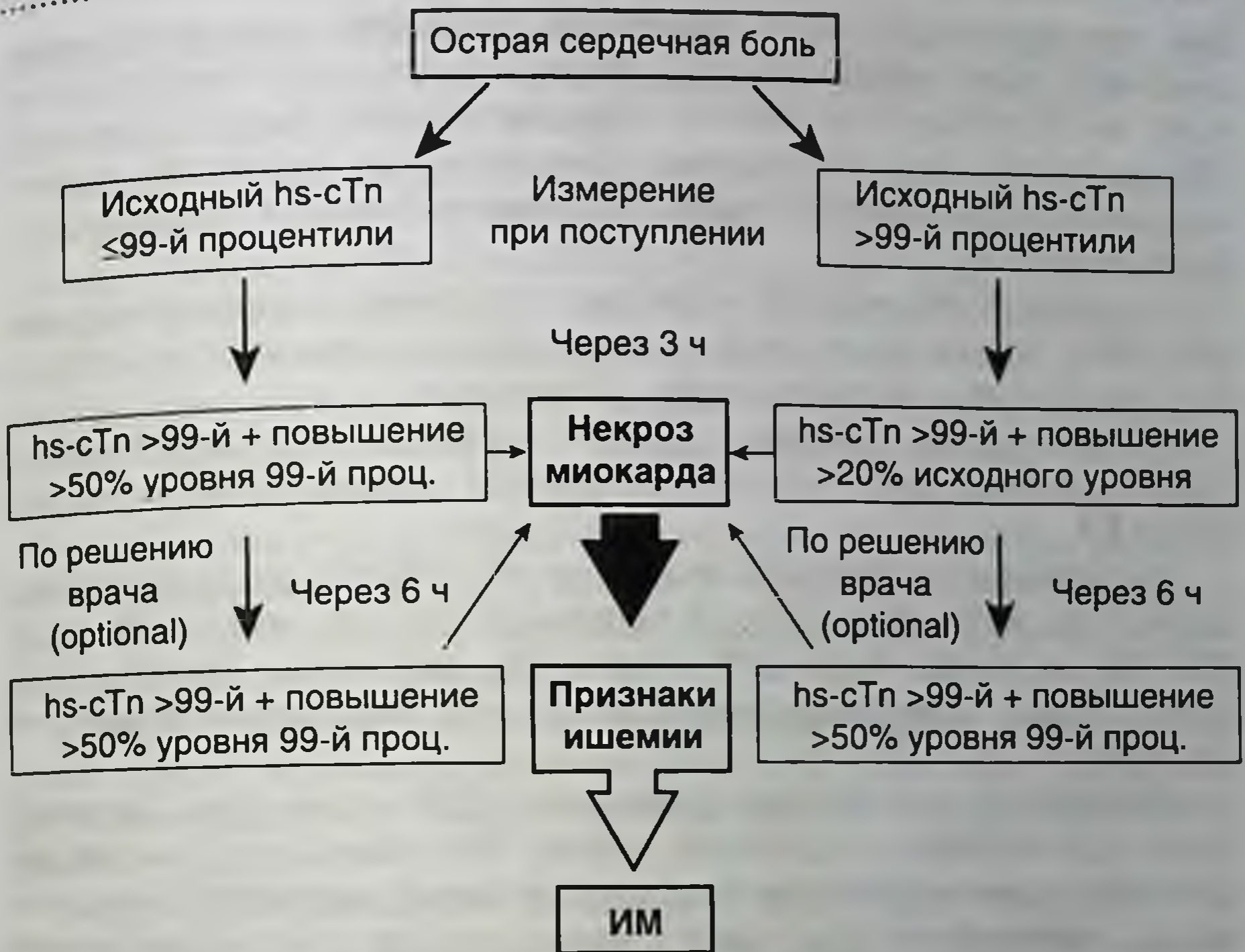


Рис. 12.28. Алгоритм серийных измерений высокочувствительного тропонина для диагностики инфаркта миокарда

### 12.6.5.8. ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ПРИ ДРУГИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

В клинической практике нашло широкое применение одновременное определение в сыворотке крови активности АСТ и АЛТ для диагностики заболеваний печени. АСТ повышается при остром гепатите и других тяжелых поражениях гепатоцитов. Умеренное увеличение наблюдают при механической желтухе, у больных с метастазами в печень и циррозом.

Повышение активности КК в крови неспецифично для ИМ. Она повышается в отдельных случаях при миокардитах, миокардиодистрофиях различного происхождения. Однако ферментемия у таких больных умеренная и более длительная, обычно соответствует фазе максимальной активности процесса. Значительное повышение активности КК в сыворотке крови наблюдают при травматических повреждениях скелетной мускулатуры и заболеваниях мышечной системы.

Так, при прогрессирующей мышечной дистрофии (миопатии) активность КК может увеличиваться в 50 раз и более по сравнению с нормой, что используют в качестве диагностического теста. Активность КК возрастает после различных хирургических операций, причем на ее послеоперационном уровне сказываются способ и продолжительность анестезии.

Высокую активность КК наблюдают при самых различных нарушениях ЦНС: шизофрении, маниакально-депрессивном психозе, синдромах, вызываемых психотропными лекарствами.

Активность КК повышается при гипотиреозе, в то же время при тиреотоксикозе наблюдаются необычайно низкие значения активности КК.

Различные опухоли могут продуцировать КК-МВ, на долю которой приходится 60% и более общей активности КК. В связи с этим, если КК-МВ составляет более 25% общей КК, необходимо думать о злокачественном новообразовании как причине повышения активности фермента.

Источником увеличения активности ЛДГ может быть легочная ткань при эмболии и инфаркте легких. При миопатиях (мышечные дистрофии, травматические повреждения мышц, воспалительные процессы, расстройства, связанные с эндокринными и метаболическими заболеваниями) отмечают увеличение активности ЛДГ; при нейрогенных заболеваниях мышц активность ее не повышается.

При остром вирусном гепатите активность ЛДГ в сыворотке крови увеличена в первые дни желтушного периода, а при легкой и среднетяжелой форме заболевания довольно быстро возвращается к нормальному уровню. Тяжелые формы вирусного гепатита, и особенно развитие печеночной недостаточности, сопровождаются выраженным и более длительным повышением ЛДГ. В стадии ремиссии при хроническом гепатите и циррозе печени активность ЛДГ в крови остается в пределах нормы или слегка повышена, при обострении процесса отмечается повышение.

При механической желтухе на первых стадиях закупорки желчных протоков активность ЛДГ в норме, на более поздних стадиях наблюдается ее подъем вследствие вторичных повреждений печени.

При карциномах печени или метастазах рака в печень может присутствовать подъем активности ЛДГ.

Повышение активности ЛДГ характерно при мегалобластической и гемолитической анемии.

ЛДГ повышается при острых и обострении хронических заболеваний почек. Активность ЛДГ при хронических почечных заболеваниях,

ассоциированных с уремией, может быть нормальной, но часто возрастает после гемодиализа, что обусловлено удалением ингибиторов фермента во время этой процедуры.

Повышение концентрации миоглобина наблюдают при повреждении скелетных мышц, так как этот белок присутствует в них в значительных количествах. Именно поэтому определение уровня миоглобина в плазме крови имеет большое значение у больных с синдромом длительного сдавления, при обширных травмах мышц, наиболее частым осложнением которых служит острая почечная недостаточность (ОПН). Она развивается вследствие массивного отложения миоглобина в почечных клубочках.

Уровень миоглобина в крови увеличивается при тяжелом электрошоке, термических ожогах, вторичной токсической миоглобинурии (болезнь Хаффа), повреждении скелетных мышц, артериальной окклюзии с ишемией мышечной массы.

Некоронарогенные заболевания сердечной мышцы (миокардиты, травма сердца, кардиоверсия) также могут сопровождаться повышением уровня тропонина Т в крови, но динамика изменения, характерная для ИМ, отсутствует.

Содержание тропонинов в сыворотке может быть повышено при септическом шоке и проведении химиотерапии вследствие токсического повреждения миокарда.

Ложноположительные результаты при определении тропонинов в сыворотке могут быть получены при наличии гемолиза, у больных со значительным увеличением концентрации иммуноглобулинов в крови, ОПН, и особенно хронической почечной недостаточности, а также при хронической болезни мышц.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Что такое ИМ?
2. Каковы основные причины развития ИМ?
3. Какова причина повышения активности ферментов в крови при ИМ?
4. Какую функцию в миокарде выполняет миоглобин и для чего определяют его концентрацию в крови?
5. Что такое тропонин?
6. Какова динамика изменения тропонина в сыворотке крови при ИМ?
7. Почему определение тропонина имеет более важную роль в диагностике ИМ, чем исследование других ферментов или белков?

## 12.7. МАРКЕРЫ НАРУШЕНИЙ ФУНКЦИЙ ПЕЧЕНИ (ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПРОБЫ ПЕЧЕНИ)

Печень играет жизненно важную роль в обмене веществ, обезвреживании и выведении токсичных продуктов. Повреждения при различных заболеваниях могут не оказывать явного влияния на ее функциональную активность, так как она обладает значительным функциональным резервом. Вследствие этого оценить функцию печени по какому-то одному показателю не всегда возможно. Традиционно для оценки функции печени используют комплекс лабораторных показателей, которые включают исследование уровня билирубина, альбумина, определение активности АЛТ, АСТ, ЛДГ, ГГТП и щелочной фосфатазы. Часть из этих показателей (АСТ, ЛДГ) рассмотрены в предыдущем разделе. Этот раздел посвящен определению пяти веществ, находящихся в плазме крови, — билирубин, альбумин, ГГТП, АЛТ и щелочной фосфатазе. Несмотря на то что они различаются по своей структуре и функциям, их необходимо рассматривать вместе, так как их используют для обнаружения пациентов с заболеваниями печени или желчевыводящих путей. Каждый из этих показателей в отдельности характеризует в большей степени нарушение одной из функций печени, но все вместе эти 5 анализов дают достаточно полное представление о состоянии печени в целом, поэтому их традиционно называют функциональными пробами печени. Кроме того, у пациентов с заболеваниями печени или желчевыводящих путей (в зависимости от того, каким именно заболеванием он страдает) один или несколько из этих показателей могут оставаться нормальными, но только в крайне редких случаях все они будут в норме у пациента с такой патологией.

Таким образом, комбинация 5 показателей, отражающих функциональное состояние печени, позволяет более надежно выявить заболевание печени, чем каждый анализ в отдельности. Ни один из этих 5 анализов не считают специфичным для заболеваний печени, существует много других болезней, при которых они могут отклоняться от нормальных значений.

### 12.7.1. ФУНКЦИИ ПЕЧЕНИ

Печень — один из самых больших и важных органов человеческого организма. Масса печени составляет около 3% массы тела взрослого человека. Она расположена в правом подреберье и защищена нижней

частью грудной клетки. Верхняя выпуклая часть печени прилежит к диафрагме. Снизу печень несколько вогнута и обращена к органам брюшной полости.

Каждую минуту к печени по печеночной артерии и воротной вене поступает 20% общего объема сердечного выброса. Вещества, образовавшиеся в результате переваривания пищи в желудочно-кишечном тракте, поступают в печень с кровью через воротную вену, а кровь, насыщенная кислородом, через печеночную артерию. Кровь покидает печень через печеночные вены, впадающие в нижнюю полую вену, и возвращается в сердце.

Основной структурный элемент печени — печеночная долька. Она состоит из 15–20 гепатоцитов, которые играют центральную роль в метаболизме поступивших в организм с пищей углеводов, белков и жиров. Именно поэтому продукты их переваривания поступают в печень по воротной вене.

Печень выполняет в организме разнообразные функции. Метаболическая функция печени — участие в обмене веществ. В печени происходит синтез основных белков плазмы крови, таких как альбумин (12–15 г/сут), до 80% глобулинов, различные факторы свертывания крови. Главный из синтезируемых белков — альбумин. Распад многих белков, выполнивших свою функцию, также происходит в печени. Мочевина, конечный продукт метаболизма аминокислот, синтезируется в печени, а затем доставляется кровью к почкам, где фильтруется и выделяется с мочой.

Печень участвует и в обмене углеводов. Она регулирует синтез и расходование гликогена. Большое количество глюкозы, поступившей в организм с пищей, хранится в гепатоцитах в виде гликогена, пока в ней не возникнет потребность. Эти запасы гликогена используются между приемами пищи, когда поступление глюкозы недостаточно. Во время голодания, когда запасы гликогена истощены, печень способна превращать аминокислоты белков, поступивших с пищей, и собственных белков организма в глюкозу. Кроме того, в печени инактивируется инсулин — главный гормон, обеспечивающий поступление глюкозы из крови в клетки органов и тканей. Благодаря этим механизмам печень играет важную роль в поддержании концентрации глюкозы в крови.

Печени принадлежит главная роль в метаболизме жиров (липидов), поступивших в организм с пищей. В печеночных клетках происходит синтез холестерина, триглицеридов, фосфолипидов, желчных кислот и липопротеинов, которые необходимы для транспорта липидов, в том числе триглицеридов и холестерина.

Продукты обмена гемоглобина, многих гормонов и витаминов также распадаются, перерабатываются и выводятся печенью. Алкоголь, все токсичные и лекарственные вещества подвергаются метаболическим превращениям в ней.

Барьерная функция печени заключается в удалении из крови, которая оттекает от кишечника и органов брюшной полости и проходит через печень, микроорганизмов, их токсинов и продуктов обмена, токсичных веществ другого происхождения.

Кроме метаболической, синтетической и барьерной функции, печень участвует в образовании желчи. Желчь представляет собой водный раствор желчных кислот, холестерина, фосфолипидов, билирубина и электролитов. В образовании желчи участвуют гепатоциты и желчные каналцы. Желчь поступает в двенадцатиперстную кишку через печеночные протоки, желчный пузырь и общий желчный проток. За сутки печень выделяет 500–600 мл желчи. Желчные кислоты необходимы для нормального переваривания жиров пищевых продуктов в кишечнике. Кроме того, в ее составе из организма выводятся некоторые вещества (например, билирубин, некоторые лекарственные средства).

Огромное разнообразие процессов, происходящих в печени, связано с функционированием многочисленных ферментов. Они обеспечивают все метаболические процессы. Печень не только синтезирует их подавляющее большинство, но и обеспечивает их динамическое постоянство, а также регулирует их распад. Все ферменты имеют белковую природу. Около 50% аминокислот в печени идет на синтез ферментов.

Считают, что для проявления биохимических сдвигов необходимо повреждение примерно половины клеток печени. Примерно 1/5 часть паренхимы печени может обеспечить ее функциональную деятельность. В здоровом организме, например, используется только 2% возможностей печени в отношении связывания билирубина (за 18 мин гепатоциты из крови поглощают 50% экзогенного билирубина).

## 12.7.2. БИЛИРУБИН

Пациенты с заболеваниями печени часто имеют характерные симптомы и признаки. Наиболее характерна для многих пациентов желтая окраска кожи, склер и слизистых оболочек. Раньше всего она заметна на конъюнктиве глаз. Этот клинический признак называют желтухой. Ее наблюдают при заболеваниях не только печени, но и при других (например, гемолитической анемии). Она возникает из-за высокой концентрации в крови желтого пигмента — билирубина.

Билирубин образуется главным образом из кровяного пигмента эритроцитов — гемоглобина. Другими источниками билирубина служат миоглобин (белок мышечных клеток), цитохромы и гемсодержащие ферменты (рис. 12.29).

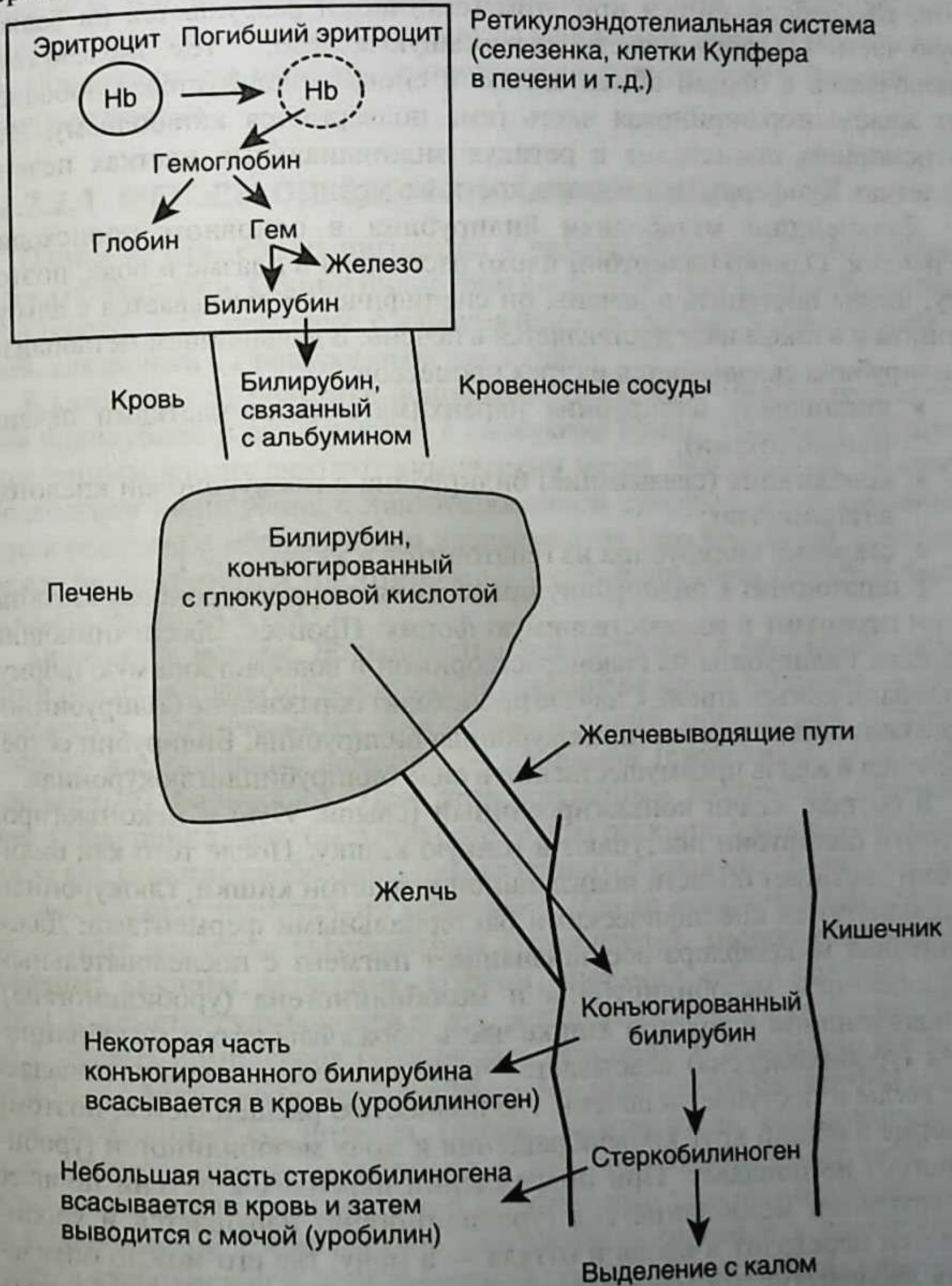


Рис. 12.29. Образование и выведение билирубина

Эритроциты, выполнив свои функции, в конце своего 120-дневного срока жизни удаляются из крови селезенкой и другими клетками ретикулоэндотелиальной системы. При физиологических условиях в организме взрослого человека за 1 ч разрушается  $1-2 \times 10^8$  эритроцитов. Высвободившийся при этом гемоглобин разрушается на белковую часть — глобин и часть, содержащую железо, — гем. Железо гема включается в общий обмен железа и снова используется. Свободная от железа порфириновая часть гема подвергается катаболизму. Это в основном происходит в ретикулоэндотелиальных клетках печени (клетках Купфера), селезенки и костного мозга.

Дальнейший метаболизм билирубина в основном происходит в печени. Однако билирубин плохо растворим в плазме и воде, поэтому, чтобы поступить в печень, он специфически связывается с альбумином и в таком виде доставляется в печень. В дальнейшем метаболизм билирубина складывается из трех процессов:

- поглощение билирубина паренхиматозными клетками печени (гепатоцитами);
- конъюгация (связывание) билирубина с глюкуроновой кислотой в гепатоцитах;
- секреция билирубина из гепатоцитов в желчь.

В гепатоцитах к билирубину присоединяется глюкуроновая кислота, и он переходит в водорастворимую форму. Процесс, обеспечивающий переход билирубина из водонерастворимой в водорастворимую форму, называют конъюгацией. Сначала происходит образование билирубинмоглюкуронида, а затем диглюкуронида билирубина. Билирубин секретруется в желчь преимущественно в виде билирубиндиглюкуронида.

В составе желчи конъюгированный (свыше 97%) и неконъюгированный билирубин поступают в тонкую кишку. После того как билирубин достигает области подвздошной и толстой кишки, глюкурониды гидролизуются специфическими бактериальными ферментами. Далее кишечная микрофлора восстанавливает пигмент с последовательным образованием мезобилирубина и мезобилиногена (уробилиногена). В подвздошной и толстой кишке часть образовавшегося мезобилиногена (уробилиногена) всасывается через кишечную стенку, попадает в *v. portae* и поступает в печень, где полностью расщепляется, поэтому в норме в общий круг кровообращения и мочу мезобилиноген (уробилиноген) не попадает. При повреждении паренхимы печени процесс расщепления мезобилиногена (уробилиногена) нарушается и уробилиноген переходит в кровь и оттуда — в мочу, где его можно определить лабораторными методами исследования. В норме большая часть бесцветных мезобилиногенов, образующихся в толстой кишке, окис-



ляется в стеркобилиноген, который в нижних отделах толстой кишки (в основном в прямой кишке) окисляется до стеркобилина и выделяется с калом. Лишь небольшая часть стеркобилиногена (уробилина) всасывается в нижних участках толстой кишки в систему нижней полой вены и в дальнейшем выводится почками с мочой. Следовательно, в норме моча человека содержит следы уробилина, но не уробилиногена. Обнаружение в моче уробилиногена свидетельствует о нарушении функции печени.

### 12.7.2.1. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИЛИРУБИНА

Одним из важнейших пигментов и продуктов распада гемоглобина служит билирубин. Общий билирубин состоит из двух фракций: непрямой (свободный, комплекс с альбуминами) и прямой (конъюгированный, связанный с глюкуроновой кислотой).

В клинической практике используют различные методы определения билирубина и его фракций в сыворотке крови. Наиболее распространенным из них считают химический метод, основанный на взаимодействии билирубина с диазотированной сульфаниловой кислотой (диазореактив) с образованием азопигментов (диазометоды). Реакция между билирубином и диазотированной сульфаниловой кислотой была открыта Эрлихом в 1883 г.

**Химические методы.** Большинство используемых в настоящее время химических методов определения билирубина в крови основано на диазореакции. Химическими или диазометодами определяют количественно две основные фракции — непрямой (свободный) и прямой (связанный) билирубин. При этом связанный билирубин (билирубин-глюкуронид) дает быструю («прямую») реакцию с диазореактивом, тогда как реакция свободного (не связанного с глюкуронидом) билирубина протекает значительно медленнее. Для ее ускорения применяют различные вещества-акселераторы (ускорители): гидрооксид натрия, желчные кислоты, мочевины, кофеин, ацетамид, смесь соляной кислоты и диметилсульфоксида и др., которые освобождают билирубин из белковых комплексов («непрямая» реакция). В результате взаимодействия с диазотированной сульфаниловой кислотой билирубин образует окрашенные соединения. Однако азокраситель, образовавшийся при взаимодействии билирубина с диазореактивом, ведет себя как кислотно-основной индикатор с несколькими цветными переходами. В сильноокислой среде раствор азокрасителя окрашен в фиолетовый цвет, в слабоокислой и слабощелочной среде — в розовый, в сильнощелочной среде — в синий. Определение билирубина в сильнощелочной

среде значительно повышает аналитическую чувствительность метода. При любом методическом варианте определения концентрации билирубина интенсивность окраски раствора, измеренная на фотометре (длина волны зависит от рН реакционной среды), прямо пропорциональна концентрации общего билирубина в нем.

В течение всей истории развития диазометодов различные исследователи предлагали использовать разные вещества-акселераторы для определения концентрации билирубина, поэтому многие методы носят имена своих первооткрывателей. Самым распространенным считают метод Ендрашика—Клегхорна—Грофа.

В методе Ендрашика—Клегхорна—Грофа в качестве акселераторов используют водный раствор кофеина и бензойнокислого натрия. Механизмом, с помощью которого раствор бензоата и кофеина облегчает взаимодействие билирубина с диазореактивом, служит вытеснение данными веществами неконъюгированного билирубина из участков его связывания на молекуле альбумина. Это происходит путем образования водородных связей между билирубином и кофеином, что делает данный пигмент водорастворимым. При проведении исследований в лаборатории в сыворотке обычно определяют общий и прямой билирубин. Путем вычитания прямого из общего определяют концентрацию непрямого билирубина.

Методически в методе Ендрашика—Клегхорна—Грофа для определения связанного билирубина фотометрическое измерение проводят спустя 5–10 мин после добавления диазосмеси, так как при длительном стоянии в реакцию вступает несвязанный билирубин. Для определения общего билирубина пробу для развития окраски оставляют на 20 мин, после чего измеряют на фотометре. В дальнейшем окраска не изменяется. Измерение проводят при длине волны 500–560 нм (зеленый светофильтр). Из показателей, полученных при измерении общего и связанного билирубина, вычитают показатель холостой пробы. Расчет производят по калибровочному графику. Находят содержание общего и связанного билирубина. Метод Ендрашика—Клегхорна—Грофа прост, удобен в практике, не связан с применением дефицитных реактивов и наиболее приемлем для практических лабораторий. Определение рекомендуют проводить сразу же после забора проб крови, чтобы избежать окисления билирубина на свету. Гемолиз сыворотки снижает количество билирубина пропорционально присутствию гемоглобина. Следовательно, сыворотка крови не должна быть гемолизирована.

В настоящее время в диазометодах определения концентрации билирубина наиболее часто используемыми акселераторами служат кофеин, дифиллин и поверхностно активные агенты.

**Определение билирубина в крови прямым фотометрическим методом.** При прямом фотометрическом определении общего билирубина используют капиллярную кровь. Несмотря на то что при этом определяется только общий билирубин, этот подход представляет значительный интерес в неонатологии, так как у новорожденных преобладает одна производная билирубина (свободный билирубин), практически равная концентрации общего билирубина. Достоинством метода считают небольшой объем капиллярной крови для анализа, недостатком — невозможность определить фракции билирубина и меньшую точность при выраженном гемолизе.

Билирубин представляет собой пигмент с ярко выраженной желтой окраской. Его спектральная кривая поглощения имеет максимум на длине волны 460 нм (синяя область спектра). Измеряя поглощение на этой длине волны, можно определить концентрацию общего билирубина в крови. Однако ряд факторов усложняет такое измерение. Билирубин — сильный поглотитель, и поэтому оптимальная для фотометра оптическая абсорбция в диапазоне 0,3–0,5 достигается в кювете с длиной оптического пути примерно 250 мкм (0,25 мм). Кроме того, фотометрирование непосредственно крови усложняется присутствием форменных элементов крови.

Именно поэтому фотометрирование необходимо проводить на спектрофотометрах на двух длинах волн — 460 и 550 нм, на которых гемоглобин имеет одинаковые коэффициенты поглощения, а билирубин имеет максимум поглощения на длине волны 460 нм и не поглощает на длине волны 550 нм. Это позволяет исключить влияние гемоглобина при измерении концентрации билирубина. Однако спектрофотометры общего назначения малопригодны для таких измерений, так как необходимо иметь специальные кюветы с малой оптической длиной. Поэтому для прямого измерения концентрации билирубина в крови применяют специализированные фотометры, примером которого может служить фотометр «Билимет-К» — анализатор билирубина фотометрический неонатальный (рис. 12.30). Определение концентрации общего билирубина анализатором «Билимет-К» производят методом прямого фотометрирования плазмы крови в тонком стеклянном капилляре (рис. 12.31). Для разделения крови в капилляре на фракции используют специальное устройство для получения плазмы крови УППК-01-НПП ТМ или гематокритную центрифугу. Оптическую абсорбцию исследуемой пробы вычисляют как логарифм отношения световых потоков на двух длинах волн.



Рис. 12.30. Анализатор билирубина «Билимет-К»



Рис. 12.31. Загрузка капилляра в анализатор «Билимет-К»

**Метод чрескожного (транскутанного) определения билирубина.** Транскутанная билирубинометрия основана на явлении обратной диффузии билирубина из крови в соединительнотканную часть кожи (дерму). Увеличение концентрации билирубина в крови приводит к повышению содержания билирубина в дерме. И наоборот, уменьшение концентрации билирубина в крови приводит к обратному движению билирубина из дермы в кровь до тех пор, пока между этими двумя системами не наступит равновесие. Поскольку билирубин обладает ярко выраженной желтой окраской, цвет кожи меняется в зависимости от содержания билирубина в дерме. Желтая окраска билирубина связана с наличием в нем полосы поглощения света в синей области спектра

с максимумом на длине волны 460 нм. Существует логарифмическая зависимость между концентрацией поглощающего вещества и интенсивностью прошедшего через него света.

Метод транскутанного определения билирубина реализован в анализаторе «Билитест», который по своему принципу служит отражательным фотометром и измеряет логарифм отношения интенсивностей отраженного от дермы света на двух длинах волн (рис. 12.32). Прибор снабжен миниатюрной лампой-вспышкой и двумя фотоприемниками с узкополосными светофильтрами, позволяющими выделять из всего отраженного потока света излучение на длинах волн 460 и 550 нм. Выбор второй длины волны в желто-зеленом диапазоне обусловлен отсутствием в нем поглощения света билирубином и одновременно наличием примерно такого же, как на длине волны 460 нм, поглощения в гемоглобине крови. Важной особенностью прибора считают то, что он регистрирует свет, отраженный только из глубины тканей, и не допускает попадания на фотоприемники света, отраженного от поверхности кожи за счет плотного прилегания к ней подвижной световодной головки. По существу, прибор «Билитест» определяет концентрацию билирубина в дерме путем прямого фотометрирования.



Рис. 12.32. Анализатор «Билитест»

**Ферментативные методы** определения билирубина основаны на реакции его окисления ферментом билирубиноксидазой до биливердина. Это происходит при рН реакционной среды около 8,0 в присутствии холата и додецилсульфата натрия. Для оценки результатов метода используют разность спектров поглощения билирубина и биливердина. Уменьшение поглощения при длине волны 460 нм пропорционально концентрации общего билирубина в сыворотке.

### 12.7.3. АЛЬБУМИН

Печень служит главным органом синтеза альбумина. Продолжительность периода полураспада альбуминов составляет 18 дней. Уровень альбумина в сыворотке крови зависит от его синтеза в печени и выведения (потерь) через почки. Поэтому альбумин является хорошим маркером нарушения белково-синтетической функции печени и нарушений выделительной функции почек. В связи с тем, что альбумин имеет достаточно большой период полураспада, он служит хорошим маркером нарушения белково-синтетической функции только при хронических заболеваниях печени, при острых заболеваниях его уровень в сыворотке крови остается в пределах нормальных значений. При хронических заболеваниях печени уровень альбумина в сыворотке крови может снижаться до 25–30 г/л. При заболеваниях почек происходит потеря альбумина с мочой и его уровень снижается.

### 12.7.4. ГАММА-ГЛУТАМИЛТРАСПЕПТИДАЗА, АЛАНИНАМИНОТРАНСФЕРАЗА И ЩЕЛОЧНАЯ ФОСФАТАЗА

Огромное разнообразие процессов, происходящих в печени, связано с присутствием многочисленных ферментов в отдельных структурных элементах гепатоцитов. Выраженность повреждения этих структурных единиц печеночной клетки определяет сущность обменных нарушений при различных заболеваниях. Разные этиологические факторы повреждают одни и те же структурные элементы печени и проявляются похожими отклонениями в результатах биохимических тестов. Именно поэтому биохимические анализы не позволяют определить этиологию конкретного заболевания печени, но они представляют информацию для установления степени тяжести повреждения печени.

$\gamma$ -Глутамилтрансфераза (ГГТП), аланинаминотрансфераза (АЛТ) и щелочная фосфатаза — ферменты. Они находятся в клетках печени (гепатоцитах) и желчевыводящих путей (билиарный тракт), где каж-

дый из них обеспечивает протекание определенных метаболических процессов.

ГГТП катализирует перенос  $\gamma$ -глутамила на аминокислоту или пептид, является мембраносвязанным ферментом, расположенным преимущественно в мембранах билиарного полюса гепатоцита, а также в клетках желчных протоков. В значительных концентрациях ГГТП обнаружена в печени, почках, поджелудочной и предстательной железе (поэтому у мужчин ее активность в сыворотке крови приблизительно на 50% выше, чем у женщин). В других клетках тканей ГГТП содержится в небольших количествах. В основном активность ее присутствует на мембранах клеток, обладающих высокой секреторной или поглотительной способностью, таких как эпителиальные клетки желчевыводящих путей, клетки проксимальных канальцев почки, ацинарная ткань поджелудочной железы и ее протоки, щеточная каемка клеток кишечника.

Референтные величины активности ГГТП в сыворотке кров у мужчин 10,4–33,8 МЕ/л; у женщин — 8,8–22,0 МЕ/л.

АЛТ катализирует перенос аминогруппы с аланина (аминокислота) на  $\alpha$ -кетоглутаровую кислоту. АЛТ содержится в скелетной мускулатуре, печени, сердце. В меньших количествах она обнаружена также в поджелудочной железе, селезенке, легких. Самых больших концентраций АЛТ достигает в печени. Референтные величины ее активности в сыворотке крови 7–40 МЕ/л.

Щелочная фосфатаза широко распространена в тканях человека, особенно в слизистой оболочке кишечника, клетках кости (остеобластах), стенках желчных протоков печени, плаценте и лактирующей молочной железе. Она катализирует отщепление фосфорной кислоты от ее органических соединений. Свое название фермент получил в связи с тем, что оптимум рН щелочной фосфатазы лежит в щелочной среде (рН 8,6–10,1). Фермент расположен на клеточной мембране и участвует в транспорте фосфора. Референтные величины активности щелочной фосфатазы представлены в табл. 12.15.

Таблица 12.15. Референтные величины активности щелочной фосфатазы в сыворотке

Возраст	Общая щелочная фосфатаза, МЕ/л
Новорожденные	35–106
1 мес	71–213
3 года	71–142
10 лет	106–213
Взрослые до 31 года	39–92
Взрослые старше 31 года	39–117

При гибели печеночных клеток (некроз) или нарушении целостности их мембран, что происходит при заболеваниях печени, ГГТП, АЛТ и щелочная фосфатаза (внутриклеточные ферменты) попадают в кровь. Они не выполняют в крови своих функций, но их повышенное количество в плазме служит индикатором повреждения печеночных клеток, хотя и не всегда. Возможны и другие причины, такие как усиленная клеточная пролиферация при злокачественных опухолях, нарушение оттока желчи.

Необходимо понимать условность сложившегося общего названия «печеночные ферменты» в отношении ГГТП, АЛТ и щелочной фосфатазы. Печень не является единственным источником этих ферментов, и повышение их уровня в крови не всегда указывает на повреждение печени. ГГТП, АЛТ и щелочная фосфатаза присутствуют в клетках многих других тканей, и повреждение этих тканей (или наличие заболевания, затрагивающего их) тоже может сопровождаться высокой концентрацией данных ферментов в сыворотке крови.

### 12.7.5. ПРИЧИНЫ ИЗМЕНЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ БИЛИРУБИНА В КРОВИ

Содержание общего билирубина в сыворотке крови в норме составляет 3,4–17,1 мкмоль/л. Возрастание уровня билирубина в сыворотке крови выше значения 17,1 мкмоль/л называют гипербилирубинемией. Это состояние может быть следствием трех основных групп заболеваний.

- Болезни, связанные с повышенным образованием билирубина (в большем количестве, чем то, которое нормальная печень может экскретировать), при этом печень и желчные пути обычно не вовлечены в патологический процесс; наиболее частым заболеванием этой группы болезней служит гемолитическая анемия, для которой характерно усиленное разрушение эритроцитов.
- Болезни, связанные с повреждением клеток печени и, следовательно, с нарушением их способности конъюгировать билирубин (болезни печени).
- Болезни, связанные с нарушением оттока желчи (следовательно, снижением экскреции билирубина) вследствие закупорки желчевыводящих протоков печени (болезни желчевыводящих путей).

Во всех этих случаях билирубин накапливается в крови и по достижении определенных концентраций диффундирует в ткани, окрашивая их в желтый цвет. Это состояние называют желтухой. Желтушная окраска кожи возникает тогда, когда содержание билирубина в крови



превышает 30–35 мкмоль/л. Различают легкую форму желтухи — при концентрации билирубина в крови до 86 мкмоль/л, среднетяжелую — 87–159 мкмоль/л и тяжелую — свыше 160 мкмоль/л.

В соответствии с приведенными группами болезней в клинической практике наиболее широкое распространение получило деление желтух на гемолитические, паренхиматозные и обтурационные.

Гемолитические анемии — группа болезней, при которых анемия вызвана усиленным разрушением (гемолизом) эритроцитов, в результате чего происходит интенсивное образование в ретикулоэндотелиальных клетках билирубина из гемоглобина. В то же время печень оказывается не способной к связыванию (конъюгации) столь большого количества билирубина, что и приводит к накоплению свободного билирубина в крови и тканях. Однако даже при значительном гемолизе гипербилирубинемия обычно незначительна (менее 68,4 мкмоль/л) вследствие большой способности печени в отношении конъюгирования билирубина. Гемолиз также может быть усилен при  $V_{12}$ -дефицитных анемиях, малярии, массивных кровоизлияниях в ткани, инфарктах легких, синдроме разможнения мягких тканей (неконъюгированная гипербилирубинемия). Помимо увеличения уровня общего билирубина, при гемолитической желтухе определяют повышенное выделение уробилиногена с мочой и калом, так как он образуется в кишечнике в большом количестве.

Наиболее частой формой гемолитической желтухи и гипербилирубинемии служит физиологическая желтуха у новорожденных (встречают у 60% младенцев в первые недели жизни). Причина этой желтухи — ускоренный гемолиз эритроцитов и незрелое состояние печеночной системы поглощения, конъюгации и секреции билирубина. В связи с тем что билирубин, накапливающийся в крови, находится в неконъюгированном (свободном) состоянии, когда его концентрация в крови превышает уровень насыщения альбумина (34,2–42,75 мкмоль/л), он способен преодолевать гематоэнцефалический барьер. Это может привести к гипербилирубинемической токсической энцефалопатии. В первые сутки после рождения уровень билирубина нередко увеличивается до 135 мкмоль/л, у недоношенных детей он может достичь величины 262 мкмоль/л.

Гемолитическими по своему происхождению могут быть желтухи, вызванные действием лекарственных средств, усиливающих распад (гемолиз) эритроцитов (например, ацетилсалициловой кислоты, тетрациклина и др.).

При паренхиматозной желтухе наступает деструкция гепатоцитов, нарушается экскреция конъюгированного билирубина в желчные

капилляры. Он попадает непосредственно в кровь, где содержание его значительно увеличивается. Кроме того, снижается способность печеночных клеток синтезировать билирубин-глюкурониды, вследствие чего количество билирубина также увеличивается.

Основными причинами паренхиматозных желтух служат острые и хронические вирусные гепатиты, циррозы печени, токсичные вещества (хлороформ, четыреххлористый углерод, ацетаминофен), массивное распространение в печени раковой опухоли, альвеолярный эхинококк и множественные абсцессы печени.

При вирусных гепатитах степень билирубинемии в какой-то мере коррелирует с тяжестью заболевания. Так, при легкой форме течения вирусного гепатита В содержание билирубина в сыворотке крови не выше 90 мкмоль/л (5 мг%), при среднетяжелой — в пределах 90–170 мкмоль/л (5–10 мг%), при тяжелой — свыше 170 мкмоль/л (выше 10 мг%). При развитии печеночной комы уровень билирубина может повышаться до 300 мкмоль/л и более.

К паренхиматозным желтухам относят целый ряд редко встречаемых синдромов, в основе которых лежат наследственные дефекты метаболизма билирубина. Однако один из этих синдромов — болезнь Жильбера встречается довольно часто — почти у 5% всего населения.

**Болезнь Жильбера** — доброкачественное заболевание, обусловленное снижением поглощения билирубина гепатоцитами. Манифестирует периодическим повышением в крови общего билирубина, редко превышающим 50 мкмоль/л (17–85 мкмоль/л). Эти повышения часто бывают связаны с физическим и эмоциональным напряжением и различными сопутствующими заболеваниями. При этом отсутствуют изменения других показателей функции печени, нет клинических признаков печеночной патологии.

При обтурационной (механической) желтухе нарушается выведение желчи вследствие закупорки общего желчного протока камнем или опухолью, при первичном билиарном циррозе печени, приеме лекарств, вызывающих холестаза. Нарастание давления в желчных капиллярах приводит к увеличению проницаемости или нарушению их целостности и попаданию билирубина в кровь. В связи с тем что концентрация билирубина в желчи в 100 раз выше, чем в крови, при нарушении оттока желчи уровень билирубина в крови резко повышается и стойко сохраняется. Механическая желтуха обычно приводит к наиболее высокому уровню билирубина в крови, величина которого иногда достигает значений 800–1000 мкмоль/л. В кале резко снижается содержание стеркобилиногена, а полная обтурация желчного протока сопровождается отсутствием желчных пигментов в кале (кал обес-

цветивается). Если концентрация конъюгированного (прямого) билирубина превышает почечный порог (13–30 мкмоль/л), то билирубин выделяется с мочой.

### 12.7.6. ПРИЧИНЫ ИЗМЕНЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ АЛЬБУМИНА В КРОВИ

В отношении альбуминов лабораторные исследования обнаруживают в основном количественные нарушения их содержания в плазме крови. Эти количественные изменения проявляются гипер- (концентрация выше 50 г/л) и гипоальбуминемией (концентрация в сыворотке крови ниже 35 г/л).

Гипоальбуминемии бывают первичные (у новорожденных в результате незрелости печеночных клеток) и вторичные, обусловленные различными патологическими состояниями. Поскольку альбумин синтезируется в печени, можно ожидать, что ее заболевания всегда связаны со снижением уровня этого белка в плазме крови. В действительности это не совсем так. Уровень альбумина снижается только при хронических заболеваниях печени (цирроз) и печеночной недостаточности, но обычно остается нормальным, если заболевание протекает остро и быстро разрешается (острый гепатит).

Уровень альбумина может быть низким при заболеваниях и состояниях, не относящихся к патологии печени. Они практически аналогичны тем, которые вызывают гипопроотеинемию.

В понижении концентрации альбуминов может также играть роль гемодилюция (разведение крови), например, при беременности. Снижение содержания альбуминов менее 22–24 г/л сопровождается развитием отека легких.

Гиперальбуминемию наблюдают при дегидратации в случаях тяжелых травм, обширных ожогах, холере.

### 12.7.7. ПРИЧИНЫ ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ В КРОВИ

В клинической практике нашло широкое применение одновременное определение в крови активности АСТ и АЛТ. Совместное определение этих двух ферментов несет гораздо больше клинической информации о глубине поражения, активности патологического процесса и прогнозе течения заболевания. Повышение активности трансаминаз (АЛТ и АСТ) в сыворотке крови свидетельствует о повреждении клеток печени. Эти ферменты служат «прямыми» маркерами поражения

печеночных клеток, которые связаны с выходом внутриклеточных субстанций во внеклеточное пространство (кровь) из-за повышенной проницаемости мембран гепатоцитов или их гибели. Степень возрастания уровня этих маркеров в крови обычно тесно коррелирует с тяжестью и распространенностью поражения печеночных клеток. Исследование активности АЛТ и АСТ в сыворотке крови имеет исключительно большое значение для диагностики заболеваний печени. Подъем их активности прямо пропорционален степени некроза печеночной ткани.

При нарушении оттока желчи (холестаза) повышается активность щелочной фосфатазы и ГГТП. При тяжелой обструктивной желтухе активность щелочной фосфатазы в сыворотке крови может превышать верхний предел нормы в 10 раз и более. Однако в клинической практике у пациентов с заболеваниями печени часто возрастает активность обоих ферментов, хотя активность одного из них может преобладать. В свою очередь, повышенную активность ГГТП определяют как при холестазе, так и поражении гепатоцитов. Активность этого фермента служит очень чувствительным, но неспецифичным показателем заболевания печени.

Таким образом, при различных заболеваниях печени могут диагностироваться различные сочетания повышения активности ферментов в сыворотке крови. Они не являются специфическими показателями нарушения функции печени, а больше всего отражают активность течения заболевания печени. Однако определение активности ферментов в сыворотке крови очень полезно для отслеживания течения заболевания печени, после того как диагноз установлен. Снижение активности АЛТ и АСТ свидетельствует об уменьшении повреждения гепатоцитов, а падение активности щелочной фосфатазы предполагает устранение причины холестаза.

**АЛТ.** Активность АЛТ в сыворотке крови в первую очередь и наиболее значительно изменяется при заболеваниях печени. Повышение в 1,5–5 раз по сравнению с верхней границей нормы рассматривают как умеренную гиперферментемию, в 6–10 раз — как гиперферментемию средней степени и более чем в 10 раз — как высокую. Степень подъема активности АЛТ свидетельствует о выраженности некроза печеночных клеток, но не указывает прямо на глубину нарушений собственно функций печени.

При остром гепатите, независимо от его этиологии, активность АЛТ повышается у всех больных. При этом уровень АЛТ повышается за 10–15 дней до появления желтухи при вирусном гепатите А и за много недель — при вирусном гепатите В. При типичном течении острого вирусного гепатита активность АЛТ достигает максимума

на 2–3-й неделе заболевания. При благоприятном его течении уровень АЛТ нормализуется через 30–40 сут. Обычно при остром вирусном гепатите уровень активности АЛТ колеблется от 500 до 3000 МЕ/л. Повторное или прогрессирующее повышение активности АЛТ свидетельствует о новом некрозе клеток печени или рецидиве болезни. Удлинение периода повышенной активности АЛТ часто служит неблагоприятным признаком, так как может свидетельствовать о переходе острого гепатита в хронический.

Для хронических гепатитов характерна умеренная и средняя гиперферментемия. При латентных (скрытых) формах цирроза печени повышения активности АЛТ, как правило, не наблюдают.

Повышение активности АЛТ может быть обнаружено и у не имеющих клинических проявлений носителей поверхностного антигена гепатита В, что указывает на наличие внешне бессимптомных активных процессов в печени.

Алгоритм для принятия клинических решений при установлении этиологии поражения печени по значениям активности АСТ представлен на рис. 12.33.

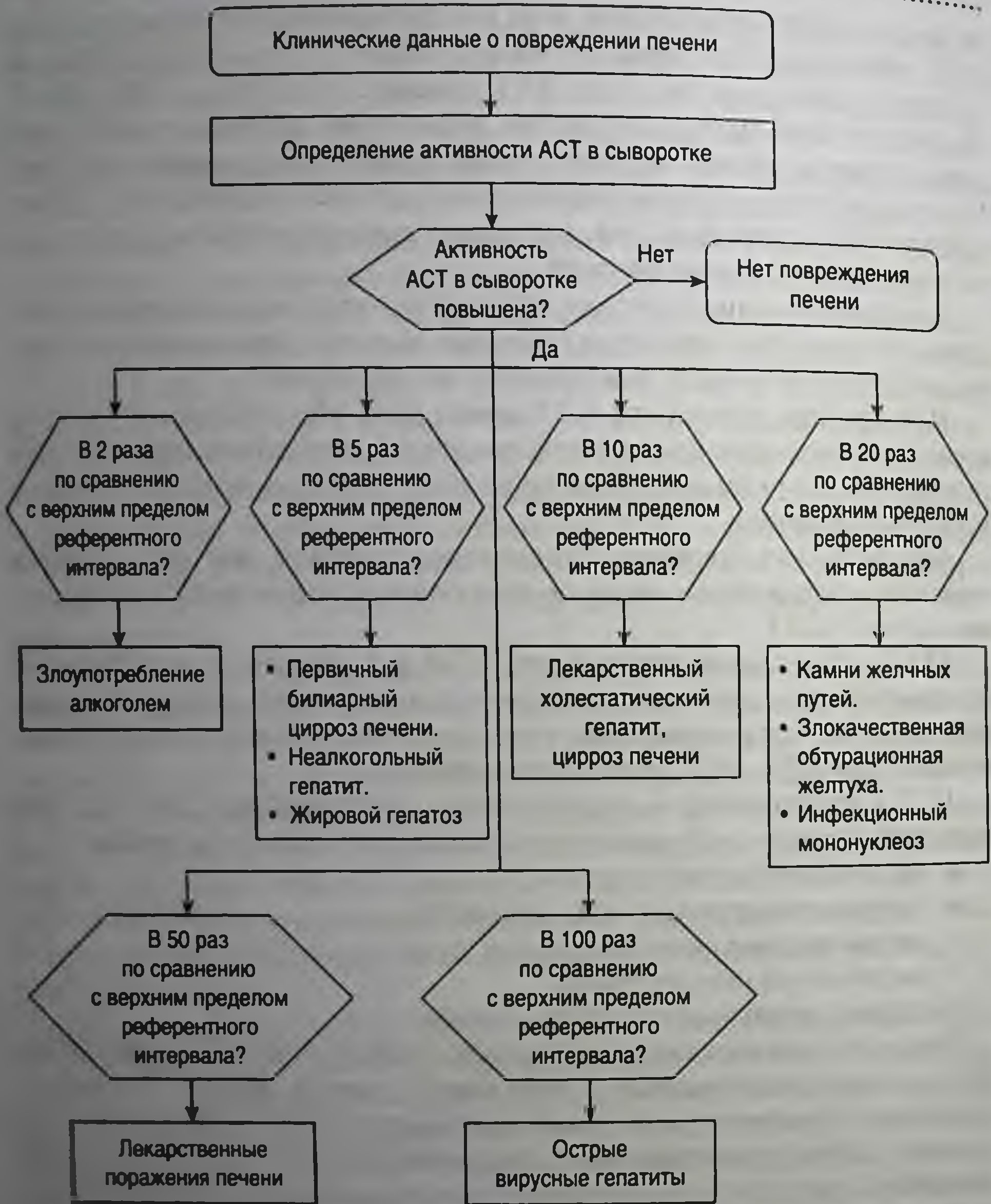
**ГГТП.** Изменение активности ГГТП в сыворотке имеет большое диагностическое значение при заболеваниях печени и гепатобилиарного тракта. Этот фермент более чувствителен к нарушениям в клетках печени, чем АЛТ, АСТ, щелочная фосфатаза.

ГГТП многозначна в диагностическом отношении. По крайней мере пять процессов повышают ее активность в сыворотке крови:

- некроз печеночных клеток;
- нарушение оттока желчи — холестаза;
- интоксикация алкоголем;
- опухолевый рост в печени;
- лекарственные повреждения печени.

Такая этиологическая разнородность механизмов повышения ГГТП требует очень осторожной и тщательной оценки причин гиперферментемии. Обнаружение высокой активности ГГТП заставляет искать причину этого повышения. Как «отсеивающий» тест и метод контроля течения известного патологического процесса исследование ГГТП буквально незаменимо по клиническому значению.

Особенно чувствительна ГГТП к влиянию на печень длительного потребления алкоголя. У злоупотребляющих алкоголем сывороточный уровень ГГТП коррелирует с количеством принимаемого алкоголя. Тест особенно ценен для контроля лечения алкоголизма. Прекращение приема алкоголя снижает активность фермента приблизительно на 50% в течение 10 дней.



**Рис. 12.33.** Алгоритм для принятия клинических решений при установлении этиологии поражения печени по значениям активности аспартатаминотрансферазы

Определение активности ГГТП используют для установления факта повреждения печеночных клеток, обычно этот тест положителен в 90% случаев заболеваний печени. В большинстве случаев у таких

больных в крови наблюдают повышение активности АЛТ и ГГТП. Изолированное повышение активности ГГТП наблюдают у 6–20% больных с патологией гепатобилиарной системы.

При острых гепатитах активность ГГТП повышается раньше, чем АЛТ. На высоте заболевания активность ГГТП ниже (повышена в 2–5 раз), чем активность АЛТ, и нормализуется значительно медленнее. Это позволяет использовать ГГТП в контроле выздоровления больного. Повышение активности ГГТП отмечают при инфекционном мононуклеозе.

Повышение активности ГГТП более чем в 3 раза вызывают антиконвульсантные препараты, жировая дистрофия печени и сердечная недостаточность.

Наиболее высокую активность ГГТП (в 5–30 раз выше референтного интервала) наблюдают при внутри- и внепеченочном холестазах. Несколько меньшие значения активности фермента регистрируют при первичных опухолях печени и метастазах в печень.

**Щелочная фосфатаза.** Активность ее наиболее часто повышается вследствие повреждения или деструкции гепатоцитов или нарушения оттока желчи (холестаз). Некроз печеночных клеток как причина повышения активности щелочной фосфатазы играет ведущую роль при вирусных и аутоиммунных гепатитах, токсических и лекарственных повреждениях печени. Холестаз как причина повышения активности щелочной фосфатазы в крови развивается при внепеченочной обструкции желчных протоков (например, при закупорке камнем или развитии послеоперационной стриктуры), сужении внутрипеченочных протоков (например, при первичном склерозирующем холангите), повреждении желчных протоков (например, при первичном билиарном циррозе печени) или нарушении транспорта желчи на уровне мелких желчных протоков (при применении ряда лекарственных препаратов, например хлорпромазина). В ряде случаев активность щелочной фосфатазы повышается при одновременном действии обоих механизмов повреждения.

Повышение уровня щелочной фосфатазы при повреждении печени происходит вследствие высвобождения ее из гепатоцитов. В связи с этим щелочная фосфатаза в противоположность АЛТ остается нормальной или незначительно увеличивается (так как увеличения ее синтеза при этом нет, а в кровь попадает только то небольшое количество щелочной фосфатазы, которая уже имеется в гепатоцитах) при вирусном гепатите. У 1/3 желтушных больных с циррозом печени выявлено увеличение активности щелочной фосфатазы. Повышение ее активности наблюдают у 90% больных первичным раком печени и при мета-

стазах в нее. Резко возрастает активность щелочной фосфатазы при отравлениях алкоголем на фоне хронического алкоголизма. Она может повышаться при приеме лекарственных средств, обладающих гепатотоксическим эффектом (тетрациклин, парацетамол, фенацетин<sup>®</sup>, 6-меркаптопурин, салицилаты и др.). Приблизительно у половины больных инфекционным мононуклеозом на 1-й неделе заболевания отмечают повышение активности щелочной фосфатазы. Примерно у 65% госпитализированных больных высокий уровень щелочной фосфатазы обусловлен заболеваниями печени.

Внепеченочная закупорка желчных протоков сопровождается резким увеличением активности этого фермента.

У женщин, принимающих противозачаточные препараты, которые содержат эстроген и прогестерон, может развиваться холестатическая желтуха и повышается активность щелочной фосфатазы. Очень высокие показатели активности фермента наблюдают у беременных с преэклампсией, что служит следствием повреждения плаценты. Низкая активность щелочной фосфатазы у них свидетельствует о недостаточности развития плаценты.

Щелочная фосфатаза продуцируется остеобластами костей — крупными одноядерными клетками, лежащими на поверхности костного матрикса в местах интенсивного формирования кости. У детей щелочная фосфатаза повышена до периода полового созревания. Увеличение ее активности сопровождает рахит любой этиологии, болезнь Педжета, костные изменения, связанные с гиперпаратиреозом. Быстро растет активность фермента при остеогенной саркоме, метастазах рака в кости, миеломной болезни, поражении костей при лимфогранулематозе.

Алгоритм для принятия клинических решений при установлении этиологии поражения печени по значениям активности щелочной фосфатазы представлен на рис. 12.34.

Динамика активности ферментов при остром вирусном гепатите представлена на рис. 12.35.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ

1. Какие тесты входят в лабораторный комплекс «Функциональные пробы печени»?
2. Что такое билирубин?
3. Где и как образуется билирубин?
4. Чем билирубин свободный отличается от связанного, прямой от непрямого?



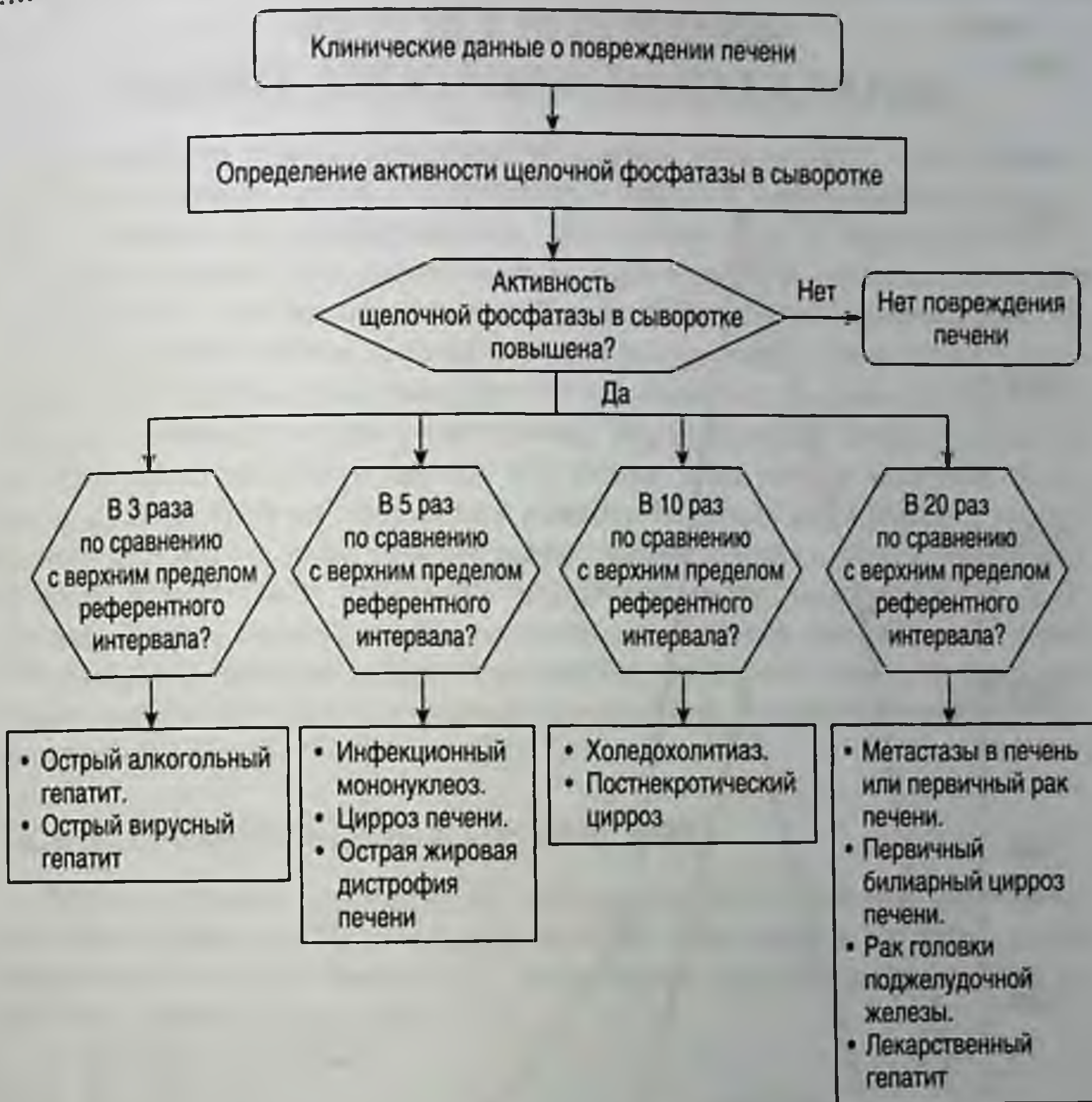


Рис. 12.34. Алгоритм для принятия клинических решений при установлении этиологии поражения печени по значениям активности щелочной фосфатазы

5. Что такое желтуха?
6. Какие значения концентрации билирубина в крови указывают на гипербилирубинемия?
7. Каковы основные причины повышения концентрации билирубина в крови?
8. Почему очень часто диагностируют желтуху у новорожденных?
9. Назовите самый распространенный метод определения билирубина.
10. В чем сущность определения билирубина в крови прямым фотометрическим методом?

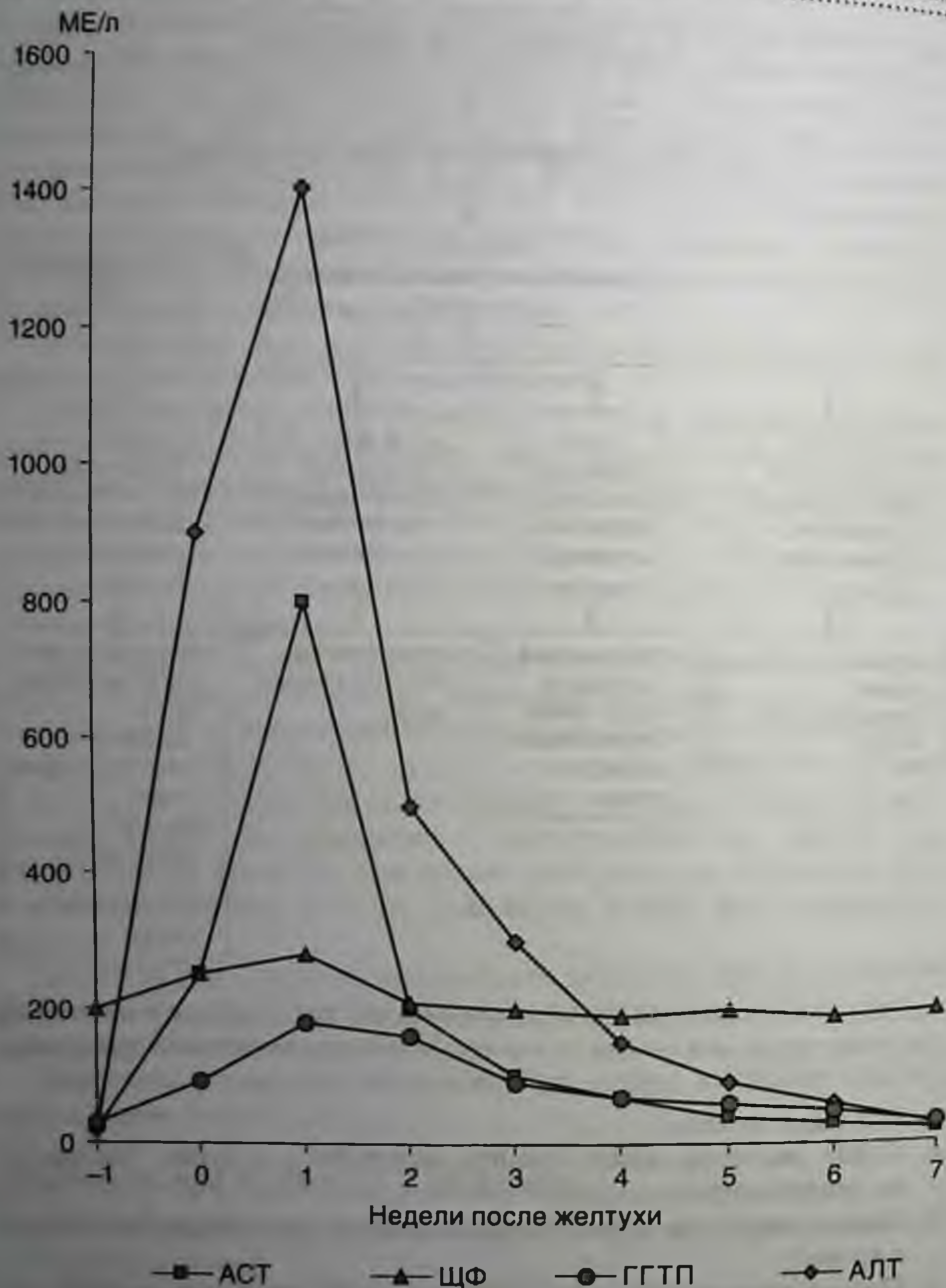


Рис. 12.35. Динамика активности ферментов при остром вирусном гепатите: на оси абсцисс — недели после появления желтухи, на оси ординат — активность ферментов, ME/л

## 12.8. ИССЛЕДОВАНИЕ ВОДНО-ЭЛЕКТРОЛИТНОГО БАЛАНСА

Нормальное функционирование клеток невозможно без стабильности внутренней среды. Нарушения водного и электролитного обмена не происходят изолированно, вне связи друг с другом и КОС. Содержание воды, электролитов, осмолярность, КОС организма строго регулируются взаимосвязанной работой дыхательной, выделительной и эндокринной систем. Снижение или увеличение содержания воды, концентрации электролитов в организме приводит к развитию тяжелых гипо- и гиперосмолярных состояний, перемещению воды из одного водного пространства в другое, что ставит под угрозу жизнедеятельность клетки. Острые нарушения водного баланса, как правило, встречаются при всех острых хирургических заболеваниях органов брюшной полости (перитонит, кишечная непроходимость, панкреатит и др.), травме, шоке, заболеваниях, сопровождающихся лихорадкой, рвотой, диареей, обильным потоотделением. Адекватно оценить характер водно-электролитных нарушений невозможно без данных лабораторных исследований.

### 12.8.1. БАЛАНС ВОДЫ В ОРГАНИЗМЕ

Вода составляет примерно 60–65% массы тела человека. При средней массе человека 70 кг примерно 42 кг приходится на долю воды. Вода внутри тела распределена в жидкостных пространствах (их называют еще компартментами):

- внутриклеточном;
- внеклеточном:
- внутрисосудистом;
- межклеточном, или интерстициальном.

**Внутрисосудистая жидкость** — находящаяся внутри сосудистого русла. Средний объем крови у взрослого — приблизительно 5–6 л, из которых примерно 3 л составляет плазма. Остальные 2–3 л состоят из эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов.

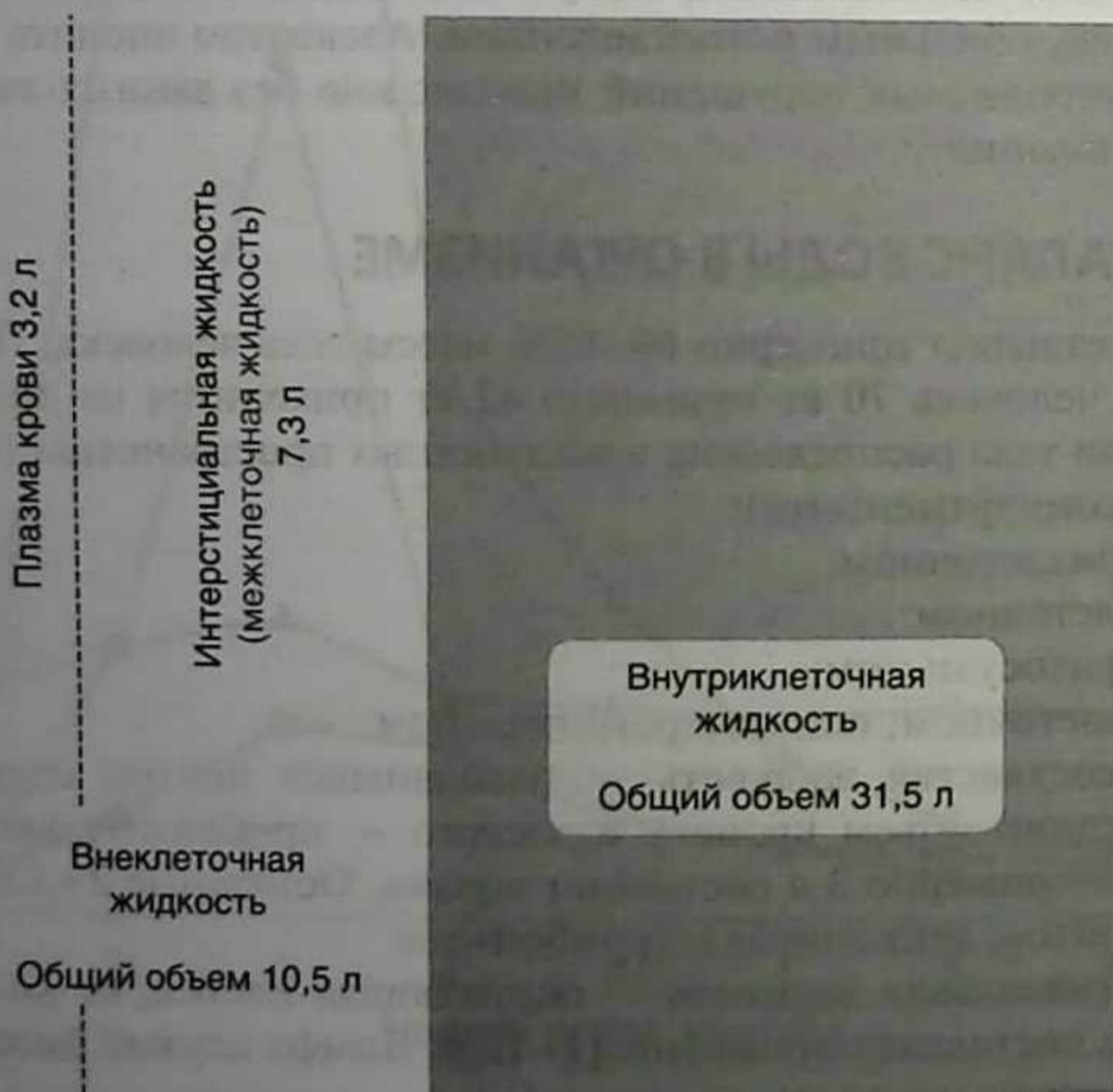
**Интерстициальная жидкость** — окружающая клетки, ее количество у взрослых составляет примерно 11–12 л. Лимфа служит интерстициальной жидкостью.

**Трансцеллюлярная жидкость** — содержащаяся в специализированных полостях тела (спинномозговая, плевральная, внутрибрюшинная, внутри глазного яблока и др.). Ее относят к внеклеточному жидкостному пространству. Эти жидкостные компартменты отличаются

от внеклеточной жидкости тем, что они отделены от плазмы крови эндотелием капилляров и специализированным слоем эпителиальных клеток. Объем трансцеллюлярной жидкости — примерно 1 л. Однако еще больший объем жидкости может перемещаться в течение суток в трансцеллюлярное пространство или из него. Например, желудочно-кишечный тракт в норме секретитрует и реабсорбирует до 6–8 л жидкости ежедневно.

Жидкостные компартменты отделены друг от друга биологическими мембранами. Распределение воды между ними определяется ионным составом соответствующего компартмента, так как вода свободно проникает через мембраны, а растворенные ионы — нет. Клиническая оценка объема жидкости направлена на измерение внеклеточного объема, зависящего от гомеостаза натрия.

Распределение воды в организме человека в процентах от массы тела и абсолютных величинах при средней массе 70 кг представлены на рис. 12.36 и в табл. 12.16.



Общий объем воды в организме взрослого человека с массой тела 70 кг примерно равен 42 л

Рис. 12.36. Распределение воды в организме взрослого человека с массой тела 70 кг

Таблица 12.16. Распределение воды в организме человека в процентах от массы тела и абсолютных величинах при средней массе 70 кг (Bland J., 1959)

Водные пространства	Женщины		Мужчины	
	количество, %	количество, л	количество, %	количество, л
Общая вода тела	54 (44–60)	38,5	60 (50–70)	42
Внутриклеточная вода	40 (30–45)	28,5	45 (35–50)	31,5
Внеклеточная вода	14 (14–22)	9,8	15 (15–22)	10,5
Межклеточная жидкость	10 (10–15)	7	10 (10–18)	7,3
Плазма	4,5 (4–5)	2,8	4 (3,5–4,5)	3,2

Для поддержания биохимических процессов необходимо, чтобы общее количество воды в организме человека и ее распределение между отдельными компартментами сохранялись на постоянном уровне. Обмен воды через клеточные мембраны (между клеточной и внеклеточной жидкостью) в основном зависит от осмолярности растворов по обе стороны мембраны. При наличии равновесия вода не будет перемещаться, и объемы жидкости в компартментах останутся на определенном постоянном уровне.

Осмолярность любого раствора зависит от общей концентрации растворенных в нем ионов (электролитов). В жидких средах организма человека ионы присутствуют в относительно высоких концентрациях по сравнению с другими растворенными веществами, поэтому электролиты и определяют осмолярность. На рис. 12.37 представлено содержание основных электролитов во внутриклеточной и внеклеточной жидкости (для одновалентных ионов мэкв/л = ммоль/л, для двухвалентных — число мэкв/л нужно разделить на 2, чтобы получить количество ммоль/л).

Как видно из рис. 12.37, основным внеклеточным катионом служит натрий, а калия очень мало. Внутри клеток, наоборот, много калия и мало натрия. Эти различия в концентрациях электролитов во внутриклеточной и внеклеточной жидкости поддерживаются с помощью механизма активного транспорта ионов, который осуществляется так называемым натриево-калиевым насосом (рис. 12.38). Такая система активного транспорта (расходуется энергия АТФ) ионов локализована на клеточных мембранах клеток всех типов и осуществляет вывод из клеток ионов натрия в обмен на ионы калия.

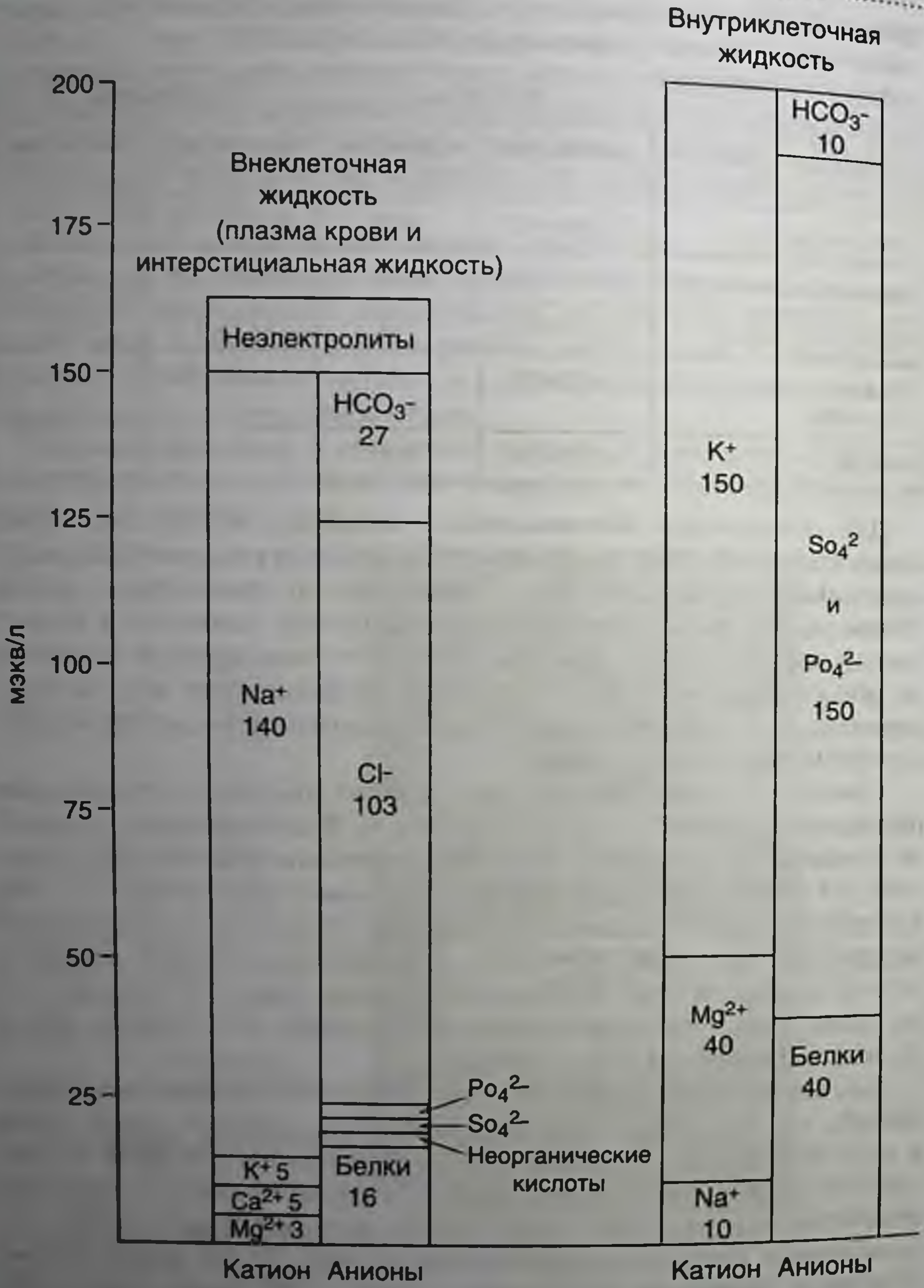


Рис. 12.37. Концентрация растворенных веществ во внутриклеточной и внеклеточной жидкости

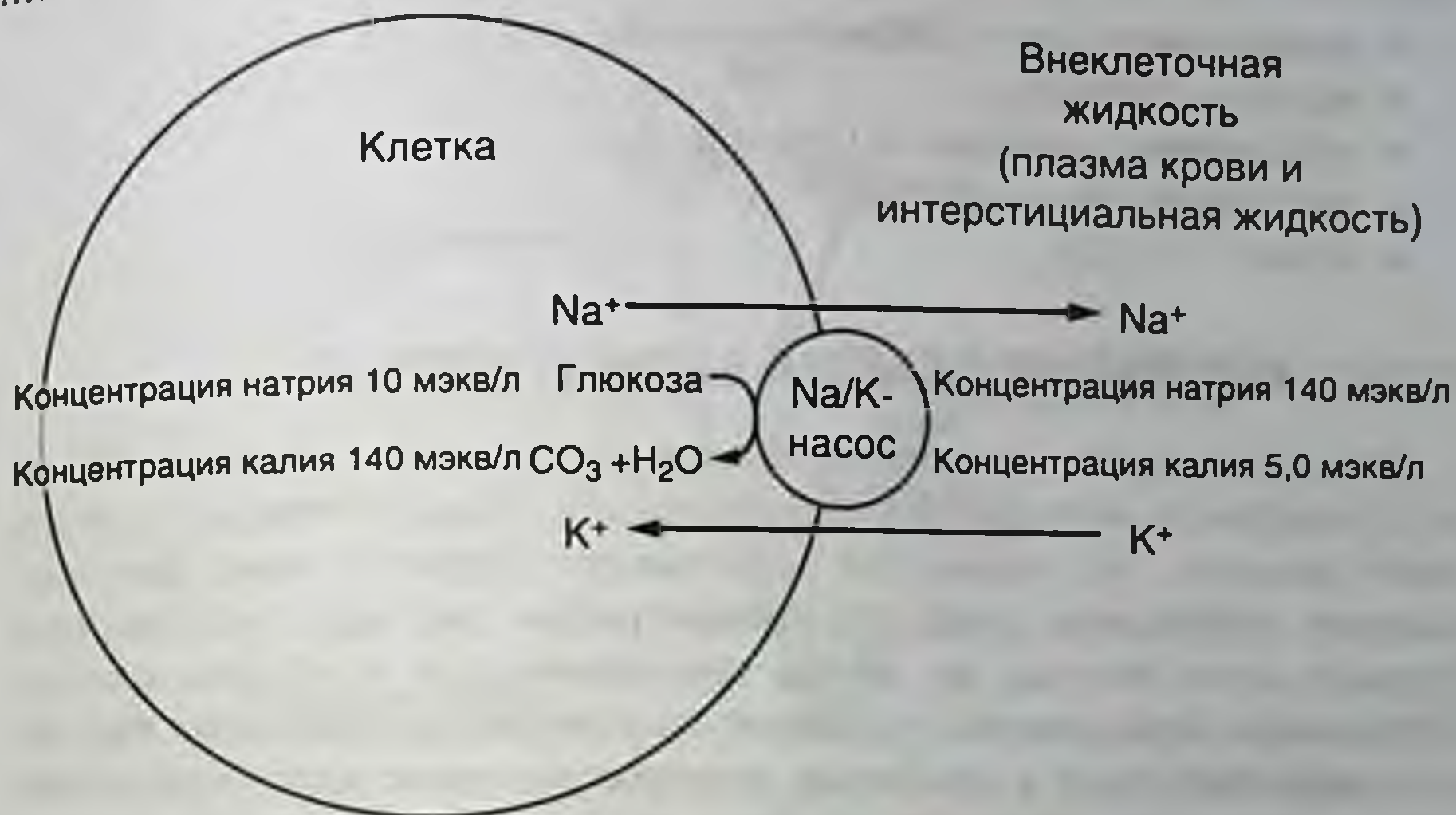


Рис. 12.38. Поддержание концентрации натрия и калия во внутриклеточной и внеклеточной жидкости

Активный транспорт ионов натрия из клетки обеспечивает его высокое содержание во внеклеточной жидкости и тем самым определяет ее высокую осмолярность. Поскольку осмолярность влияет на распределение воды между клеточной и внеклеточной жидкостью, от концентрации натрия зависит объем внеклеточной жидкости.

Чтобы в организме не возникало избытка или недостатка воды, ее поступление должно быть адекватно выведению. Для экскреции из организма продуктов метаболизма почками необходимо выведение как минимум 500 мл мочи. Кроме того, 400 мл воды ежедневно выводится легкими при дыхании, 500 мл теряется при потоотделении через кожу и 100 мл с калом. В итоге за сутки человек теряет около 1500 мл воды.

В организме человека ежедневно синтезируется около 400 мл воды в качестве побочного метаболического продукта. Следовательно, для поддержания водного баланса организм должен получать извне не менее 1100 мл воды в день. В действительности поступление воды обычно превышает этот минимальный уровень, но почки легко выводят избыток жидкости и обеспечивают поддержание водного баланса. Поступление жидкости в организм человека и ее оборот через желудочно-кишечный тракт отражают следующие данные:

- пища и вода — 2000 мл;
- слюна — 1500 мл;

- желудочный сок — 2000 мл;
- желчь — 1000 мл;
- панкреатический сок — 1500 мл;
- кишечный сок — 3000 мл;
- итого — 9–12 л.

## 12.8.2. РЕГУЛЯЦИЯ ОБМЕНА ВОДЫ И НАТРИЯ

Для нормального функционирования клетки нужно, чтобы ее объем и осмолярность внутриклеточной жидкости поддерживались в очень узких пределах. Эти параметры частично регулируются через факторы, которые определяют градиент концентрации раствора электролитов (прежде всего натрия) на уровне плазматической мембраны клетки. Механизмы, определяющие градиент концентраций, включают пассивную диффузию воды и некоторых электролитов через клеточную мембрану и активный транспорт ионов с помощью энергопотребляющих насосов, расположенных в мембране. Постоянство объема клетки и осмолярности определяется также в некоторой степени осмолярностью экстрацеллюлярной жидкости, которая, в свою очередь, регулируется действием антидиуретического гормона (АДГ), влияющего на дистальные каналцы почек и определяющего экскрецию воды в мочу.

В норме натрий — количественно преобладающий внеклеточный катион, который в значительной мере определяет осмотическое давление внеклеточной жидкости. Оно зависит от концентрации и изменяется при колебаниях, скорее, относительных (а не абсолютных) величин содержания воды и натрия.

Если бы поддержание осмолярности экстрацеллюлярной жидкости зависело только от АДГ, то объем крови (плазмы) изменялся в широких пределах в течение дня, так как человек потребляет спорадически различное количество воды и солей. Из-за этих флюктуаций в приеме пищи и воды относительное постоянство объема крови должно контролироваться целым комплексом регуляторных механизмов. В настоящее время изучены и принимают непосредственное участие в регуляции баланса воды и натрия в организме следующие системы:

- АДГ или аргининовый вазопрессин;
- ренин-ангиотензин-альдостероновая система;
- атриальный натрийуретический пептид (АНП).

Главной функцией этих регуляторных гормональных систем служит поддержание постоянства ОЦК через их влияние на движение натрия и воды в почки (рис. 12.39). Эти же гормональные системы определяют количество натрия и воды в экстрацеллюлярной жидкости.



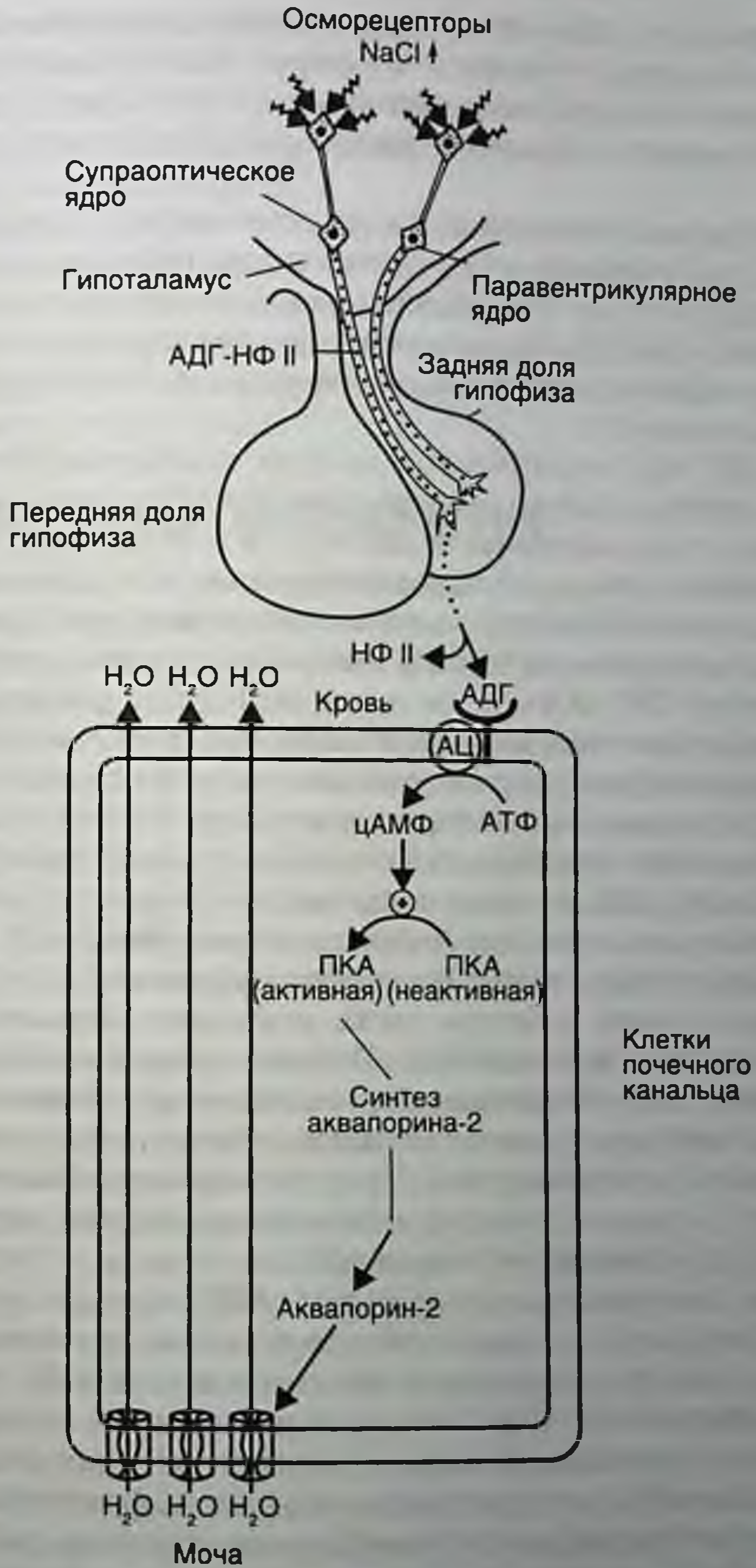


Рис. 12.39. Секреция и действие антидиуретического гормона

Как потребление, так и выделение воды из организма контролируется системой, к числу компонентов которой относят градиент осмотического давления на мембранах клеток гипоталамических центров. Эти анатомически взаимосвязанные центры регулируют жажду и секрецию АДГ.

АДГ — пептид, состоящий из 9 аминокислотных остатков. Он синтезируется как прогормон в гипоталамических нейронах, чьи клеточные тела берут начало в супраоптических и паравентрикулярных ядрах. Нейрофизин II (НФ II), белок-переносчик, транспортирует АДГ вниз по аксонам нейронов, которые оканчиваются в задней доле гипофиза, где АДГ накапливается.

Выход АДГ из накопительных везикул в нейрогипофиз (задняя доля) регулируется в первую очередь осмолярностью плазмы (концентрация осмотически активных веществ в 1 л растворителя, выражают в мОсм/л плазменной воды). Средний уровень осмолярности плазмы в норме составляет 282 мОсм/л с отклонениями в ту или иную сторону 1,8%. Если осмолярность плазмы поднимается выше критического уровня (порога) 287 мОсм/л, то выход АДГ резко ускоряется. Этот выход служит следствием активации осморорецепторов, расположенных на клеточной мембране супраоптического и паравентрикулярных нейронов гипоталамуса и клетках каротидного синуса на сонных артериях. Быстрое увеличение осмолярности плазмы лишь на 2% приводит к усилению секреции АДГ в 4 раза, тогда как уменьшение осмолярности на 2% сопровождается полным прекращением секреции АДГ. При этом концентрация натрия в плазме изменяется на 3 ммоль/л.

Гемодинамические факторы также оказывают выраженное регуляторное влияние на выход АДГ. Падение среднего АД менее чем на 10% может быть обнаружено барорецепторами, расположенными в клетках левого предсердия и в меньшей степени каротидном синусе. Нейроимпульсы от «растянутых» барорецепторов передают информацию нейронам супраоптического и паравентрикулярного ядра гипоталамуса, которые стимулируют выход АДГ.

Главным биологическим эффектом АДГ считают увеличение резорбции свободной воды из мочи, находящейся в просвете дистальной части почечных канальцев, в клетки канальцев. АДГ связывается со специфическими  $V_2$ -рецепторами на наружной мембране этих клеток, вызывая активацию аденилатциклазы (АЦ), которая образует цАМФ. Последний активирует протеинкиназу А, фосфорилирующую белки, которые стимулируют экспрессию гена для аквапорина-2, одного из белков, формирующих каналы для воды. Аквапорин-2 мигрирует к внутренней поверхности мембраны тубулярных клеток, где встраи-

вается в мембрану, формируя поры, или каналы, через которые вода из просвета дистальных канальцев свободно диффундирует внутрь канальцевой клетки. Затем вода проходит из клетки через каналы в плазматической мембране в интерстициальное пространство, откуда поступает в сосудистое русло.

Жажда также служит важным регуляторным механизмом. Увеличение осмолярности плазмы не только уменьшает выделение воды из организма по описанному механизму, но также усиливает жажду, вследствие чего увеличивается поступление воды в организм. Резкое уменьшение ОЦК тоже может стимулировать жажду, несмотря на гипосмолярность плазмы крови.

### 12.8.3. РЕГУЛЯЦИЯ ОБМЕНА НАТРИЯ

Концентрация натрия в плазме крови — одна из наиболее строго регулируемых в организме. Вместе с тем системы, участвующие в регуляции баланса натрия, невозможно рассматривать отдельно от регуляции баланса воды в организме.

Ренин-ангиотензин-альдостероновая система — главная, определяющая постоянство объема и осмолярности экстрацеллюлярной жидкости (в норме в основном определяется концентрацией натрия). Этот каскад фермент (ренин)—пептидный гормон (ангиотензин II)—стероидный гормон (альдостерон) выполняет свою важную функцию благодаря специфической способности обнаруживать и возвращать к норме даже малейшее увеличение или уменьшение объема натрия и воды в организме.

Функционирование сложной ренин-ангиотензин-альдостероновой системы может быть кратко изложено, если использовать как исходное состояние сокращения объема натрия и воды в качестве стимула для ее активации. Например, в случае кровотечения у пациента сокращается ОЦК (экстрацеллюлярной жидкости).

В результате кровотечения падает АД в приводящих артериолах гломерулярных клубочков почек. Юкстагломерулярные клетки, расположенные в стенке этих артериол, улавливают ослабление натяжения стенки артериол, в результате чего выделяется фермент (ренин) в капиллярную кровь гломерул (рис. 12.40). Выделившийся в кровь ренин воздействует на ангиотензиноген (I) — белок плазмы, относящийся к группе  $\alpha$ -2-глобулинов. Белок ангиотензиноген синтезируется и секретируется печенью. Ренин отщепляет от него декапептид (ангиотензин I) в почках. Ангиотензин I (A-I) не имеет биологической функции, но служит субстратом для ангиотензинпревращающего

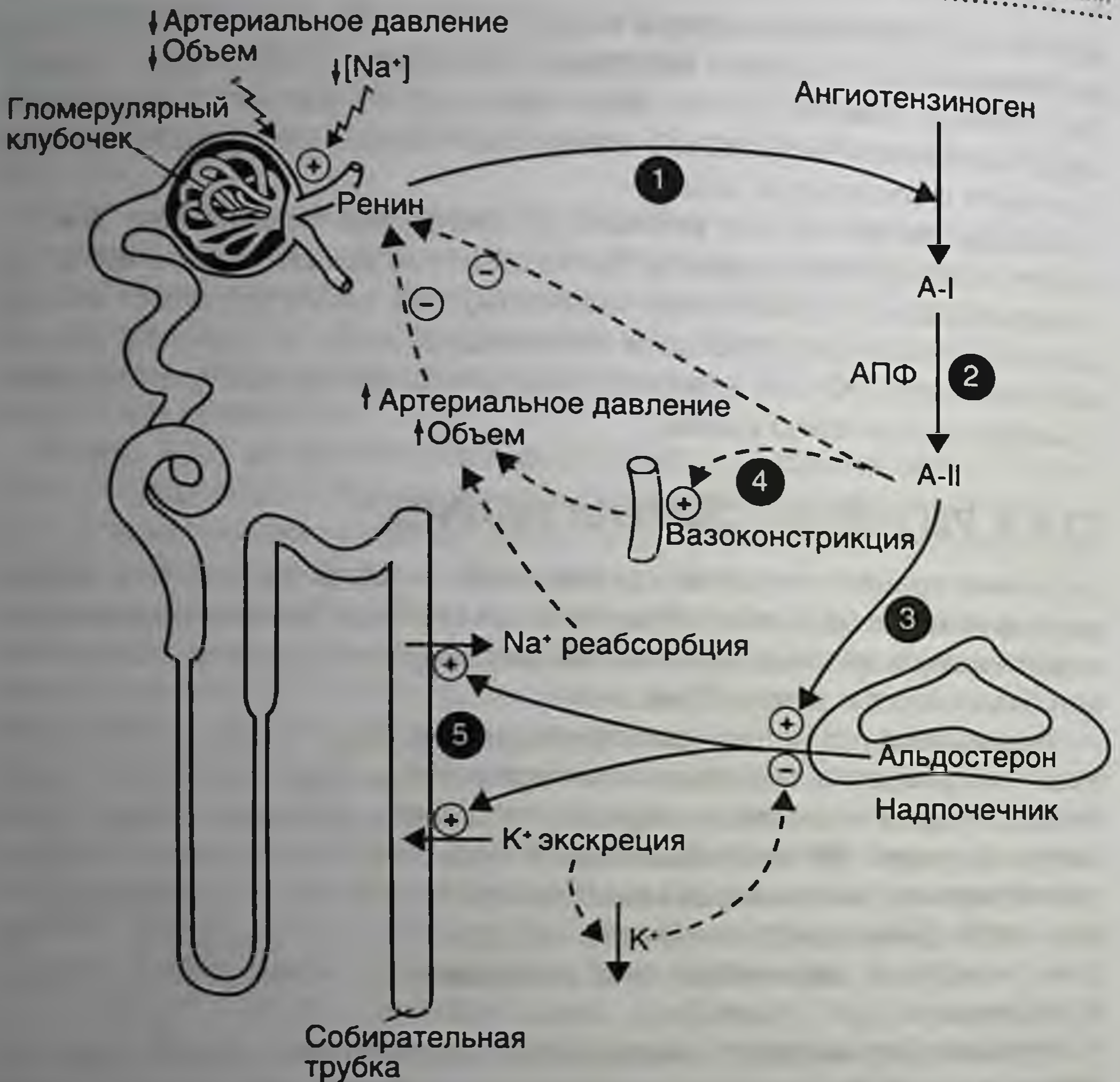


Рис. 12.40. Ренин-ангиотензин-альдостероновая система

фермента (АПФ), который отщепляет от ангиотензина I две аминокислоты (2), образуя ангиотензин II (A-II). Ангиотензин II может осуществлять несколько действий, которые направлены на коррекцию сократившегося объема экстрацеллюлярной жидкости. Одно из таких действий — увеличение синтеза альдостерона (3) и секреции его гломерулярными клетками надпочечников. Другое действие — сужение сосудов (4). Ангиотензин II может превращаться в ангиотензин III, который стимулирует выход альдостерона из надпочечников и, подобно ангиотензину II, ингибирует секрецию ренина. Альдостерон — минералокортикоид, вырабатываемый корой надпочечников, вызывает реабсорбцию натрия и воды (5) в дистальных канальцах почек

(точно так же в дистальном отделе толстой кишки, потовых и слюнных железах). Это действие направлено на восстановление сократившегося объема экстрацеллюлярной жидкости.

Ангиотензин II вызывает прямое увеличение канальцевой реабсорбции натрия и воды в почках, а также обладает прямым сосудосуживающим эффектом и тем самым сокращает объем сосудистого русла, приспособлявая его под сократившийся объем плазмы, который развился вследствие кровопотери. В результате давление крови и тканевая перфузия поддерживаются на нужном уровне. Ангиотензин II также активирует адренергическую (симпатическую) нервную систему, которая быстро выделяет норадреналин. Норадреналин также вызывает сужение сосудов и дополнительно предотвращает снижение АД и кровоснабжение тканей. Наконец, ангиотензин II, контактируя с ЦНС, стимулирует чувство жажды, в результате чего пациент пьет воду и восстанавливает объем экстрацеллюлярной жидкости.

Если же, наоборот, объем плазмы увеличивается (избыточное введение жидкости внутривенно), то активность ренин-ангиотензин-альдостероновой системы подавляется, так как перерастяжение приводящих артериол (юктагломерулярный аппарат почки) вызывает угнетение выхода ренина. Как следствие этого уровень ангиотензина II и альдостерона в крови снижается, что приводит к расширению сосудов, усиленному выведению натрия и воды в мочу (то же происходит в толстой кишке, потовых и слюнных железах). В результате объем экстрацеллюлярной жидкости нормализуется.

Большое значение в регуляции объема натрия и воды отводится АНП, который состоит из 28 аминокислотных остатков. Синтезируется и хранится в виде прогормона (126 аминокислотных остатков) в кардиоцитах правого и левого предсердия и секретируется в виде неактивного димера, который превращается в активный мономер в плазме. Главные факторы, регулирующие секрецию АНП, — увеличенный ОЦК и повышенное центральное венозное давление. Среди других регуляторных факторов необходимо отметить высокое АД, повышенную осмолярность плазмы, учащенное сокращение сердечной мышцы и повышенный уровень катехоламинов в крови. Глюкокортикоиды также увеличивают синтез АНП. Первичной тканью-мишенью для АНП служат почки, но он действует также на периферическое сопротивление артерий (рис. 12.41). В почках АНП усиливает тонус приводящих артериол, повышая тем самым давление в клубочке, то есть увеличивает фильтрационное давление. Он способен сам по себе усиливать фильтрацию, даже если внутриклубочковое давление не изменяется. Это приводит к увеличению выведения натрия (натрийурез) вместе с большим коли-

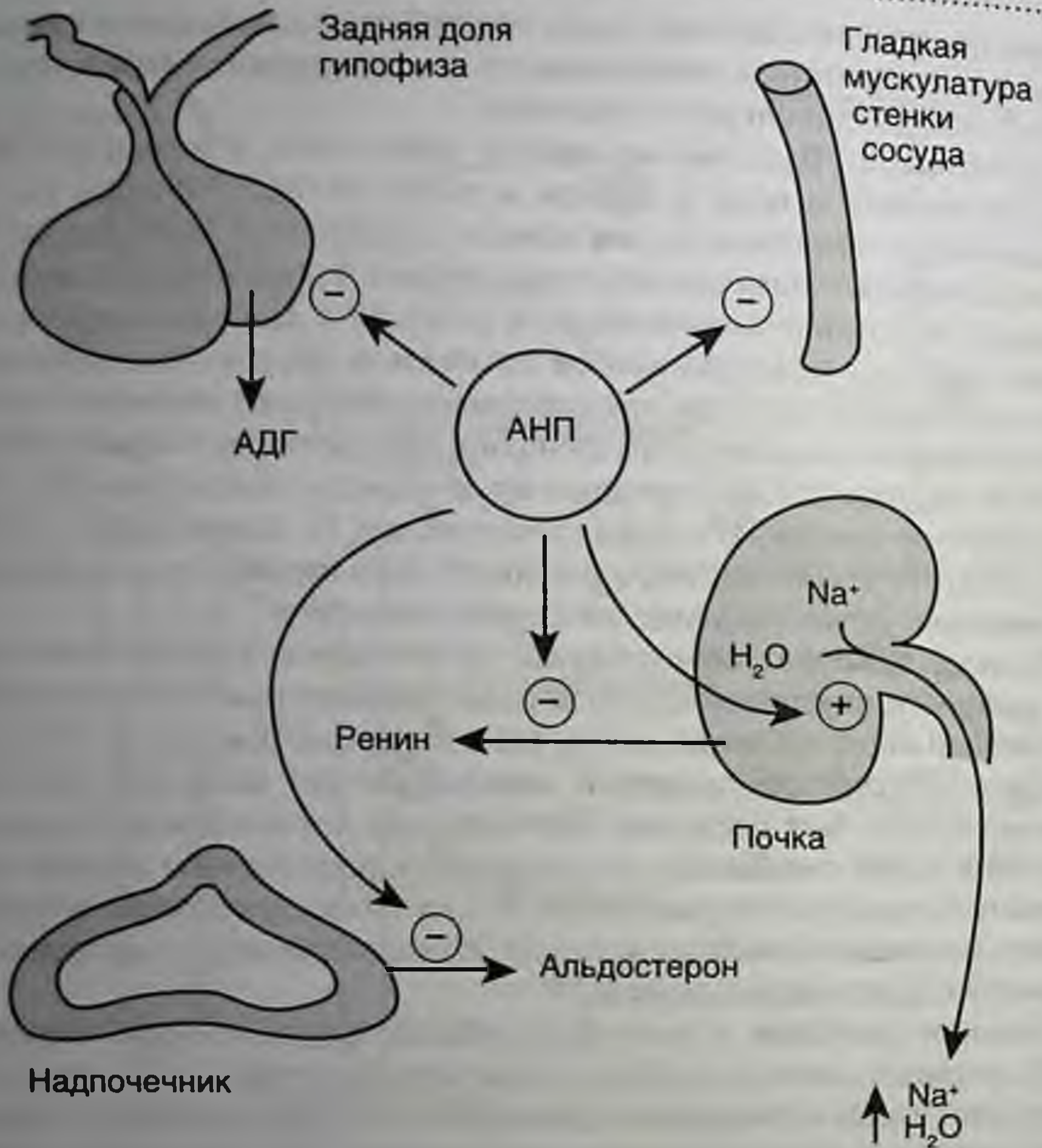


Рис. 12.41. Действие атриального натрийуретического пептида

чеством первичной мочи. Увеличение выведения натрия дополнительно обусловлено подавлением АНП секреции ренина юкстагломерулярным аппаратом. Ингибирование ренин-ангиотензин-альдостероновой системы приводит к усиленному выведению натрия и расширению периферических сосудов. Дополнительно выведение натрия усиливается прямым действием АНП на проксимальные каналцы нефрона и непрямым подавлением синтеза и секреции альдостерона. Наконец, АНП подавляет секрецию АДГ из задней доли гипофиза. Все эти механизмы в конечном счете направлены на то, чтобы вернуть к норме повышенное количество натрия и увеличенный объем воды в организме, возникшие в результате каких-то патологических воздействий.

Механизм действия АНП уникальный. На плазматической мембране клеток-мишеней имеется рецептор к АНП — белок, встроенный в мембрану клетки. Его связывающий участок находится во внеклеточном пространстве. Как только АНП присоединяется к внеклеточному участку рецептора, происходит угнетение синтеза альдостерона и его секреции в кровь.

#### 12.8.4. ВЗАИМОСВЯЗЬ ГОМЕОСТАЗА НАТРИЯ И ВОДЫ

Натрий регулирует секрецию АДГ благодаря своему осмотическому эффекту, а вода — секрецию альдостерона благодаря воздействию на почечный кровоток. АДГ регулирует выведение воды из организма, а альдостерон — натрия. Однако функционирование этих двух систем (АДГ и ренин-ангиотензин-альдостероновой системы) не обеспечивает в достаточной степени поддержание жестких параметров объема натрия и воды в организме. Именно поэтому эти две системы подкреплены третьей регуляторной системой (АНП), которая, с одной стороны, регулирует выделение натрия из организма, а с другой — тормозит секрецию АДГ и регулирует выведение воды. Таким образом, АНП как бы нивелирует те побочные явления, которые могут возникать в организме при избыточной активации одной из двух упоминаемых систем.

#### 12.8.5. ИССЛЕДОВАНИЕ ВОДНОГО БАЛАНСА

Оценку состояния гидратации организма больного проводят на основании клинических данных и результатов лабораторных исследований. Все лабораторные показатели состояния водного обмена можно разделить на три группы:

- характеризующие объем жидкостных пространств;
- осмотические;
- разведения или гемоконцентрации во внеклеточной жидкости — крови.

К показателям, которые характеризуют объем жидкостных пространств организма, относят следующие.

- Общее количество жидкости тела, которое определяют с помощью измерения концентрации веществ, способных равномерно распределяться во всех жидкостных пространствах организма. Для этих целей используют соединения тяжелых изотопов водорода (дейтерий, тритий) и антипирин.
- Объем внеклеточной жидкости определяют с помощью веществ, плохо проникающих в клетки, но быстро покидающих кровь.

К их числу относят тиоцианаты, тиосульфаты, Инулин\*, маннитол, декстран и др.

- Внутрисосудистая жидкость — ОЦК; определяют с помощью веществ, длительно сохраняющихся в кровяном русле, не покидая его. К ним относят синюю краску Эванса и  $^{131}\text{I}$ .
- Объем внутриклеточной жидкости, определяют косвенно по разнице между общим количеством жидкости тела и объемом внеклеточной жидкости.

Определение объема ОЦК чрезвычайно важно в диагностике неотложных состояний. Перечисленные выше способы его определения очень трудоемкие, из-за чего и не получили широкого распространения.

Обычно для определения объема кровопотери во время операции взвешивают тампоны, а объем крови, оставшейся на белье и полу операционной, оценивают приблизительно, что уменьшает действительную кровопотерю на 250–500 мл. Такой подход может привести к ошибочным заключениям о потребности в переливании крови и не должен служить основанием для планирования трансфузионной терапии.

В каждом конкретном случае кровопотерю можно рассчитать, основываясь на доступных данных. Они включают длину и массу тела больного, его возраст и величину гематокрита. Наиболее простой способ расчета ОЦК как у мужчин, так и у женщин основан на использовании массы тела или площади тела больных:

ОЦК (мужчины) = 2,725 л × площадь поверхности тела ( $\text{м}^2$ );

ОЦК (мужчины) = 70,5 мл × масса тела (кг);

ОЦК (женщины) = 2,507 л × площадь поверхности тела ( $\text{м}^2$ );

ОЦК (женщины) = 70,5 мл × масса тела (кг).

Определение ОЦК позволяет выделить три степени гиповолемии: I — дефицит ОЦК 10–12%; II — дефицит ОЦК до 20%; III — дефицит ОЦК свыше 25%.

К осмотическим показателям, характеризующим объем жидкостных пространств, относят следующие:

- концентрацию натрия в сыворотке — косвенный показатель осмотического давления вне клетки;
- средний объем эритроцитов — косвенный показатель осмотического давления вне клетки;
- осмолярность — непосредственно характеризует величину осмотического давления во внеклеточной жидкости.

Разведение или концентрацию крови (внеклеточной жидкости) характеризуют:

- концентрация гемоглобина в крови (Hb);
- гематокритная величина (Ht);



- количество эритроцитов в крови;
- концентрация общего белка в сыворотке.

При потерях внеклеточной жидкости (не обусловленных кровотечениями) в содержимом кровеносных сосудов отмечают уменьшение воды, а также электролитов при одновременном повышении концентрации больших молекул и клеточных элементов, о чем будет свидетельствовать увеличение содержания всех белковых фракций плазмы крови, гемоглобина, гематокрита и количества эритроцитов (концентрирование крови). При повышении уровня гидратации все эти показатели резко уменьшаются (разведение крови). Вместе с тем необходимо учитывать, что на результаты данных исследований оказывают влияние предшествовавшие отклонения от нормы содержания белков или эритроцитов.

### 12.8.6. СИНДРОМЫ НАРУШЕНИЙ ВОДНОГО ГОМЕОСТАЗА

Патология обмена воды в организме приводит к изменению содержания **внеклеточной жидкости**. При дегидратации возникает недостаток воды в организме — гиповолемия, при гипергидратации — избыток воды в организме — гиперволемия.

**Гиповолемия** — уменьшение объема внеклеточной жидкости. О сокращении объема можно говорить в том случае, когда функциональный объем внеклеточной жидкости меньше 20% общей массы тела (то есть меньше 15 л у взрослого человека с массой тела 70 кг). Такое сокращение объема происходит обычно одновременно из интерстициального и внутрисосудистого компартмента и определяется первичной потерей или объема бессолевой воды, или объема комбинации воды и солей. В связи с тем что только 5% общей воды тела человека находится в сосудистом пространстве, потеря бессолевой воды оказывает незначительное влияние на внутрисосудистый объем. Однако большая часть натрия содержится во внеклеточной жидкости, и комбинированная потеря воды и натрия приводит к значительному уменьшению внутрисосудистого объема.

Гиповолемия развивается вследствие аномальных потерь жидкости через кожу, желудочно-кишечный тракт или почки, при кровотечении, сниженном поступлении жидкости.

**Гиперволемия** — увеличение объема внеклеточной жидкости. Она возникает в случае:

- хронической стимуляции почек для сохранения в организме натрия и воды;
- аномальной почечной функции со снижением экскреции натрия и воды;

- чрезмерного внутривенного введения жидкостей;
- перемещения жидкости из интерстициального пространства в плазму.

В зависимости от объема внеклеточной жидкости и осмотического давления (осмолярности) плазмы крови выделяют следующие формы нарушений баланса воды в организме.

- Дегидратация (дефицит воды):
  - ▶ гипертоническая (гипернатриемическая);
  - ▶ изотоническая;
  - ▶ гипотоническая (гипонатриемическая).
- Гипергидратация (избыток воды):
  - ▶ гипертоническая (гипернатриемическая);
  - ▶ изотоническая;
  - ▶ гипотоническая (гипонатриемическая).

#### 12.8.6.1. СИНДРОМЫ ДЕГИДРАТАЦИИ

Гипертоническая дегидратация характеризуется абсолютным или преобладающим дефицитом жидкости с повышением осмотического давления плазмы и возникает в том случае, если потери воды организмом превышают потери электролитов (натрия). Среди причин, вызывающих эту форму дегидратации, — длительная лихорадка, одышка, потери воды при заболеваниях почек в стадии полиурии, сахарный и несахарный диабет, прием диуретиков, отсутствие поступления воды в организм. Для развития этого синдрома требуется время, так как вначале он компенсируется за счет внутриклеточной воды и уменьшения клубочковой фильтрации и диуреза. Если вода не поступает в организм, то появляются лабораторные признаки сгущения крови (увеличение гемоглобина, гематокрита, общего белка) и повышаются показатели осмолярности. Компенсаторное снижение диуреза (олигурия) приводит к полной анурии и развитию почечной недостаточности. Затем появляются симптомы метаболического ацидоза и изменение показателей КОС. При лабораторных исследованиях относительная плотность мочи выше 1,025, концентрация натрия в сыворотке крови превышает 147 ммоль/л, повышенная осмолярность плазмы.

В зависимости от потерь воды организмом выделяют следующие степени тяжести гипертонической дегидратации:

- I (потеря 1–2 л) — жажда, олигурия;
- II (потеря 4–5 л) — жажда, олигурия, сухость кожи, слизистых оболочек и языка, общая слабость;
- III (потеря 7–8 л) — помутнение сознания, нарушение кровообращения.

**Изотоническая дегидратация** характеризуется дефицитом воды и растворенных в ней веществ при нормальном осмотическом давлении плазмы. Она возникает вследствие потерь воды и электролитов (изотоническая потеря). Причины, приводящие к этой форме дегидратации: понос, неукротимая рвота, кишечная непроходимость, большая кровопотеря, свищи тонкого кишечника, потери желчи, панкреатического сока. Эта форма развивается очень быстро, компенсаторные механизмы не успевают включиться, поэтому на 1-м месте в первые часы дегидратации возникают симптомы расстройства гемодинамики, а затем — изменения лабораторных данных. Показатели гемоконцентрации увеличиваются (гемоглобин, гематокрит), а показатели осмолярности не изменяются или изменены незначительно. Относительная плотность мочи высокая, концентрация натрия и хлора в моче снижена. Постепенно развивается компенсаторная анурия, появляются лабораторные признаки почечной недостаточности (увеличение концентрации креатинина и мочевины в сыворотке крови). Изотоническая дегидратация может быстро перейти в шок (быстрее, чем гипертоническая дегидратация).

В зависимости от потерь воды организмом выделяют следующие степени тяжести изотонической дегидратации:

- I (потеря около 2 л) — утомляемость, тахикардия, ортостатический коллапс;
- II (потеря около 4 л) — апатия, потеря аппетита, рвота, снижение АД в положении лежа;
- III (потеря 5–6 л) — помутнение сознания, шок, АД в положении лежа ниже 90 мм рт.ст. (систолическое).

**Гипотоническая дегидратация** характеризуется потерями воды и электролитов. Электролитов теряется значительно больше, чем воды, что приводит к падению осмотического давления плазмы. Общее содержание натрия уменьшено. В результате внеклеточное пространство уменьшено, клетки перенасыщены водой. Причины, приводящие к этой форме дегидратации: полиурическая стадия почечной недостаточности, применение диуретиков при бессолевой диете, недостаточность коры надпочечников, гастроэнтериты, рвота, понос, кистоз поджелудочной железы, травмы головного мозга, энцефалиты. При данной форме дегидратации компенсация идет за счет выделительной функции почек и перехода воды внутрь клетки из внеклеточного пространства. Показатели гемоконцентрации значительно повышены, а осмотические снижены (осмолярность плазмы ниже 280 мОсм/л, натрия — ниже 137 ммоль/л). Относительная плотность мочи низкая, концентрация натрия в моче ниже 10–30 ммоль/сут. Гипотоническая дегидратация может быстро привести к шоку.

В зависимости от потерь натрия организмом выделяют следующие степени тяжести гипотонической дегидратации:

- I (потери натрия до 9 ммоль/кг массы тела) — слабость, головокружение, АД в положении лежа в норме;
- II (потери натрия до 12 ммоль/кг массы тела) — рвота, помутнение сознания, сниженное АД в положении лежа;
- III (потери натрия до 21 ммоль/кг массы тела) — шок, потеря сознания, АД в положении лежа ниже 90 мм рт.ст. (систолическое).

### 12.8.6.2. СИНДРОМЫ ГИПЕРГИДРАТАЦИИ

Различают следующие формы гипергидратации.

**Гипертоническая гипергидратация** характеризуется избытком воды и электролитов в организме больного с повышением осмотического давления плазмы. Причины, приводящие к гипертонической гипергидратации: обильное питье соленой воды, передозировка гипертонических растворов натрия хлорида. При этой форме дегидратации компенсация происходит за счет поступления воды из клеток во внеклеточное пространство, в результате чего клетки обезвоживаются. В лабораторных показателях — признаки гемодилюции (снижение гемоглобина, гематокрита, общего белка) и повышение осмолярности плазмы. Лечение данного вида нарушений сводится к прекращению вливания солевых растворов, введению осмотических диуретиков с целью ликвидации отеков и стимуляции функции почек.

**Изотоническая гипергидратация** характеризуется избытком воды и солей в эквивалентных количествах в организме больного при нормальном осмотическом давлении плазмы. При изотонической гипергидратации страдает в основном внеклеточный компартмент (особенно интерстициальное пространство). Причины, приводящие к этой форме гипергидратации: цирроз печени, заболевания сердца, почек, чрезмерное введение изотонического раствора натрия хлорида (особенно если нарушена функция почек). Изотоническая гипергидратация развивается при замещении внутрисосудистой потери (кровь, плазма) не коллоидными растворами, а растворами электролитов (кристаллоидами). Лабораторные исследования выявляют признаки гемодилюции (незначительное снижение гематокрита), показатели осмолярности в норме.

**Гипотоническая гипергидратация** (водное отравление) — первичный избыток воды в организме с падением осмотического давления плазмы. При гипергидратации поражаются преимущественно клетки. В большинстве случаев гипотоническая гипергидратация имеет ятрогенное

происхождение как результат неправильного лечения синдромов дегидратации (изотонической и гипотонической), после сифонных клизм и промываний желудка большим количеством воды. При гипотонической гипергидратации концентрация натрия в крови и внеклеточном пространстве низкая, вода идет в клетку. Поначалу почки обеспечивают компенсацию (альдостероновый механизм не успевает включиться), а затем развивается олигурия за счет включения альдостеронового механизма регуляции  $\text{Na}^+$ . Низкая концентрация  $\text{Na}^+$  в организме стимулирует выработку альдостерона, который повышает реабсорбцию натрия в моче. Натрий забирает из мочи воду, вследствие чего развивается анурия. Показатели гемоконцентрации и осмолярность плазмы снижены. Осмолярность менее 270 мОсм/л, концентрация натрия ниже 120 ммоль/л. Это ведет к водному отравлению клеток и накоплению жидкости во внеклеточном пространстве (асцит, гидроторакс и др.). В лечении этой формы необходимо гипотоническую гипергидратацию перевести в изотоническую.

Изменения лабораторных показателей при различных формах нарушений водного баланса представлены в табл. 12.17.

**Таблица 12.17.** Лабораторные показатели при различных формах нарушений водного баланса

Показатель	Дегидратация			Гипергидратация		
	гипер-	изо-	гипо-	гипер-	изо-	гипо-
Число эритроцитов	↑	↑	↑	↓	↓	↓
Гемоглобин	↑	↑	↑	↓	↓	↓
Гематокрит	Н, ↑	↑	↑↑	↓↓	↓	Н, ↓
Средний объем эритроцитов	↓	Н	↓	↓	Н	↑
Общий белок	↑	↑	↑	↓	↓	↓
Концентрация $\text{Na}^+$ в плазме	↑	Н	↓	↑	Н	↓
Осмолярность плазмы	↑	Н	↓	↑	Н	↓

**Примечание:** Н — нормальные показатели; ↑ — увеличение показателя; ↓ — снижение показателя.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ

1. Сколько воды содержится в организме здорового человека?
2. В каких жидкостных пространствах находится вода в организме человека?
3. Какие системы и органы участвуют в регуляции воды в организме человека?

4. Какие системы участвуют в регуляции обмена натрия?
5. Какие лабораторные показатели характеризуют состояние водного баланса в организме человека?
6. Что такое гиповолемия?
7. Перечислите основные формы нарушения водного баланса в организме человека.

### 12.8.7. СИНДРОМЫ НАРУШЕНИЙ ЭЛЕКТРОЛИТНОГО ГОМЕОСТАЗА

Нарушения баланса электролитов, выполняющих важные функции в организме человека, вызывают значительные изменения в функционировании жизненно важных органов. Электролиты — положительно (катионы) или отрицательно (анионы) заряженные ионы, находящиеся в растворе (плазме крови).

Снижение или увеличение содержания воды, концентрации электролитов в организме приводит к развитию тяжелых состояний, перемещению воды из одного водного пространства в другое, что ставит под угрозу жизнедеятельность клеток органов и тканей.

#### 12.8.7.1. ГОМЕОСТАЗ НАТРИЯ

В организме здорового человека с массой около 70 кг содержится около 3500 ммоль или 150 г натрия. Около 20% этого количества сконцентрировано в костях и непосредственного участия в метаболизме не принимает. Основная часть натрия почти полностью находится в жидкости внеклеточного пространства. Натрий служит основным катионом внеклеточной жидкости, где его концентрация в 6–10 раз выше, чем внутри клеток. Физиологическое значение натрия заключается в поддержании осмотического давления и рН во внутри- и внеклеточных пространствах. Он влияет на процессы нервной деятельности, состояние мышечной и сердечно-сосудистой системы.

Поддержание натриевого баланса имеет большое значение для нормального функционирования организма. С пищей взрослый человек получает ежедневно в среднем 100–200 ммоль натрия (2,3–4,6 г). Это больше, чем необходимо. Излишек выводится с мочой. Почечная регуляция выведения натрия позволяет поддерживать баланс, несмотря на широкую вариабельность его поступления с пищей. Выведение натрия почками зависит прежде всего от СКФ. Высокая скорость увеличивает выведение натрия, а низкая — способствует его задержке в организме. Основное количество натрия (96–99%), которое филь-

.....  
труется в клубочках, активно реабсорбируется при прохождении мочи через извитые канальцы. Ко времени достижения фильтратом дистальных канальцев нефрона в нем остается только 1–5% всего отфильтрованного в клубочках натрия. Дальнейшая судьба оставшегося натрия (будет он выведен с мочой или реабсорбирован) зависит главным образом от концентрации в крови альдостерона (гормона, секретлируемого надпочечниками), который действует на клетки дистальных канальцев, усиливая реабсорбцию натрия в обмен на ионы калия или водорода. Именно поэтому в присутствии высоких концентраций альдостерона в крови основное количество оставшегося натрия реабсорбируется, а если концентрация гормона низкая, то натрий не реабсорбируется и выводится с мочой в относительно больших количествах. У здорового человека выделение натрия почками колеблется в большом диапазоне, от 1 до 150 ммоль за 24 ч (0,023–3,45 г).

Натрий выводится из организма не только почками (с мочой), но и желудочно-кишечным трактом (с калом) и кожей (с потом). С калом теряется от 1 до 10 ммоль/сут, а остальное количество реабсорбируется. Недостаточность реабсорбции натрия в желудочно-кишечном тракте неизбежно приводит к дефициту натрия, особенно если он происходит на фоне нарушения функции почек. В целом баланс натрия в организме зависит главным образом от:

- нормальной функции почек;
- адекватной секреции альдостерона корой надпочечников;
- нормального функционирования желудочно-кишечного тракта.

Значительное увеличение или уменьшение содержания натрия в сыворотке крови наступает вследствие непропорциональных потерь воды и солей. Эти состояния могут требовать неотложной помощи.

Концентрация натрия в сыворотке крови зависит от относительного содержания в ней натрия и воды. Однако так как основная часть натрия находится не в плазме крови, а во внеклеточной жидкости, то, определив концентрацию натрия в крови, нельзя точно знать, сколько его содержится во внеклеточной жидкости. Именно поэтому и при избытке, и при недостатке натрия во внеклеточной жидкости концентрация его в сыворотке крови может быть повышенной, нормальной или сниженной в зависимости от количества воды в межклеточном пространстве. Тем не менее этот анализ совместно с определением концентрации общего белка в сыворотке крови, натрия в моче (анализ показывает, сколько натрия выводится из организма) позволяет установить тенденцию изменения содержания натрия и воды в организме больного.

Референтные величины содержания натрия в сыворотке крови составляют 135–145 ммоль/л (мэкв/л). Если концентрация натрия становится ниже 135 ммоль/л, говорят о гипонатриемии, а при значениях выше 145 ммоль/л — о гипернатриемии. Концентрацию натрия в клинической практике целесообразно определять в следующих случаях:

- при обезвоживании организма или избыточной потере жидкости для выбора соответствующей инфузионной терапии;
- при внутривенном введении жидкости пациентам, находящимся в реанимационном отделении;
- пациентам с нарушениями сознания, поведения или признаками чрезмерной возбудимости ЦНС.

### 12.8.7.1.1. Гипонатриемия

Гипонатриемия — состояние, при котором концентрация натрия в плазме крови ниже 135 ммоль/л. Как уже упоминалось, обмен натрия и воды тесно связан. Именно поэтому концентрация натрия в сыворотке крови зависит от двух переменных: количества натрия в межклеточной жидкости и объема межклеточной жидкости. Гипонатриемию встречают при целом ряде заболеваний. Она может развиваться, если натрий усиленно выводится из организма (потери натрия) с водой или объем воды в межклеточной жидкости слишком большой по сравнению с количеством натрия (то есть когда происходит разбавление натрия).

Гипонатриемия, обусловленная потерями натрия, может быть разделена на два вида: избыточная и непочечная. Среди основных причин гипонатриемии, связанной с потерей через почки, выделяют следующие.

- Форсированный диурез:
  - ▶ прием диуретиков;
  - ▶ сахарный диабет с глюкозурией;
  - ▶ гиперкальциурия;
  - ▶ внутривенное введение контрастных веществ при рентгенологических исследованиях.
- Заболевания почек:
  - ▶ хроническая почечная недостаточность;
  - ▶ острый и хронический пиелонефрит;
  - ▶ обтурация мочевыводящих путей;
  - ▶ поликистоз почек;
  - ▶ применение в лечении антибиотиков группы аминогликозидов (гентамицин).
- Недостаточность коры надпочечников (болезнь Аддисона).



Выведение натрия с мочой регулируется гормоном надпочечников — альдостероном. При низкой секреции альдостерона (недостаточность коры надпочечников) вследствие снижения реабсорбции натрия в канальцах нефрона увеличивается выведение натрия с мочой. Это приводит к снижению концентрации его в крови.

Непочечная потеря натрия связана с болезнями желудочно-кишечного тракта, которые сопровождаются рвотой или поносом. Потери натрия могут происходить через фистулу тонкой кишки, илеостому, билиарную фистулу. Избыточные потери натрия через кожу включают потери при обильном потении, например, при работе в жарких помещениях и жарком климате (особенно у неакклиматизированных людей), наличии обширных ожогов и их замедленном заживлении. Влияние этих факторов на концентрацию натрия в сыворотке крови зависит от того, какова была концентрация этого элемента в потерянной жидкости. При сильной рвоте, поносе или потоотделении теряется в основном вода, поэтому концентрация натрия в сыворотке крови возрастает. Однако, если в этих условиях потери жидкости восполняются внутривенным введением гипотонического раствора, может развиваться гипонатриемия. Именно такое лечение часто служит причиной гипонатриемии.

При неконтролируемом СД повышается осмолярность плазмы крови (вследствие увеличения концентрации глюкозы), что приводит к переходу воды из клеток во внеклеточную жидкость (кровь), то есть к разведению натрия — гипонатриемии. Проблема усугубляется и тем, что глюкоза активно выводится почками, вызывая осмотический диурез, который усиливает потери натрия с мочой и усугубляет гипонатриемию.

Избыток воды в организме приводит к гипонатриемии, которая может развиваться остро при избыточном потреблении воды, но такое случается редко. Здоровые почки способны выводить воду со скоростью 1 л/ч, и поэтому избыток воды и гипонатриемия могут развиваться только при быстром приеме очень больших количеств жидкости, что случается при психозах или с большими любителями пива. Патогенетические механизмы развития гипонатриемии включают ощущение жажды во время психоза и соответственно прием большого количества воды, что приводит к гипонатриемии. Чаще всего избыток воды и гипонатриемия возникают при избыточном внутривенном введении гипотонической жидкости в сочетании с нарушением выделительной функции почек у этих больных.

Основная причина гипонатриемии разбавления (избытка воды в организме) — синдром неадекватной секреции АДГ, состояние, характеризующееся постоянным автономным высвобождением АДГ или усиленной реакцией почек на нормальный уровень АДГ в крови. Основная

функция АДГ состоит в задержке воды в организме. АДГ стимулирует реабсорбцию воды канальцами почек, что ведет к увеличению объема воды в организме и развитию гипонатриемии.

Гипонатриемия может возникать и в результате патологического накопления жидкости в межклеточном пространстве, которое обуславливают застойная сердечная недостаточность, нефротический синдром, цирроз печени и др. Общее содержание в организме воды растет в большей степени, чем концентрация в нем натрия. В результате развивается гипонатриемия. При избытке воды и натрия возникают отеки, то есть жидкость начинает накапливаться в межклеточном пространстве.

В ряде случаев при получении результатов анализов со сниженной концентрацией натрия у больного можно предположить наличие так называемой ложной, или псевдогипонатриемии. Ложная гипонатриемия возможна, когда концентрация натрия в плазме не уменьшена, но используемый для анализа лабораторный метод исследования дает неправильные результаты. Это может произойти при высокой концентрации липидов (гиперлипидемии), белков (общий белок выше 100 г/л) или глюкозы в крови у больного. В таких ситуациях повышается неводная, не содержащая натрия фракция плазмы. Данная гипонатриемия коррекции не требует.

Большинство пациентов с содержанием натрия в сыворотке крови выше 135 ммоль/л не имеют клинических симптомов. Когда концентрация натрия находится в диапазоне 125–130 ммоль/л, преобладающими симптомами будут апатия, потеря аппетита, тошнота, рвота. Нейропсихические симптомы преобладают, когда содержание натрия становится ниже 125 ммоль/л, в основном это происходит из-за отека мозга. Такими симптомами будут головная боль, сонливость, обратимая атаксия, психоз, судороги, нарушение рефлексов, кома. Жажды у таких больных, как правило, не наблюдают. При концентрации натрия в сыворотке крови 115 ммоль/л и ниже пациент жалуется на усталость, головную боль, тошноту, рвоту, анорексию, возникают признаки спутанности сознания. При концентрации 110 ммоль/л проявления нарушений сознания усиливаются, и пациент впадает в кому. Если это состояние своевременно не корректировать, развивается гиповолемический шок и наступает смерть.

### 12.8.7.1.2. Гипернатриемия

Гипернатриемию встречают значительно реже, чем гипонатриемию. Она может быть следствием избытка натрия в организме, но чаще возникает в результате потерь жидкости.

Гипернатриемия может развиваться, даже если содержание натрия в организме не выходит за пределы нормы, но при этом потери воды с мочой, потом, калом и выдыхаемым воздухом превышают ее поступление в организм больного. Потеря натрия с любой жидкостью тела, за исключением кишечного и панкреатического сока (содержание натрия в этих жидкостях велико, поэтому при их потере развивается гипонатриемия), приводит к гипернатриемии (общее содержание натрия в организме снижается). Такую гипернатриемию (концентрация натрия в сыворотке выше 150 ммоль/л) могут вызвать:

- повышенные потери воды через дыхательные пути во время одышки, при лихорадке, трахеостоме, проведении искусственной вентиляции легких в условиях недостаточного увлажнения дыхательной смеси, использовании неувлажненного кислорода;
- обильное потоотделение без соответствующей водной компенсации;
- открытое лечение ожогов;
- несахарный диабет — нечувствительность рецепторов почек к АДГ, что приводит к потере большого количества воды с мочой.

При всех этих состояниях принято считать, что повышение концентрации натрия в сыворотке крови сверх 145 ммоль/л на каждые 3 ммоль/л означает дефицит 1 л внеклеточной воды в организме больного. Гипернатриемия, обусловленная потерей воды, служит серьезным осложнением, которое может привести к шоку.

Большинство пациентов с прогрессирующим хроническим заболеванием почек имеют нарастающий дефект — неспособность почек концентрировать мочу. Хроническая почечная недостаточность, возникшая по любой причине, может привести к резистентности (устойчивости) к действию АДГ, что проявляется выделением мочи с низким содержанием натрия и развитием гипернатриемии.

Гипернатриемия может возникнуть в результате избыточного введения натрийсодержащих растворов пациентам с его недостатком. Солевая перегрузка организма нередко развивается при кормлении больных через зонд концентрированными смесями без соответствующего введения воды при длительном бессознательном состоянии, после операций на головном мозге, в связи с обструкцией пищевода, при питании через гастростому.

Гиперальдостеронизм (избыточная секреция альдостерона аденомой или опухолью надпочечников) также сопровождается развитием гипернатриемии. Почки в ответ на повышенное содержание натрия в крови выводят меньше воды, что способствует нормализации уровня натрия в плазме. Однако полной нормализации не происходит.

Именно поэтому при гиперальдостеронизме (синдром Кона), как правило, обнаруживают незначительное повышение концентрации натрия в сыворотке крови.

Клинические проявления, связанные с гипернатриемией как таковой, — жажда, дрожь, раздражительность, атаксия, мышечные подергивания, спутанность сознания, эпилептические припадки и кома. Симптомы ярко выражены при резком подъеме концентрации натрия в сыворотке крови.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ

1. Какие значения концентрации натрия в сыворотке указывают на гипонатриемию?
2. Перечислите основные причины гипонатриемии.
3. Назовите основные клинические проявления гипонатриемии.
4. Какие значения концентрации натрия в сыворотке указывают на гипернатриемию?
5. Перечислите основные причины гипернатриемии.
6. Назовите основные клинические проявления гипернатриемии.

### 12.8.8. ГОМЕОСТАЗ КАЛИЯ

Калий играет важную роль в физиологических процессах сокращения мышц, функциональной деятельности сердца, проведении нервных импульсов, ферментных процессах и обмене веществ.

В организме здорового человека с массой тела около 70 кг содержится 3150 ммоль калия (45 ммоль/кг у мужчин и около 35 ммоль/кг у женщин) или 122,85 г. Всего 50–60 ммоль (1,95–2,34 г) калия находится во внеклеточном пространстве, остальное его количество распределено в клеточном пространстве (внутри клеток). Суточное потребление калия составляет 60–100 ммоль (2,34–3,9 г). Почти такое же количество выделяется с мочой и лишь немного (около 2%) — с каловыми массами. В норме почка выделяет калий со скоростью до 6 ммоль/кг в сутки. Как и натрий, калий фильтруется через почечные клубочки, в основном реабсорбируется в начальной части почечных канальцев. Тонкая регуляция выведения калия с мочой осуществляется в дистальных канальцах и собирательных трубках почек. Здесь калий может секретироваться в обмен на ионы натрия или реабсорбироваться. Натриево-калиевый обмен усиливается под действием ренин-ангиотензин-альдостероновой системы. Альдостерон активирует реабсорбцию натрия и выведение калия.

Около 60 ммоль калия (2,34 г) в нормальных условиях секретруется в желудочно-кишечный тракт, но с калом теряется только 10 ммоль (0,39 г). Остальное количество калия подвергается реабсорбции. Если последняя нарушается, может развиваться дефицит калия.

Высокая концентрация калия внутри клеток и низкая в межклеточной жидкости и плазме крови поддерживается при помощи натриево-калиевого насоса. Усиление или ингибирование (угнетение) этого насоса сказывается на уровне калия в плазме крови, так как изменяется соотношение его концентрации внутри клеток и во внеклеточной жидкости.

Концентрация калия в сыворотке — показатель его общего содержания в организме. Однако на его распределение между клетками и внеклеточной жидкостью могут влиять различные факторы (нарушение КОС, повышение внеклеточной осмолярности, дефицит инсулина). Так, при сдвиге рН крови на 0,1 следует ожидать изменения калия на 0,1–0,7 ммоль/л в противоположном направлении (то есть при снижении рН на 0,1 концентрация калия в сыворотке крови увеличивается на 0,1–0,7 ммоль/л и наоборот). Именно поэтому изменение уровня калия в плазме крови еще не означает, что имеется дефицит калия в организме в целом. Это может свидетельствовать и просто о нарушении нормальной пропорции между внутри- и внеклеточным содержанием калия.

Поддержание нормального уровня калия в плазме крови зависит от:

- адекватного поступления в организм калия с пищей;
- нормальной функции почек;
- нормального функционирования желудочно-кишечного тракта;
- поддержания КОС на нормальном уровне;
- нормальной работы натриево-калиевого насоса.

Референтные величины содержания калия в сыворотке — 3,5–5,0 ммоль/л (мэкв/л). В оценке состояния электролитного баланса имеют значение лишь очень низкие и очень высокие показатели калия, выходящие за рамки нормы. В клинических условиях к гипокалиемии относят концентрацию калия ниже 3,5 ммоль/л, а к гиперкалиемии — выше 5,0 ммоль/л. Надежность этих показателей как критериев калиемии значительно повышается, если определяют их многократную повторяемость.

### 12.8.8.1. ГИПОКАЛИЕМИЯ

При нормальном рН крови нормальная концентрация калия в сыворотке крови может скрывать фактически существующий общий дефи-

цит его в организме, вплоть до 200 ммоль (7,8 г). Снижение сывороточной концентрации калия на каждый 1 ммоль/л соответствует, как правило, общему дефициту на уровне примерно 350 ммоль (13,65 г). Концентрация калия в сыворотке ниже 2 ммоль/л указывает на общий его дефицит в организме, превышающий 1000 ммоль (39 г).

Недостаточное поступление калия с пищей редко приводит к гипокалиемии. Наиболее часто последняя развивается в результате увеличения потерь калия из организма. В клинической практике к гипокалиемии приводят следующие ситуации:

- потеря желудочно-кишечных жидкостей;
- длительное лечение осмотическими диуретиками или салуретиками (маннитол, мочеви́на, фуросемид), а также диабетическая глюкозурия;
- стрессовые состояния, сопровождающиеся повышенной адреналовой активностью, болезнь Иценко–Кушинга;
- уменьшение потребления калия в послеоперационном и посттравматическом периоде в сочетании с задержкой натрия в организме (ятрогенная, то есть вызванная медицинскими мероприятиями, гипокалиемия);
- продолжительный ацидоз или алкалоз, в результате которого нарушается функция почек и возникает калийурия;
- предшествующий дефицит калия, вызванный тяжелым хроническим заболеванием и усиленный послеоперационным периодом;
- длительное применение стероидных лекарственных средств;
- дилуционная гипокалиемия в фазе регидратации после острой или хронической дегидратации;
- хроническая почечная недостаточность;
- синдром Барттера;
- гиперальдостеронизм.

В основе всех приведенных причин гипокалиемии лежат четыре основных механизма:

- уменьшенное поступление калия в организм;
- усиленный переход калия из внеклеточной жидкости внутрь клетки;
- уменьшенный выход калия из клетки;
- увеличенная потеря калия.

Основной механизм гипокалиемии — повышенная потеря калия.

Существует два главных пути потери калия — желудочно-кишечный тракт и почки. Кишечные и желчные свищи, а также обширные ожоги — два второстепенных канала потерь калия. Наиболее массивные потери калия происходят при многократной рвоте (вот почему

часто у больных с почечной недостаточностью нет гиперкалиемии), кишечной непроходимости, а также при всех заболеваниях, сопровождающихся диареей.

Основными причинами усиленного перехода калия из внеклеточного пространства внутрь клетки считают лечение препаратами инсулина или наличие инсулиномы, тиреотоксикоза, алкалоза.

Гипокалиемия, связанная с алкалозом, обусловлена, во-первых, тем, что калий переходит из внеклеточной жидкости (плазмы) во внутриклеточную в обмен на ионы водорода для снижения рН крови; во-вторых, происходит усиленная экскреция калия с мочой, при этом калий теряется, а ионы водорода реабсорбируются для «борьбы» с алкалозом.

Сниженное поступление калия в организм встречается у пациентов с несбалансированным питанием (алкоголики, пациенты с анорексией нервного происхождения), а также при длительном внутривенном введении бескалиевых растворов.

Симптомы недостаточности калия у человека — тошнота, рвота, мышечная слабость (в том числе дыхательной мускулатуры — поверхностное дыхание), атония кишечника и мочевого пузыря, сердечная слабость. При концентрации калия в сыворотке крови ниже 3 ммоль/л на ЭКГ отмечают изменения, свидетельствующие об ослаблении возбудимости и нарушении проводимости в сердечной мышце. В ряде случаев зависимости между уровнем калия в крови и возникновением таких серьезных последствий, как нарушение ритма сердца, не обнаруживают.

### 12.8.8.2. ГИПЕРКАЛИЕМИЯ

К гиперкалиемии могут привести:

- почечная недостаточность вследствие понижения экскреции калия почками;
- острая дегидратация (обезвоживание);
- обширные травмы, ожоги или крупные операции на фоне предшествующих тяжелых заболеваний;
- тяжелый метаболический ацидоз и шок;
- хроническая надпочечниковая недостаточность (гипоальдостеронизм);
- быстрая инфузия концентрированного раствора калия, содержащего более 50 ммоль/л калия (приблизительно 0,4% раствор калия хлорида);
- олигурия или анурия любого происхождения;
- диабетическая кома до начала инсулинотерапии;

- прием калийсберегающих диуретиков, например триамтерена (птерофена<sup>в</sup>), спиронолактона (Верошпирона<sup>г</sup>).

В основе приведенных причин гиперкалиемии лежат три основных механизма: усиленное поступление калия в организм, переход калия из внутриклеточного пространства во внеклеточное и сниженная его потеря.

Усиленное поступление калия в организм обычно только способствует развитию гиперкалиемии. Наиболее часто это носит ятрогенный характер, встречается у пациентов с нарушениями функции почек и/или получающих внутривенные вливания растворов с высоким содержанием калия. К этой группе причин относят употребление диеты с высоким содержанием калия, бесконтрольное применение калиевой соли пенициллина в больших дозах, переливание длительно хранившейся крови.

Патогенетический механизм, связанный с усиленным переходом калия из внутри- во внеклеточное пространство, отмечают при ацидозе, синдроме длительного сдавления, тканевой гипоксии, недостатке инсулина и передозировке препаратов дигиталиса.

Потери калия уменьшаются при почечной недостаточности, гипoadостеронизме, приеме диуретиков, блокирующих секрецию калия дистальными канальцами, и первичных дефектах тубулярной секреции калия почками. Гепарин натрия, используемый даже в низких дозах для лечения и профилактики нарушений свертывания крови, частично блокирует синтез альдостерона и может вызвать гиперкалиемию (вероятно, вследствие нарушения чувствительности канальцев к альдостерону).

Особенно высокое содержание калия в сыворотке крови наблюдают при ОПН, в частности при некронефрозах, вызванных отравлениями и синдромом длительного сдавления, что обусловлено резким снижением (до практически полного прекращения) ренальной экскреции калия, ацидозом, усиленным катаболизмом белка, гемолизом, при синдроме длительного сдавления — повреждениями мышечной ткани. При этом содержание калия может достигать 7,0–9,7 ммоль/л. Большое значение в клинической практике имеет динамика повышения калия в крови у больных с ОПН. В неосложненных случаях ОПН концентрация калия в плазме крови возрастает на 0,3–0,5 ммоль/л в сутки, после травмы или сложной операции — на 1–2 ммоль/л в сутки, но возможен и очень быстрый его подъем на 1–2 ммоль/л. Именно поэтому контроль динамики калиемии у больных с ОПН имеет большое значение, его должны проводить не реже 1 раза/сут, а в осложненных случаях — чаще.



**Псевдогиперкалиемия** (ложноповышенный уровень калия в сыворотке крови) может быть обусловлена гемолизом при взятии крови на анализ (наиболее часто вследствие наложения жгута длительностью более 1 мин). Если кровь берут в стеклянную пробирку, что также способствует гемолизу, то такие изменения могут быть обнаружены в 20% взятых образцов. При лейкоцитозе ( $50,0 \times 10^9/\text{л}$ ) и тромбоцитозе ( $1000 \times 10^9/\text{л}$ ) также возможна псевдогиперкалиемия вследствие высвобождения калия во время свертывания крови в пробирке.

**Гиперкалиемия** клинически проявляется парестезиями, сердечными аритмиями. Угрожающими симптомами калиевой интоксикации служат коллапс, брадикардия, помрачение сознания. Изменения на ЭКГ определяются при концентрации калия выше 7 ммоль/л, а при повышении его до 10 ммоль/л наступает внутрижелудочковая блокада с мерцанием желудочков, при концентрации 13 ммоль/л сердце останавливается в диастоле. По мере возрастания уровня калия в сыворотке постепенно меняется характер ЭКГ. Сначала появляются высокие заостренные зубцы *T*. Затем развиваются депрессия сегмента *ST*, атриовентрикулярная блокада I степени и расширение комплекса *QRS*. Наконец, дальнейшее расширение комплекса *QRS* и слияние его с зубцом *T* образуют двухфазную кривую, указывающую на приближающуюся асистолию желудочков. Скорость таких изменений непредсказуема, и от начальных изменений ЭКГ до опасных нарушений проводимости или аритмий иногда проходят считанные минуты.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ

1. От чего зависит поддержание нормального уровня калия в плазме крови?
2. Какие значения концентрации калия в сыворотке указывают на гипокалиемию?
3. Перечислите основные причины гипокалиемии.
4. Назовите основные клинические проявления гипокалиемии.
5. Какие значения концентрации калия в сыворотке указывают на гиперкалиемию?
6. Назовите основные клинические проявления гиперкалиемии.

## 12.8.9. ГОМЕОСТАЗ КАЛЬЦИЯ

Кальций — самый распространенный элемент в теле человека. Организм взрослого человека содержит около 1 кг (25 000 ммоль) кальция. Физиологическое значение его состоит в регуляции проницаемости клеточных мембран, участии в построении скелета и системе

гемостаза, а также в функционировании нервно-мышечной деятельности. Он обладает способностью накапливаться в местах, где имеется повреждение тканей различными патологическими процессами. Примерно 99% кальция находится в костях, остальное количество главным образом — во внеклеточной жидкости. Внеклеточная жидкость содержит только 22,5 ммоль (0,9 г) кальция, из которых примерно 9 ммоль (0,36 г) находится в плазме крови.

Кальций, фиксированный в костной ткани, находится во взаимодействии с ионами плазмы крови. Действуя как буферная система, депонированный в кости кальций предотвращает колебания его содержания в плазме в больших диапазонах.

Кальций поступает в организм человека с пищей. Всасывание его происходит в тонкой кишке. Всосавшийся кальций поступает в кровоток. В плазме крови кальций представлен тремя формами:

- связанный с белками (в основном с альбумином, около 40%);
- в комплексе с фосфатом и цитратом (около 9%);
- в виде ионизированной (свободной) формы (около 50% кальция плазмы).

Баланс кальция в организме обеспечивается системой ПТГ—кальцитонин—витамин D. Основная функция всех этих гормонов — регуляция движения ионов кальция ( $\text{Ca}^{2+}$ ) в организме и поддержание постоянства концентрации его в крови (рис. 12.42).

ПТГ представляет собой полипептидный гормон, секретлируемый паращитовидными железами. Он повышает концентрацию кальция в плазме крови, усиливая его вымывание из костей, реабсорбцию в почках и стимулируя превращение в них витамина D в активный метаболит кальцитриол. Уровень кальция в крови регулирует секрецию ПТГ по механизму отрицательной обратной связи: гипокальциемия стимулирует высвобождение ПТГ, а гиперкальциемия — подавляет. Кальцитонин — физиологический антагонист ПТГ, который синтезируется в щитовидной железе. Он стимулирует выведение кальция почками.

Витамин  $\text{D}_3$  (холекальциферол) образуется в коже под влиянием солнечного света или поступает в организм с пищей. Синтезированный и поступивший витамин  $\text{D}_3$  транспортируется кровью в печень, где в митохондриях превращается в 25-гидроксивитамин  $[25(\text{OH})\text{D}_3]$ . Этот промежуточный продукт превращается или в  $25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , или в  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Кальцитриол  $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$  образуется в митохондриях клеток почек под действием 1-гидроксилазы и служит наиболее активной формой витамина  $\text{D}_3$ . По своему действию  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  является гормоном и прямым антирахитическим фактором. Метаболиты витамина D стимулируют всасывание кальция в кишечнике.

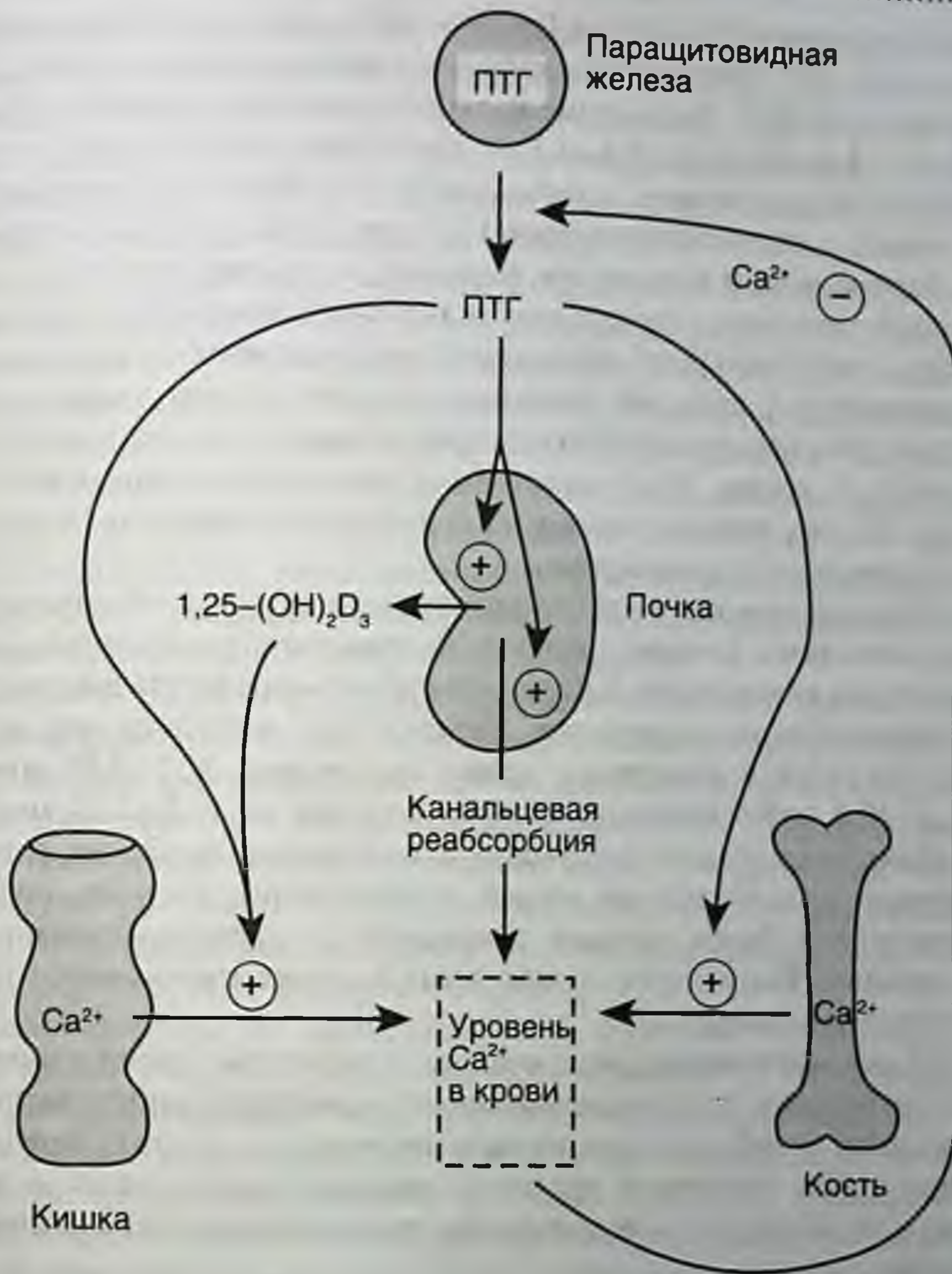


Рис. 12.42. Регуляция уровня кальция в крови

При метаболическом равновесии суточное выведение кальция с мочой соответствует количеству всосавшегося в кишечнике кальция. Выведение с мочой зависит от количества профильтрованного кальция в клубочках и канальцевой реабсорбции. В клубочках почек фильтруется кальций ионизированный и в комплексе с низкомолекулярными анионами (около 60% сывороточного). Почки реабсорбируют 87–98% профильтрованного кальция. Реабсорбция кальция происходит пассивно во всех канальцах нефрона. Проксимальные извитые каналь-

цы реабсорбируют 60%, петля Генле — 30%, дистальная часть канальцев — около 10%. Реабсорбция кальция в дистальных канальцах почек стимулируется ПТГ. Выделение кальция почками в норме колеблется от 2,5 до 7,5 ммоль/сут (0,1–0,3 г). Поскольку из организма кальций выводится также с калом, минимальные потребности в его поступлении с пищей составляют примерно 12,5 ммоль, увеличиваясь в периоды роста, беременности и лактации. Кальций, входящий в состав секретов желудочно-кишечного тракта (сок желудочный и поджелудочной железы, желчь), частично реабсорбируется вместе с пищевым кальцием.

Внеклеточный кальций, включая кальций плазмы крови, в течение суток обновляется приблизительно 33 раза, проходя через почки, кишечник и кости. Именно поэтому даже небольшое изменение в любом из этих потоков оказывает существенное влияние на концентрацию кальция в плазме крови.

В лаборатории чаще всего определяют содержание общего кальция в сыворотке крови. Однако при наличии специального прибора — ионоселективного анализатора лаборатория может определять и концентрацию ионизированного кальция. Референтные величины содержания общего кальция в сыворотке крови составляют 2,15–2,50 ммоль/л или 8,6–10,0 мг%; ионизированного кальция — 1,15–1,27 ммоль/л. Изменение содержания альбумина в сыворотке, особенно гипоальбуминемия, сказывается на общей концентрации кальция, не влияя на клинически более важный показатель — уровень ионизированного кальция. Нарушения метаболизма кальция проявляются гипер- или гипокальциемией.

Наиболее часто содержание кальция в сыворотке крови изменяется при дисфункции паращитовидных желез, новообразованиях различной локализации (особенно при метастазировании в кости), нарушении функции почек (почечной недостаточности). Нередко гипо- и гиперкальциемия могут быть первичными проявлениями патологического процесса.

### 12.8.9.1. ГИПОКАЛЬЦИЕМИЯ

Гипокальциемия развивается при недостаточном поступлении кальция с пищей, нарушении его всасывания в желудочно-кишечном тракте, повышенном выведении с мочой, а также недостаточности гормональных факторов (ПТГ, витамина D), участвующих в регуляции баланса кальция в организме.

Недостаточное поступление кальция с пищей наиболее часто встречается у пожилых людей, оно приводит к развитию остеопороза.

Остеопороз — метаболическое заболевание скелета, характеризующееся одновременной потерей органического матрикса кости и минеральных веществ. Основным дефектом при остеопорозе — уменьшение массы кости в единице объема и нарушение микроархитектоники костной ткани (истончение губчатого вещества кости и компактного вещества), в результате чего кость становится хрупкой.

У детей основная причина недостатка кальция в организме — нарушение его всасывания в желудочно-кишечном тракте вследствие недостатка витамина D. В результате у детей развивается рахит — заболевание, при котором происходит недостаточная минерализация в костях и хряще эпифизарных пластинок. Болезнь проявляется замедлением роста и целым рядом деформаций скелета. Недостаток витамина D и гипокальциемия у взрослых проявляются остеомаляцией — нарушением минерализации зрелой костной ткани. Легкая и умеренная остеомаляция часто протекает бессимптомно, при тяжелой степени нагрузки вызывает деформации и псевдопереломы костей.

Наиболее распространенная причина снижения уровня общего кальция в сыворотке крови — гипоальбуминемия. К ее развитию приводят хронические заболевания печени, острый панкреатит, онкологические процессы. Если содержание ионизированного кальция при этом находится в пределах нормы, то обмен кальция в организме не нарушен. Другие причины снижения сывороточной концентрации кальция обусловлены заболеваниями почек, в результате которых нарушается его реабсорбция, и он выводится с мочой.

Гипопаратиреоз — недостаточность функции паращитовидных желез, характеризующаяся сниженной продукцией ПТГ. Недостаток ПТГ приводит к гипокальциемии, обусловленной снижением всасывания кальция в кишечнике, уменьшением его мобилизации из костей и недостаточной реабсорбцией в почечных канальцах. Наиболее часто гипопаратиреоз обусловлен хирургическим повреждением либо непосредственно паращитовидных желез, либо их кровоснабжения при частичном или полном удалении щитовидной железы.

Псевдогипопаратиреоз — термин, объединяющий группу редких наследственных синдромов, характеризующихся резистентностью кости к действию ПТГ. При всех этих синдромах на фоне повышенного уровня ПТГ в крови наблюдаются гипокальциемия, так как кальций плохо высвобождается из костной ткани.

Клинические проявления гипокальциемии варьируют в зависимости от степени и темпа снижения уровня кальция. Наблюдаемая при гипопаратиреозе повышенная возбудимость нервов и мышц приводит к парестезиям и тетании, включая тонические судороги мышц кистей

и стоп. Положительные симптомы Труссо и Хвостека указывают на латентную тетанию. Тяжелая гипокальциемия вызывает сонливость, спутанность сознания, редко — спазм гортани, судороги и обратимую сердечную недостаточность. На ЭКГ бывает удлинена интервала Q-T. Хроническая гипокальциемия может стать причиной катаракты и кальцификации базальных ганглиев.

### 12.8.9.2. ГИПЕРКАЛЬЦИЕМИЯ

Гиперкальциемия — почти всегда результат повышенного поступления кальция в кровь из резорбируемой костной ткани или пищи в условиях снижения его выведения почками с мочой. Более 90% случаев гиперкальциемии обусловлено первичным гиперпаратиреозом и злокачественными новообразованиями.

Первичный гиперпаратиреоз — заболевание, которое проявляется повышенной функцией паращитовидных желез. Это основная причина гиперкальциемии у амбулаторных больных. Первичный гиперпаратиреоз характеризуется повышением секреции ПТГ (в 2–20 раз) и, как следствие, гиперкальциемией. Это нередкая патология, особенно у пожилых женщин. Около 85% случаев гиперкальциемии обусловлены аденомой одной из паращитовидных желез, 15% — гиперплазией всех четырех желез и 1% — карциномой паращитовидной железы. Обычно гиперкальциемия протекает бессимптомно, ее обнаруживают случайно при диспансерных обследованиях.

Злокачественные новообразования — причина большинства случаев гиперкальциемии у госпитализированных больных и лиц пожилого возраста. При этом действуют два главных механизма ее возникновения.

- Если первичная опухоль или ее метастазы находятся в кости, то продукты жизнедеятельности опухолевых клеток стимулируют локальную резорбцию (рассасывание) кости, что способствует усиленному поступлению кальция в кровоток. Данный механизм гиперкальциемии отмечают только при обширном поражении костей опухолью, чаще всего — при метастазах рака молочной железы, миеломной болезни и лимфоме.
- Если опухоль или метастазы локализованы вне костной ткани, то опухолевые метаболиты могут оказывать общее гуморальное действие, стимулируя резорбцию кости и снижая обычно экскрецию кальция. Наиболее часто этот механизм гиперкальциемии наблюдают при плоскоклеточном раке легких, опухолях головы и шеи, пищевода, карциноме почек, мочевого пузыря и яичников.

Другие причины гиперкальциемии встречаются редко. Гиперкальциемия может сопровождать саркоидоз, туберкулез, гистоплазмоз и быть следствием неадекватного лечения рахита препаратами витамина D (интоксикация витамином D) у детей.

Длительная иммобилизация при болезни Педжета или сложных переломах сопровождается умеренными признаками остеопороза и увеличением содержания кальция в крови. Стероид-индуцированную гиперкальциемию можно наблюдать при приеме андрогенов, эстрогенов и глюкокортикоидов. Длительное пребывание пациента в постели само по себе сопровождается гиперкальциемией.

Клинические проявления наблюдают при уровне кальция в крови выше 3 ммоль/л, причем они более выражены при быстром развитии гиперкальциемии. К почечным проявлениям относят полиурию и мочекаменную болезнь. Желудочно-кишечные нарушения включают анорексию, тошноту, рвоту и запор. Среди неврологических симптомов характерны слабость, утомляемость, спутанность сознания, ступор и кома. На ЭКГ — укорочение интервала Q—T. Если уровень кальция в сыворотке превышает 3,75 ммоль/л, возможны почечная недостаточность и отложения кальция в мягких тканях. Содержание сывороточного кальция до 3 ммоль/л соответствует легкой гиперкальциемии, а выше 3,38 ммоль/л — тяжелой.

### 12.8.10. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭЛЕКТРОЛИТОВ

Существует целый спектр методов определения концентрации электролитов в биологических жидкостях.

Пламенная фотометрия или атомно-эмиссионная спектроскопия пламени. Метод основан на измерении интенсивности излучения, испускаемого атомами, возбужденными в пламени, после их возвращения в основное невозбужденное состояние. Длина волны испускаемого света отражает химическую природу электролита. Принцип в том, что растворенный в воде образец вводят в пламя с помощью распылителя и эмиссионное излучение исследуемого электролита в биологической жидкости определяют путем сравнения интенсивности эмиссионного потока стандартных растворов с интенсивностью эмиссии исследуемых растворов. Прибор, на котором определяют уровни электролитов по принципу пламенной фотометрии, называют пламенным фотометром. Для калибровки пламенных фотометров используют специально приготовленные для этой цели калибраторы или водные растворы с высоким и низким содержанием электролитов. Пламенную фотометрию до внедрения ионоселективных

анализаторов широко использовали в практике лабораторий для определения концентрации натрия, калия и кальция. В связи с тем что для получения пламени нужной температуры в пламенных фотометрах использовали взрывоопасные смеси различных горючих газов (бутан–пропан или ацетилен–водород), в настоящее время метод практически не применяют.

**Потенциометрический (ионометрический) метод.** В настоящее время это самый распространенный метод определения концентрации электролитов в биологических жидкостях, который представляет собой измерение электрохимического потенциала ионоселективного электрода, погруженного в раствор. Именно поэтому в практике лабораторий его называют ионоселективным методом. Электрическая схема ионоселективного анализатора состоит из электрода сравнения, потенциал которого известен, и индикаторного (ионоселективный) электрода, потенциал которого измеряют. Значение потенциала индикаторного электрода позволяет судить об активности присутствующих в растворе ионов: калия, натрия, кальция, лития, магния и др.

Ионоселективные электроды — электрохимические преобразователи, в которых возникает потенциал, зависящий от концентрации (точнее, активности) ионов в исследуемой среде, по отношению к которым селективен (избирателен) данный электрод. Разница потенциалов в ионоселективных электродах возникает на границе раздела фаз «электропроводный материал–электролит». Эта граница раздела фаз служит мембраной; в зависимости от природы материала, из которого она состоит, проводят классификацию ионоселективных электродов. Различают твердые, жидкостные и пластифицированные (пленчатые) электроды.

К электродам с твердой мембраной относят прежде всего классический — стеклянный рН-электрод. В рН-электроде шарик заполняют 0,1 М раствором HCl. В жидкостных электродах в качестве ионочувствительной мембраны используют раствор электродноактивного соединения (комплексы катионов и анионов) в органическом растворителе (октиловый и дециловый эфиры фосфорной кислоты и др.). Пластифицированные электроды подобны жидкостным, но активную фазу закрепляют в поливинилхлоридной матрице. Электродные потенциалы на ионоселективных электродах возникают за счет ионного обмена между поверхностным слоем мембраны и исследуемым раствором. Потенциал, возникающий в ионоселективном электроде, пропорционален логарифму активности определяемого иона.

Приборы, которые определяют концентрацию электролитов с использованием ионоселективных электродов, называют ионоселек-



тивными анализаторами. Вид одного из таких анализаторов приведен на рис. 12.43, а на рис. 12.44 представлена конструктивная схема его устройства.



Рис. 12.43. Ионоселективный анализатор с устройством для автоматической подачи проб

Ионоселективные электроды для определения  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $Ca^{2+}$ , рН в анализаторах предварительно калибруют по двум точкам. Для этого на борту анализатора установлены бутылки с двумя растворами с известной концентрацией: А — стандартный калибровочный раствор и В — стандартный калибровочный реагент (А- и В-калибраторы). Потенциал обоих растворов измеряется электродами. Калибровочная кривая строится на основании измерения двух потенциалов (для каждого калибратора) и известной концентрации конкретного электролита в них. В дальнейшем измеренный потенциал образца переводят в концентрацию с помощью полученной кривой линии при калибровке.

В исследуемой пробе биологического материала (сыворотка, моча и др.) почти все солевые компоненты содержатся в качестве ионов. Электрохимическая реакция происходит между селективным электродом и своим внутренним раствором. Потенциал ионоселективного электрода изменяется, как только изменяется концентрация ионов в образце пробы. Потенциал референтного электрода всегда постоянен. Таким образом формируется разница между потенциалом ионоселективного электрода и референтным электродом. Разница потенциалов изменяется в зависимости от изменения концентрации определенного иона в пробе.

## Блок ионоселективных электродов

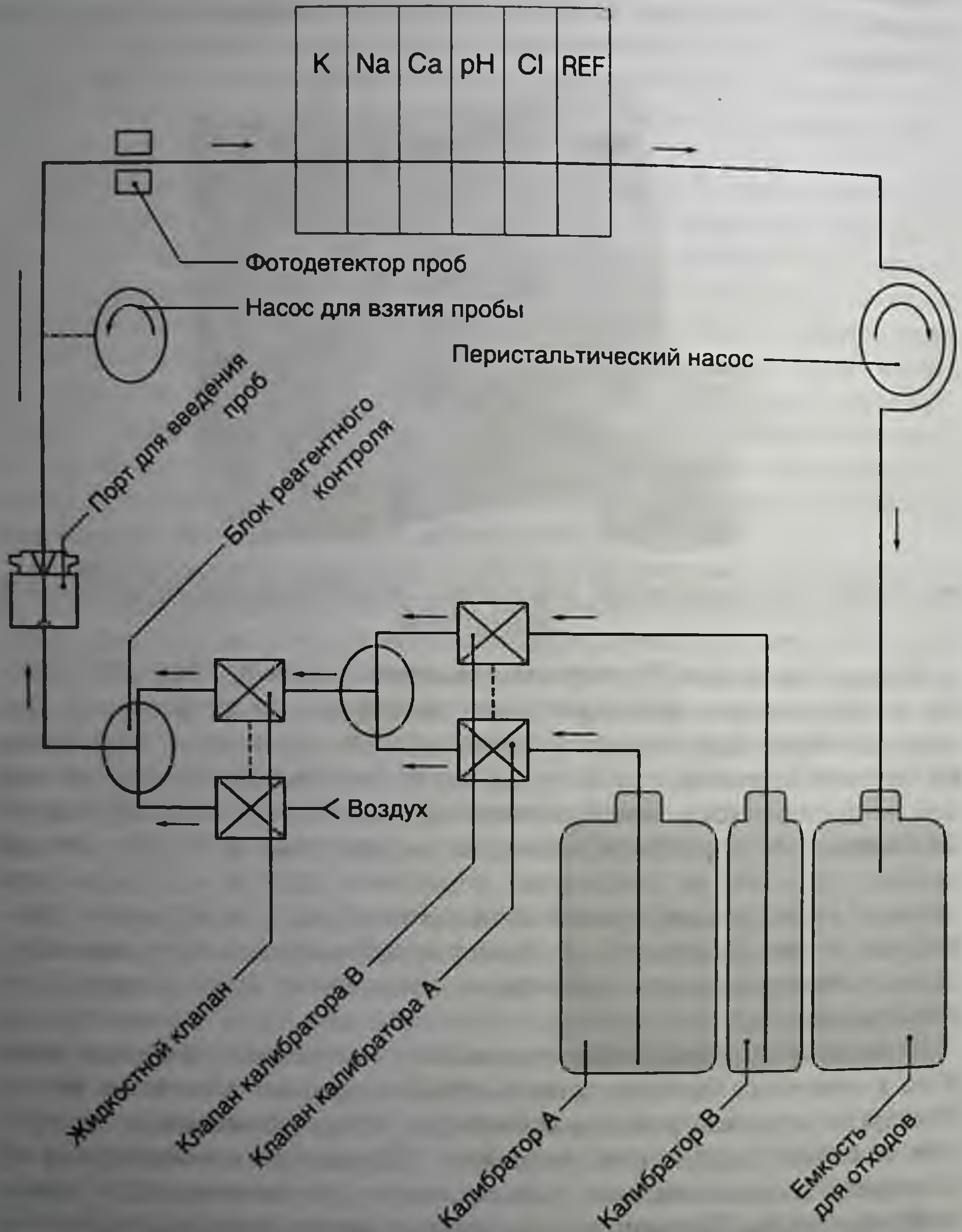


Рис. 12.44. Устройство ионоселективного анализатора (конструктивная схема)

Как видно из рис. 12.44, при калибровке ионоселективного анализатора калибратор А или В проходит через клапан из соответствующего

флакона. Затем в блок реагентного контроля по трубкам проходит калибратор А/В или воздух в зависимости от положения клапана. Далее калибратор или воздух через порт для введения проб и реагентов поступает к фотодетектору проб, а из него — в блок электродов. Все движения потоков осуществляют за счет перистальтического насоса. После насоса калибратор или исследуемая проба попадает в емкость для отходов.

Аналогичным образом движется образец исследуемой пробы или реагент для контроля качества, который вводится через иглу порта пробозаборника. Контрольную функцию определения жидкости и воздуха, а также места их расположения относительно блока электродов выполняет фотодетектор в паре с откалиброванным перистальтическим насосом.

**Атомно-абсорбционная спектрофотометрия.** В основе метода лежит измерение поглощения монохроматического пучка света атомами в пламени. Величина поглощенного светового потока пропорциональна числу атомов на пути луча. Данный метод более чувствителен по сравнению с пламенной фотометрией и позволяет определять весь спектр электролитов. Как правило, его используют для исследования элементов, содержание которых в пробах биологического материала составляет менее  $10^{-6}$  моль/л. Они получили название «микроэлементы». К ним относят медь, цинк, кобальт, марганец, селен, йод, алюминий, молибден, ванадий и др.

**Фотометрическое (колориметрическое) определение концентрации электролитов** также достаточно широко используют в практике лабораторий, так как не требуется дорогостоящего специального оборудования и реактивов. Данные методы основаны на образовании окрашенных соединений при взаимодействии электролитов с определенными органическими веществами. Плотность окраски пропорциональна количеству электролита, что позволяет рассчитать его концентрацию.

Для определения концентрации натрия в сыворотке или плазме крови применяют реакции образования окрашенных комплексов при взаимодействии этих ионов с соответствующими реактивами. Например, содержащийся в пробе натрий осаждается уранилацетатом магния. Уранил-ионы, оставшиеся в растворе, образуют окрашенный комплекс с тиогликолятом аммония. Концентрация натрия пропорциональна разности между контрольной (без преципитации) и опытной пробой.

Для определения концентрации калия используют реакцию между ионами калия и тетрафенилбората, в результате которой возникает стабильная суспензия. Образующаяся в результате реакции мутность суспензии пропорциональна концентрации ионов калия.

Наиболее широко фотометрические методы используют в лаборатории для определения концентрации кальция и магния.

Для определения концентрации кальция применяют метод по цветной реакции с о-крезолфталеином. Кальций в щелочной среде образует окрашенный комплекс красно-фиолетового цвета с о-крезолфталеином. Интенсивность образующейся окраски прямо пропорциональна концентрации кальция в пробе.

Колориметрический метод применяют и для определения концентрации магния и хлора. Магний образует окрашенный комплекс с ксилдиловым синим, который измеряют фотометрически. Ионы хлора в кислой среде в присутствии тиоцианат-ионов формируют окрашенный комплекс с железом. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации хлорид-ионов в пробе.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ

1. Какие гормоны участвуют в регуляции баланса кальция в организме человека?
2. Какую роль играет витамин D в регуляции баланса кальция в организме человека?
3. К каким последствиям приводит недостаток кальция в организме человека?
4. Какие значения концентрации кальция в сыворотке указывают на гипокальциемию?
5. Перечислите основные причины гипокальциемии.
6. Какие значения концентрации кальция в сыворотке указывают на гиперкальциемию?
7. Назовите основные клинические проявления гиперкальциемии.
8. Перечислите основные методы определения концентрации электролитов, которые используют в лабораториях.

### 12.8.11. КИСЛОТНО-ОСНОВНОЕ СОСТОЯНИЕ

Исследование КОС широко применяют для мониторинга состояния больных в критическом состоянии. Если подходить строго к определению понятия КОС, то под ним следует понимать соотношение концентрации водородных и гидроксильных ионов в биологических средах, то есть рН крови. В действительности исследование КОС включает, наряду с измерением рН, определение и физиологически важных газов, присутствующих в крови (кислорода —  $O_2$  и углекислого газа —  $CO_2$ ), и еще несколько других параметров. Это обусловлено

тем, что все эти показатели и их значения тесно взаимосвязаны друг с другом.

У тяжелых больных могут наблюдаться существенные изменения этих показателей в течение коротких промежутков времени, поэтому сроки выполнения исследования КОС лабораторией в условиях неотложной диагностики не должны превышать 5–10 мин. Исследование КОС, в отличие от всех других видов лабораторных анализов, выполняют на пробах артериальной крови.

### 12.8.11.1. ГАЗЫ КРОВИ

Метаболические процессы, происходящие в клетке, связаны с постоянной продукцией углекислого газа ( $\text{CO}_2$ ) и ионов водорода (pH) и потреблением кислорода ( $\text{O}_2$ ). Скорости их продукции и потребления во многом зависят от уровня метаболической активности. Однако для сохранения постоянства внутренней среды организма человека необходимо, чтобы, несмотря на вариации скорости продукции и потребления, уровни всех трех компонентов (pH,  $\text{CO}_2$  и  $\text{O}_2$ ) в крови поддерживались в строгих границах. Достижение этого обеспечивается согласованным функционированием легких, почек и буферных систем крови и тканей. Исследуя содержание газов в крови, врач может мониторировать состояние данных регуляторных систем. Оценка результатов исследования газов крови во многом зависит от понимания основ физиологии дыхания.

Дыхание есть функция доставки из внешней среды к клетке, ее митохондриальным и соматическим мембранам (генераторам энергии) кислорода и удаления из клеток во внешнюю среду избытка углекислого газа с целью обеспечения процесса образования энергии, адекватного потребностям организма при данном его функциональном состоянии. Практически данная функция реализуется следующим образом. Венозная кровь, которая возвращается от тканей в правые отделы сердца, содержит низкое количество кислорода и высокое — углекислого газа. Из правого желудочка сердца через легочную артерию она поступает в легкие. В легких углекислый газ крови обменивается на кислород, и оксигенированная кровь (с низким содержанием углекислого газа) возвращается в левое предсердие через легочную вену. В дальнейшем кровь поступает в левый желудочек, а из него через аорту разносится по артериальной системе к тканям, доставляя им кислород.

Количество газа, содержащегося в крови, определяется атмосферным давлением, которое этот газ оказывает. Его традиционно измеряют в миллиметрах ртутного столба (мм рт.ст.). Давление атмосферного воздуха на уровне моря равно 760 мм рт.ст. Для организма человека это

означает, что на уровне моря газы, содержащиеся в воздухе, которым дышит человек, оказывают суммарное давление, поддерживающее столбик ртути высотой 760 мм. Общее давление смеси газов атмосферного воздуха — сумма парциальных давлений (обозначают символом  $p$ ) каждого из компонентов. Хорошо известно, что атмосферный воздух состоит из 21% кислорода, 0,03% углекислого газа и 78% азота. Именно поэтому парциальное давление кислорода ( $pO_2$ ) во вдыхаемом воздухе равно 21% общего атмосферного давления, то есть 150 мм рт.ст., а парциальное давление углекислого газа ( $pCO_2$ ) — 0,03% или 0,2 мм рт.ст. В системе СИ парциальное давление газов измеряют в килопаскалях (кПа). Для перевода парциального давления, выраженного в миллиметрах ртутного столба, в килопаскалях, необходимо умножить имеющуюся величину на 0,133. На рис. 12.45 представлены значения парциальных давлений кислорода и углекислого газа во вдыхаемом и альвеолярном воздухе, венозной и артериальной крови, тканях.

Газы из атмосферного воздуха поступают в кровь, диффундируя через биологические мембраны. Скорость диффузии газов через биологические мембраны зависит от парциального давления газов по обе стороны мембраны и диффундирует из области высокого парциального давления в область низкого. Чем выше разность в парциальном давлении по обе стороны мембраны, тем быстрее протекает диффузия.

Обмен газов между кровью и атмосферным воздухом происходит в легких, а в качестве биологических мембран выступают альвеолярные мембраны, представляющие собой тонкие оболочки структурных единиц легких — альвеол. Легкие состоят из миллионов альвеол, которые вместе обеспечивают огромную поверхность мембран для газообмена. У взрослого человека эта площадь составляет в среднем 80 м<sup>2</sup>. С одной стороны мембраны находится альвеолярный воздух, а с другой — мелкие капилляры, диаметр которых позволяет пропускать только один эритроцит. Именно поэтому все эритроциты проходят по капиллярам как бы «по очереди» — один за другим. Газы диффундируют через альвеолярные мембраны, пытаясь восстановить количественное равновесие для каждого из них по обе стороны мембраны. Так, если парциальное давление кислорода в альвеолярном воздухе составляет 150 мм рт.ст., а в венозной крови — 40 мм рт.ст., то он диффундирует в кровь. Парциальное давление углекислого газа в альвеолярном воздухе равно 0,03 мм рт.ст., а в венозной крови — 46 мм рт.ст., поэтому углекислый газ диффундирует из крови в альвеолы.

Кислород, диффундировавший через альвеолярную мембрану, попадает в кровь, которая протекает по легочным капиллярам, где частично растворяется в плазме, но в основном связывается с гемоглобином

эритроцитов. Одна молекула гемоглобина способна связать 4 молекулы кислорода, образуя оксигемоглобин. Количество кислорода, связывающего гемоглобин, в первую очередь зависит от парциального давления кислорода ( $pO_2$ ). При высоких значениях  $pO_2$ , что наблюдают у здоровых людей, гемоглобин артериальной крови практически на 100% насыщен кислородом. При низких значениях  $pO_2$  (в венозной крови и тканях) гемоглобин связывает кислород в гораздо меньшей степени. Это позволяет гемоглобину максимально насыщаться кислородом в артериальной крови, покидающей легкие, и легко освободиться от кислорода в тканях. Кроме того, в тканях кислород активно поглощается, что ускоряет его высвобождение из оксигемоглобина. Этот процесс дополнительно активируют высокое  $pCO_2$  (основной продукт окисления) и низкое  $pH$  в большинстве тканей.

Таким образом, адекватная оксигенация тканей зависит от:

- парциального давления кислорода в атмосферном воздухе;
- нормальной проходимости дыхательных путей;
- нормально функционирующей центральной регуляции дыхания;
- адекватной альвеолярной вентиляции (этот механический процесс осуществляется благодаря эластической тяге легких, обеспечивающей движение воздуха к альвеолам и от них, и зависит от состояния костно-мышечного аппарата грудной клетки, наличия отрицательного давления внутри плевральной полости, состояния диафрагмы);
- достаточного количества функционирующих альвеол;
- состояния и проходимости альвеолярно-капиллярной мембраны и альвеолярных капилляров;
- достаточного кровотока через легочные капилляры;
- количества гемоглобина, его структуры и типа;
- состояния кровообращения.

### 12.8.11.2. РЕГУЛЯЦИЯ КИСЛОТНО-ОСНОВНОГО СОСТОЯНИЯ

Поддержание нормального КОС и  $pH$  имеет главнейшее значение для функции ферментов и стабильности мембран клеток. Любой значительный сдвиг  $pH$  может привести к тяжелой патологии, включая дыхательную недостаточность, кому и смерть. Именно поэтому в организме человека сформировались сложные механизмы защиты против нарушений КОС.

Регуляторными механизмами, которые непосредственно обеспечивают постоянство  $pH$  крови, являются буферные системы крови и тканей, а также физиологические системы организма (легкие, почки,

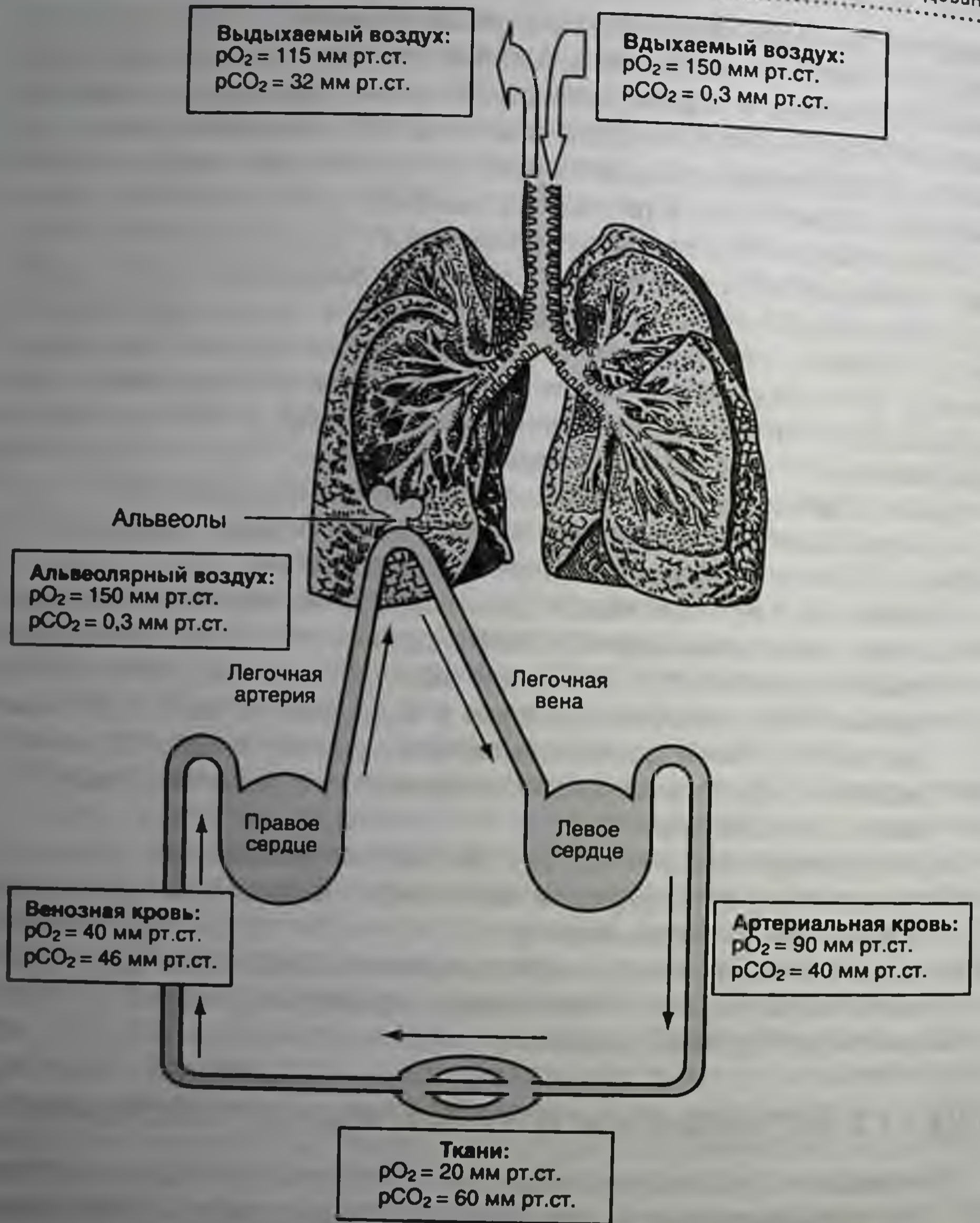


Рис. 12.45. Значения парциальных давлений кислорода и углекислого газа во вдыхаемом и альвеолярном воздухе, венозной и артериальной крови, тканях

печень и желудочно-кишечный тракт). Для успешной диагностики и коррекции различных расстройств КОС необходимо четко понимать его физиологические механизмы.



Кислота — любое вещество, которое может отдавать протон ( $\text{H}^+$ ) во внеклеточную жидкость, а основание — любое вещество, которое может связываться с протоном. Весь метаболизм белков, жиров и углеводов в организме человека — наработка протонов водорода (рис. 12.46). Все кислоты, образующиеся в процессе метаболизма, могут быть подразделены на летучие и нелетучие. Главная летучая кислота — угольная кислота внеклеточной жидкости, которая выделяется легкими в виде углекислого газа.

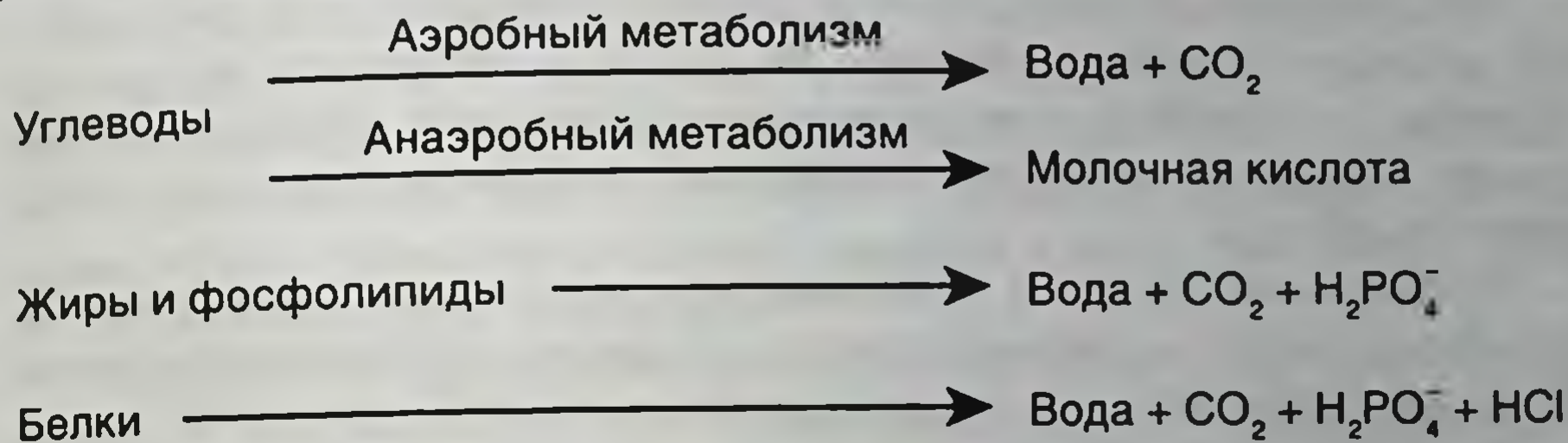
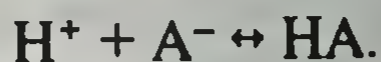


Рис. 12.46. Кислоты, образующиеся в процессе метаболизма органических веществ

Любую кислоту ( $\text{HA}$ ) можно рассматривать как находящуюся в равновесии между ее диссоциированной ( $\text{A}^-$ ) и недиссоциированной формой ( $\text{HA}$ ):



Отношение концентрации свободного протона, свободного аниона и связанной пары протон–анион можно выразить как константу диссоциации ( $K$ ):

$$K = \frac{[\text{H}^+] \times [\text{A}^-]}{[\text{HA}]}.$$

Используя данное уравнение для  $\text{H}^+$ , получают:

$$[\text{H}^+] = \frac{K \times [\text{HA}]}{[\text{A}^-]}.$$

При использовании отрицательного логарифма для каждой стороны уравнения получаем:

$$-\log[\text{H}^+] = -\log K - \log \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]}.$$

Отрицательный логарифм концентрации протонов ( $-\log [H^+]$ ) и есть рН, а  $-\log K$  можно обозначить как рК. Изменив знаки, получаем следующее уравнение:

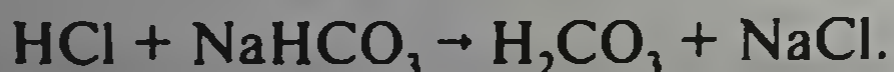
$$-\log [H^+] = -\log K + \log \frac{[A^-]}{[HA]}.$$

Это уравнение Гендерсона–Гассельбаха. Оно позволяет рассчитать рН кислотно-основной системы по данным молярного отношения кислоты и основания, а также величины константы диссоциации (K) или же определить молярное отношение кислоты и основания, когда известны рН и K.

Несмотря на то что в организме человека постоянно образуется большое количество летучих и нелетучих кислот, концентрация ионов  $H^+$  поддерживается в очень узком диапазоне ( $40 \pm 5$  нмоль). Величина этого диапазона имеет очень принципиальное значение, так как существует множество процессов, чувствительных к рН и жизненно важных для нормальной функции клеток. Основная роль в поддержании нормального рН принадлежит буферным системам. Буферной называют систему, которая стремится противостоять изменению рН после добавления либо кислоты, либо основания. В организме человека присутствует несколько буферных систем как внутри клетки, так и вне ее:

- бикарбонатная ( $[CO_2]/[HCO_3^-]$ );
- белковая ( $[H^+][\text{белок}]/[\text{белок}]$ );
- фосфатная ( $[H_2PO_4^-]/[HPO_4^{2-}]$ );
- гемоглобина ( $[H^+][\text{гемоглобин}]/[\text{гемоглобин}]$ ).

Каждая буферная система состоит из основания и слабой кислоты. Так, бикарбонатная буферная система, которая служит основной буферной системой крови, состоит из бикарбоната и угольной кислоты. Если к раствору натрия бикарбоната ( $NaHCO_3$ ) добавить сильную кислоту (HCl), то ионы водорода, образующиеся при ее диссоциации, будут включаться в угольную кислоту ( $H_2CO_3$ ), которая диссоциирует слабо:



В этом и состоит феномен буферных систем. Ионы водорода из соляной кислоты включаются в слабую угольную, которая плохо диссоциирует, поэтому общее количество ионов водорода в крови и, следовательно, рН не меняются так существенно, как это произошло бы при отсутствии буферной системы. Несмотря на то что буфер-

ная система минимизирует изменения рН при добавлении к ней ионов водорода, она не может в полной мере устранить их из крови, так как слабая кислота в какой-то степени диссоциирует.

Необходимо понимать, что рН крови поддерживается при участии обоих компонентов буферной системы. Например, когда к бикарбонатному буферу добавляют ионы водорода (соляную кислоту), концентрация бикарбоната снижается, так как он частично преобразуется в угольную кислоту ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ), а концентрация угольной кислоты растет, вызывая снижение рН. Однако если  $\text{H}_2\text{CO}_3$  постоянно удалять из системы, а бикарбонат регенерировать, то соотношение ионов и, значит, рН будет оставаться на прежнем уровне, несмотря на постоянное добавление ионов водорода. Так и происходит в организме человека — легкие обеспечивают удаление угольной кислоты в виде углекислого газа, а почки регенерируют бикарбонат.

Наибольшей эффективностью из внеклеточных буферных систем обладает бикарбонатная (на ее долю приходится 65% буферной емкости крови, на буферную систему гемоглобина — 29%, белковую — 5% и фосфатную — 1%). Это происходит по двум причинам: концентрация бикарбоната  $[\text{HCO}_3^-]$  в плазме очень высока (24 ммоль), и бикарбонатная система не закрытая, так как  $\text{CO}_2$ , образующийся в результате диссоциации угольной кислоты, постоянно и быстро удаляется при дыхании.

Поскольку бикарбонатная буферная система служит главной в плазме крови, то уравнение Гендерсона—Гассельбаха может описать ее следующим образом:

$$\text{pH} = \text{pK} + \log \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]}.$$

Концентрация  $\text{CO}_2$ , растворенного в крови, более чем в 800 раз выше, чем концентрация угольной кислоты  $[\text{H}_2\text{CO}_3]$ , поэтому  $\text{H}^+$  в норме непосредственно связан с парциальным давлением  $\text{CO}_2$  ( $\text{pCO}_2$ ) при следующей форме уравнения:

$$\text{pH} = 6,1 + \log \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[0,03 \times \text{pCO}_2]},$$

где 0,03 — константа растворимости  $\text{CO}_2$  в воде, а 6,1 — pK.

Нормальная концентрация бикарбоната ( $\text{HCO}_3^-$ ) в плазме крови составляет 27 ммоль/л, а нормальное значение  $\text{pCO}_2$  равно 40 мм рт.ст.

Если внести эти значения в уравнение, то  $0,03 \times 40$  мм рт.ст. = 1,35, тогда далее:

$$pH = 6,1 + \log \frac{27}{1,35} = 6,1 + \log 20.$$

В уравнении  $\log 20 = 1,3$ , тогда:

$$pH = 6,1 + 1,3 = 7,40.$$

Именно поэтому в норме pH крови составляет 7,40.

Легкие — первая линия защиты в поддержании КОС, так как они обеспечивают механизм почти немедленной регуляции выделения кислоты. Парциальное давление  $CO_2$  в плазме крови в норме составляет около 40 мм рт.ст. Поддержание постоянства этого уровня зависит от равновесия между образованием  $CO_2$  в процессе метаболизма и его выведением из организма через альвеолы легких. Последовательность этих процессов можно представить в виде этапов, представленных на рис. 12.47 и 12.48.

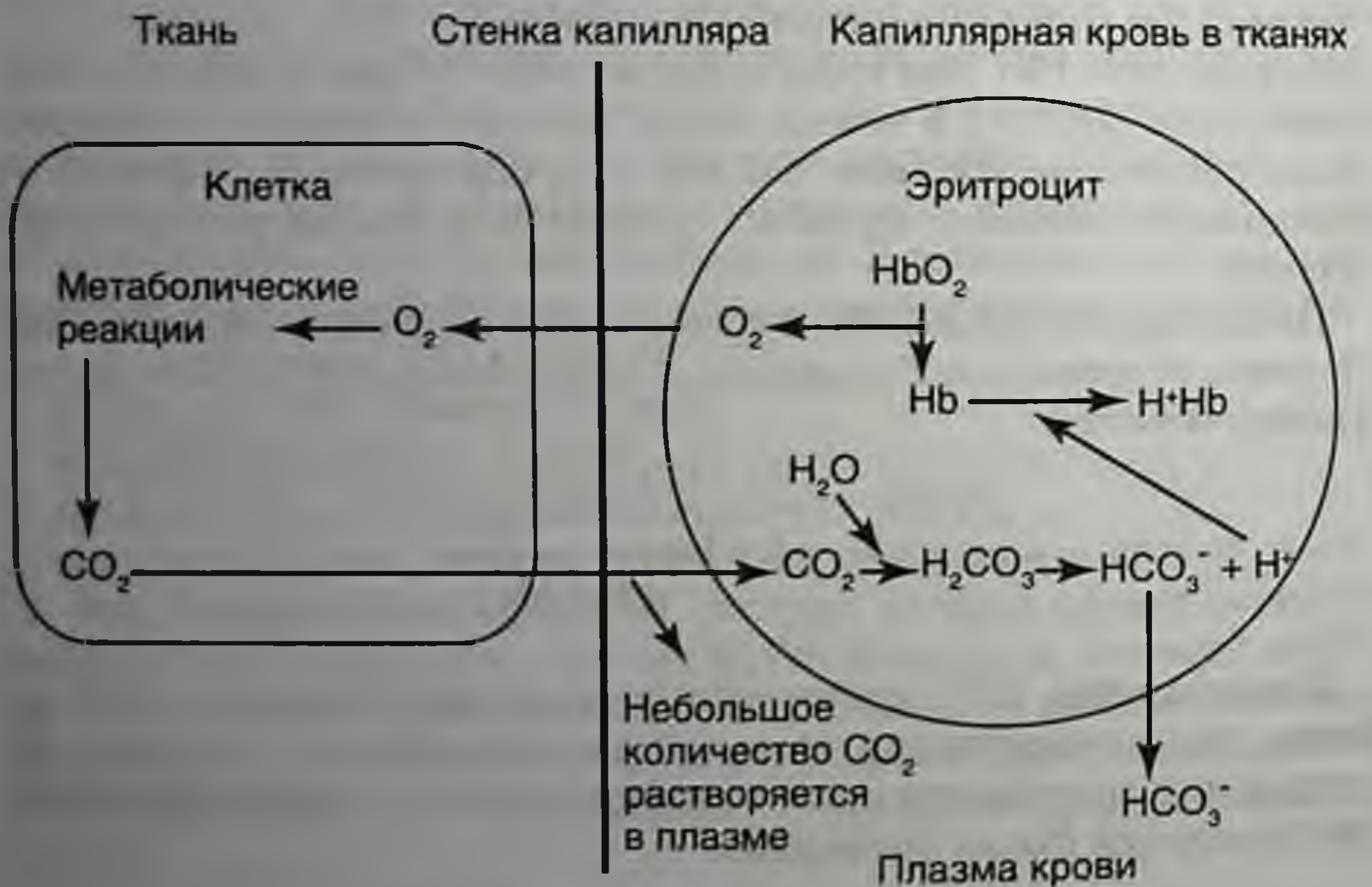


Рис. 12.47. Начальная стадия удаления углекислого газа

- Вдыхаемый кислород переносится гемоглобином от легких к тканям.
- Клетки тканей используют кислород для реакций аэробного метаболизма, в ходе которых углерод органических соединений окисляется до  $CO_2$ .

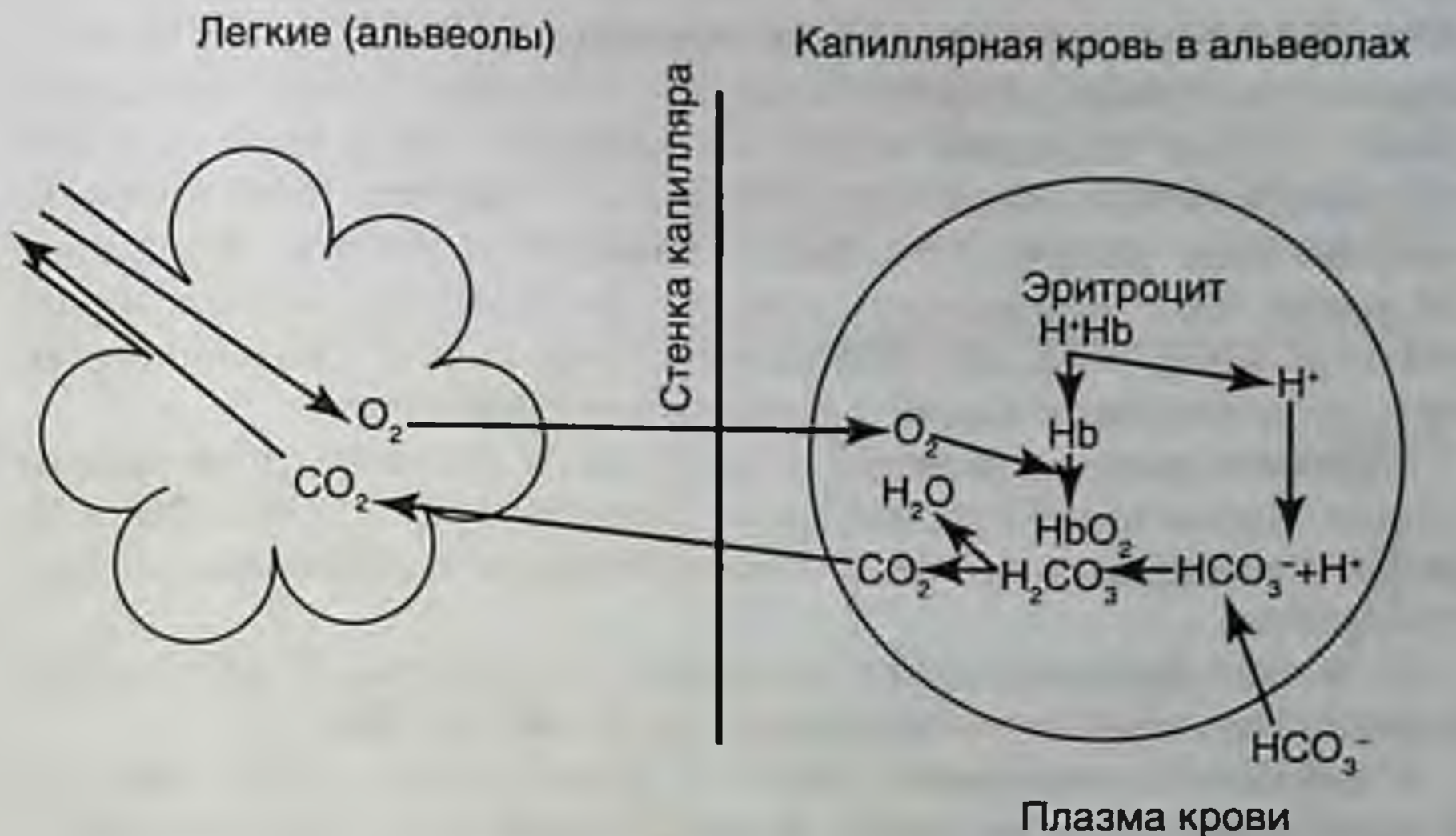


Рис. 12.48. Конечная стадия удаления углекислого газа

- $CO_2$  диффундирует в соответствии с концентрационным градиентом из клеток во внеклеточную жидкость и возвращается с кровью в легкие, откуда поступает в выдыхаемый воздух.
- Частота дыхания и, следовательно, скорость выделения  $CO_2$  из организма регулируется двумя типами хеморецепторов:
  - ▶ рецепторами, чувствительными к  $CO_2$ , находящимися в продолговатом мозге, аортальном и каротидных тельцах;
  - ▶ рецепторами pH, локализованными в каротидных тельцах (если  $pCO_2$  увеличивается или pH понижается, частота дыхания возрастает).

Высокая растворимость и способность  $CO_2$  к диффузии в воде делают его особенно удобным средством удаления кислоты из тканей в кровь. К способности эритроцитов переносить  $CO_2$  добавляются два феномена:

- карбоангидраза в эритроцитах превращает значительную часть  $CO_2$  в  $HCO_3^-$ , который быстро переносится из эритроцитов в плазму крови;
- $CO_2$  образует карбаминное соединение с гемоглобином, причем в большей степени с восстановленным гемоглобином, чем с оксигемоглобином, что облегчает связывание  $CO_2$  в периферических тканях, где уровень  $O_2$  низкий (в легких эти оба процесса текут в противоположных направлениях, что способствует быстрому выведению  $CO_2$  из организма).

В результате нормального метаболизма происходит постоянное образование ионов водорода, которые связывают буферные системы крови. Однако последние имеют ограниченные способности, и при отсутствии возможности удаления ионов водорода быстро исчерпали бы свои резервы, что могло привести к опасному снижению рН крови. Сами буферные системы не могут удалять ионы водорода из крови. Кроме того, для организма важно восполнять ионы бикарбоната, используемые в бикарбонатной буферной системе.

Основная роль в удалении избытка ионов водорода принадлежит почкам. Кроме того, буферные емкости систем и гемоглобина были бы быстро исчерпаны, если почки не обеспечивали непрерывное их восстановление.

В почках функционирует механизм регенерации бикарбонатной буферной системы за счет постоянной реабсорбции  $\text{HCO}_3^-$ .

Способность канальцев почек к реабсорбции  $\text{HCO}_3^-$  высока. В норме моча почти не содержит бикарбонатов (за сутки выделяется менее 5 ммоль  $\text{HCO}_3^-$ ). Самым важным местом реабсорбции  $\text{HCO}_3^-$  является проксимальный каналец, где происходит всасывание 90% бикарбоната. Однако это осуществляется не за счет прямого транспорта  $\text{HCO}_3^-$  через люминальную мембрану, так как мембраны клеток почечных канальцев непроницаемы для бикарбоната, а посредством специального механизма. В просвете канальцев из бикарбонатов сначала образуется  $\text{CO}_2$ , а в клетках канальцев эквивалентное количество его превращается в бикарбонаты. Функционирование этого механизма зависит от действия карбоангидразы на люминальной стороне щеточной каемки клеток проксимального канальца и секреции  $\text{H}^+$  из клеток в просвет канальцев в обмен на натрий, попадающий в фильтрат вместе с бикарбонатами. Последовательность типов этого процесса представлена на рис. 12.49.

- Бикарбонаты проникают через мембрану клубочков в ультрафильтрат, где их концентрация, как и в плазме крови, примерно 25 ммоль/л.
- Бикарбонат ультрафильтрата взаимодействует с ионами водорода, секретруемыми клетками канальцев, с образованием  $\text{H}_2\text{CO}_3$ .
- Угольная кислота превращается в воду и углекислый газ с помощью карбоангидразы.
- При повышении  $p\text{CO}_2$  в просвете канальцев  $\text{CO}_2$  диффундирует обратно в клетку проксимального канальца в соответствии с концентрационным градиентом.
- В условиях повышения концентрации внутриклеточного  $\text{CO}_2$  карбоангидраза катализирует ее взаимодействие с водой, приво-

дующее вновь к образованию угольной кислоты, которая диссоциирует на  $\text{H}^+$  и  $\text{HCO}_3^-$ , тем самым завершая этот цикл.

- По мере секреции  $\text{H}^+$  внутриклеточная концентрация  $\text{HCO}_3^-$  нарастает, и бикарбонат диффундирует во внеклеточную жидкость, что сопровождается реабсорбцией натрия в обмен на  $\text{H}^+$ .

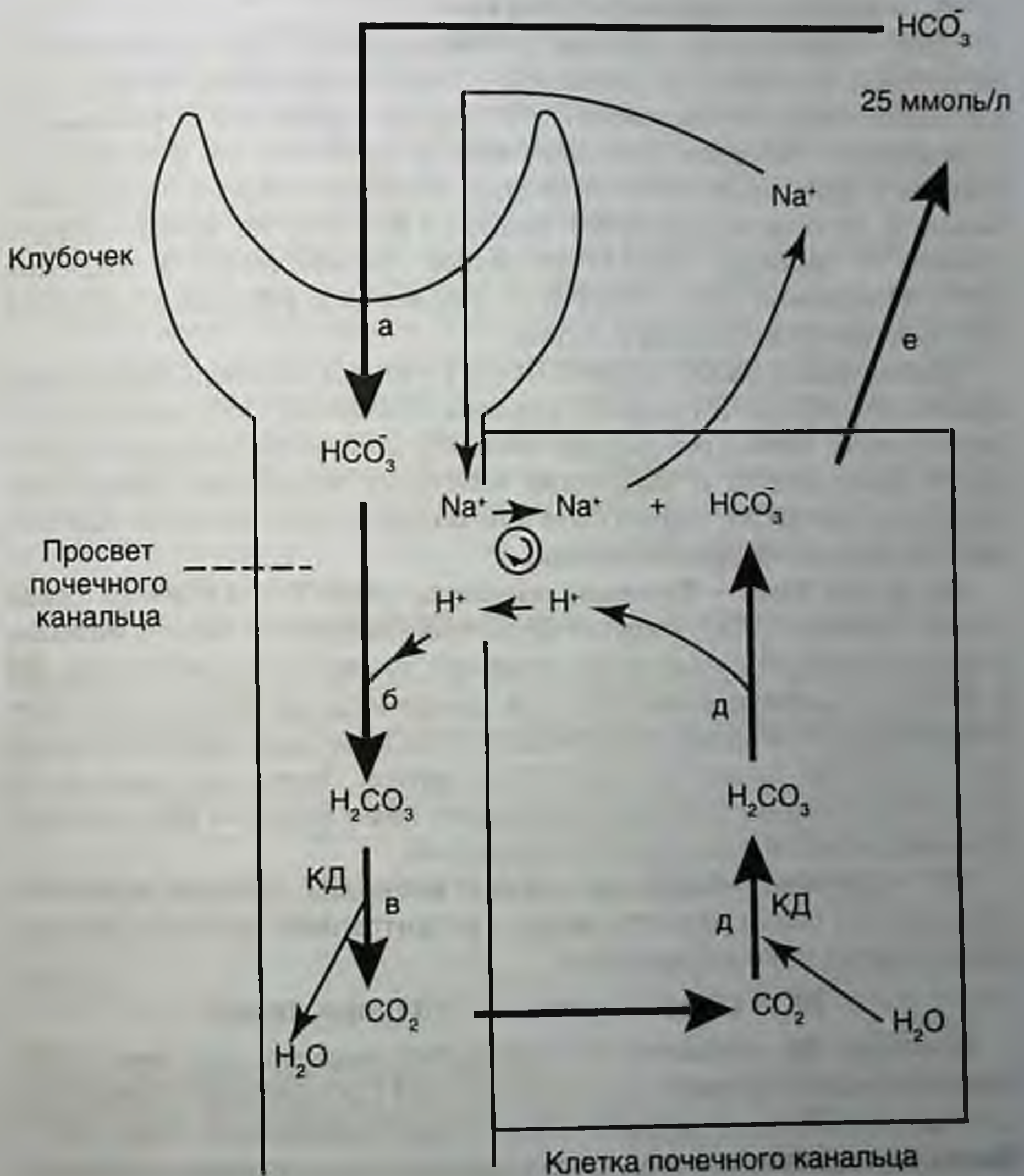


Рис. 12.49. Реабсорбция бикарбонатов из первичной мочи в почечных канальцах

### 12.8.11.3. ПОКАЗАТЕЛИ КИСЛОТНО-ОСНОВНОГО СОСТОЯНИЯ

Для оценки состояния КОС используют определение комплекса показателей, основными из которых считают рН и  $p\text{CO}_2$  крови. Для этих целей широко применяют анализаторы газов крови различных фирм, которые позволяют определять приведенные ниже показатели.

**рН** — величина активной реакции крови.

**$p\text{CO}_2$**  — парциальное давление углекислого газа. Напряжение двуокиси углерода отражает концентрацию углекислоты в крови. Углекислота, входящая в состав бикарбонатного буфера, находится в равновесии с двуокисью углерода, растворенного в крови, а та, в свою очередь, — с двуокисью углерода воздуха легочных альвеол. Вентиляция легких и свободная диффузия двуокиси углерода из крови в воздух альвеол — факторы, обуславливающие соответствующие значения  $p\text{CO}_2$ . Изменения  $p\text{CO}_2$  могут быть результатом нарушения дыхания или доставки углекислоты в легкие.

**Концентрация  $\text{HCO}_3^-$  в крови.**  $\text{HCO}_3^-$  — вторая составляющая бикарбонатного буфера. В процессе дыхания происходит удаление летучей углекислоты. Почки регулируют концентрацию углеводов в крови путем реабсорбции и выделения нелетучих углекислот. Изменение концентрации  $\text{HCO}_3^-$  может быть результатом метаболических нарушений или почечной декомпенсации.

**ВВ (Buffer Base) — буферные основания крови.** Все основания крови служат суммой  $\text{HCO}_3^-$  и других буферных оснований. Этот показатель равен в норме 48 ммоль/л, но даже при стабильных показателях рН и  $\text{HCO}_3^-$  его величина колеблется в зависимости от содержания гемоглобина крови. Именно поэтому для характеристики буферных оснований цельной крови был предложен другой, более информативный показатель — сдвиг буферных оснований (Base Excess — ВЕ), который отражает избыток или дефицит оснований.

**ВЕ — отражает избыток или дефицит оснований.** Данный показатель представляет собой разность между концентрацией буферных оснований фактической и нормальной:

$$\text{ВЕ} = \text{ВВ (фактическое)} - \text{ВВ (нормальное)}.$$

Параметр ВЕ указывает на количество кислоты или основания, необходимое для титрования 1 л крови до рН 7,40 при  $p\text{CO}_2$  40 мм рт.ст., температуре 37 °С и полном насыщении гемоглобина кислородом. Разница между фактической и полагающейся концентрацией буферных оснований указывает на нехватку (–ВЕ) или избыток (+ВЕ) буферных оснований крови. Этот параметр позволяет оценивать величину метаболических нарушений или метаболической компенсации. В современ-



ных анализаторах газов крови ВЕ рассчитывается из рН, рСО<sub>2</sub> и содержания гемоглобина или может быть определен при помощи номограмм.

**ВЕ — избыток или дефицит оснований.** В результате накопления кислот в организме сумма концентраций буферных анионов крови понижается, а в результате увеличения щелочей — повышается, образуя так называемые актуальные буферные основания. Разница между актуальной и полагающейся концентрацией буферных оснований указывает на нехватку (–ВЕ) или избыток (+ВЕ) буферных оснований крови. Изменения рСО<sub>2</sub> лишь в небольшой степени оказывают воздействие на концентрацию буферных оснований. Именно поэтому этот параметр позволяет оценивать величину метаболических нарушений или уровень метаболической компенсации.

**рО<sub>2</sub> — парциальное давление кислорода.** Напряжение кислорода в крови характеризует фракцию растворенного кислорода, которая составляет менее 10% общего количества кислорода в крови. Однако растворенный кислород находится в динамическом равновесии между кислородом эритроцитов и ткани, поэтому при характеристике гипоксии основным показателем считают рО<sub>2</sub>.

**Насыщение гемоглобина кислородом — HbO<sub>2</sub>sat.** Этот параметр определяет актуальную степень насыщения гемоглобина кислородом, выражается в процентах относительно суммарной емкости гемоглобина по связыванию кислорода.

Референтные величины показателей КОС представлены в табл. 12.18.

**Таблица 12.18.** Референтные величины показателей кислотно-основного основания

Показатель	Артериальная кровь	Венозная кровь
рН	7,36–7,44	7,26–7,36
рСО <sub>2</sub> , мм рт.ст.	36–45	46–58
ВЕ, ммоль/л	–2,3...+2,3	–2,3...+2,3
НСО <sub>3</sub> , ммоль/л	22–26	24–28
рО <sub>2</sub> , мм рт.ст.	80–100	37–42
HbO <sub>2</sub> sat, %	92–98	70–76

#### 12.8.11.4. ФОРМЫ НАРУШЕНИЙ КИСЛОТНО-ОСНОВНОГО СОСТОЯНИЯ

Заболевания и состояния, которые приводят к изменению рН крови и соответственно КОС можно разделить на две группы:

- затрагивающие функции органов (почек и легких), участвующих в поддержании рН крови;

- метаболические нарушения, изменяющие продукцию кислот и оснований до такой степени, которую не могут компенсировать механизмы, регулирующие КОС.

При состояниях, когда компенсаторные механизмы организма не способны предотвратить сдвиги концентрации водородных ионов, наступает расстройство КОС. При этом наблюдаются два противоположных состояния. Ацидоз характеризуется увеличением концентрации водородных ионов выше нормальных пределов, при этом рН крови уменьшается. Снижение величины рН менее 6,8 вызывает смерть. Если концентрация водородных ионов уменьшается (соответственно рН растет), наступает состояние алкалоза. Предел совместимости с жизнью достигается при величине рН 8,0. Нарушения КОС оценивают главным образом на основании определения значений истинного рН, парциального напряжения  $\text{CO}_2$  и избытка или дефицита оснований (бикарбоната) в крови. Поскольку парциальное напряжение  $\text{CO}_2$  в крови контролируется легкими, первичную причину изменения этого показателя называют респираторной. Первичной причиной изменения уровня бикарбоната в крови служат метаболические нарушения, поэтому такую первопричину называют метаболической. На основании этих понятий все расстройства КОС разделяют на четыре основных категории, если в основе расстройства:

- увеличение  $p\text{CO}_2$  (рН крови снижается), то такое состояние называют респираторным (дыхательным) ацидозом;
- снижение  $p\text{CO}_2$  (рН крови повышается), то такое состояние называют респираторным (дыхательным) алкалозом;
- увеличение уровня бикарбоната (рН крови повышается), то такое состояние называют метаболическим алкалозом;
- снижение уровня бикарбоната (рН крови снижается), то такое состояние называют метаболическим ацидозом.

#### 12.8.11.4.1. Дыхательный (респираторный) ацидоз

Дыхательный (респираторный) ацидоз — проявление любых состояний, при которых снижается выделение  $\text{CO}_2$  легкими. Снижение рН менее нормальных значений свидетельствует о декомпенсированном ацидозе. О компенсации судят по изменению показателей при повторных исследованиях (нормализация рН крови, рост ВЕ и  $\text{HCO}_3^-$ ). Критерии оценки степени тяжести дыхательного ацидоза представлены в табл. 12.19.

К развитию респираторного ацидоза могут приводить:

- недостаточный объем спонтанной вентиляции;
- ошибочный выбор параметров искусственной вентиляции легких;

- нарушения функционирования дыхательного центра, вызванные действием лекарственных средств (морфин, барбитураты) или черепно-мозговой травмой;
- тяжелые двусторонние поражения легких (бронхиальная астма, эмфизема легких и пневмосклероз).

Таблица 12.19. Критерии оценки степени тяжести дыхательного ацидоза

Степень тяжести	pH	pCO <sub>2</sub>	BE
Легкая	7,35–7,30	45–50	–2,3...+2,3
Средняя	7,29–7,21	51–60	–2,3...+2,3
Тяжелая	≤7,20	>61	–2,3...+2,3

### 12.8.11.4.2. Дыхательный (респираторный) алкалоз

Дыхательный (респираторный) алкалоз — снижение количества углекислоты в крови ниже нормальных значений в результате гипервентиляции. Он возникает при усиленной частоте или глубине дыхания, вызывающей ускоренное выведение pCO<sub>2</sub>. Причины дыхательного алкалоза:

- гипервентиляция;
- черепно-мозговая травма;
- тканевая гипоксия (анемии, шок, сепсис);
- травматические повреждения легких;
- интоксикация салицилатами (стимулирует дыхательный центр);
- гиперкомпенсация метаболического ацидоза.

Повышение pH более нормальных значений свидетельствует о декомпенсированном алкалозе. О компенсации судят по изменению показателей при повторных исследованиях (нормализация pH, снижение BE и HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Критерии оценки степени тяжести дыхательного алкалоза представлены в табл. 12.20.

Таблица 12.20. Критерии оценки степени тяжести дыхательного алкалоза

Степень тяжести	pH	pCO <sub>2</sub>	BE
Легкая	7,45–7,48	34–28	–2,3...+2,3
Средняя	7,49–7,58	27–20	–2,3...+2,3
Тяжелая	≥7,59	≤19	–2,3...+2,3

### 12.8.11.4.3. Метаболический ацидоз

Метаболический ацидоз — снижение HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> во внеклеточной жидкости, отражающее либо накопление нелетучих кислот, либо потерю

оснований. Основные причины накопления ионов  $H^+$  в организме следующие:

- дефицит выведения  $CO_2$ ;
- неадекватное снабжение клеток кислородом (накопление лактата);
- аномальное образование кислот (например, кетокилот при СД);
- повышенные потери бикарбоната (заболевания желудочно-кишечного тракта с диареей);
- повышенное выведение бикарбоната с мочой и/или нарушенная способность почек регенерировать бикарбонат;
- неадекватное выведение нециркулирующих кислот.

Критерии оценки степени тяжести метаболического ацидоза представлены в табл. 12.21.

Таблица 12.21. Критерии оценки степени тяжести метаболического ацидоза

Степень тяжести	pH	pCO <sub>2</sub>	BE
Легкая	7,35–7,30	35–45	–2,3...–5,0
Средняя	7,29–7,21	35–45	–5,1...–10,0
Тяжелая	≤7,20	35–45	≤–10,1

#### 12.8.11.4.4. Метаболический алкалоз

Метаболический алкалоз — первичный избыток оснований с BE выше нормы, приводящим к повышению pH крови. Он возникает в результате:

- потерь  $H^+$  и  $Cl^-$  через желудочно-кишечный тракт;
- потерь  $K^+$  (цирроз печени, диуретики);
- увеличения  $HCO_3^-$  из-за введения щелочных растворов, метаболизации цитрата, гиперкомпенсации респираторного ацидоза, потерь внеклеточной жидкости.

Критерии оценки степени тяжести метаболического алкалоза представлены в табл. 12.22.

Таблица 12.22. Критерии оценки степени тяжести метаболического алкалоза

Степень тяжести	pH	pCO <sub>2</sub>	BE
Легкая	7,45–7,48	35–45	+2,3...+5,0
Средняя	7,49–7,58	35–45	+5,1...+10,0
Тяжелая	≥7,59	35–45	≥+10,1

Выделяют два вида метаболического алкалоза:

- хлорид-чувствительный алкалоз, который устраняет внутривенное вливание растворов, содержащих натрия хлорид и калия хлорид;
- хлорид-резистентный алкалоз, не устраняемый таким лечением.

Хлорид-чувствительный алкалоз чаще встречается у больных после обильной рвоты, при потерях желудочного содержимого по гастральному зонду или побочном действии диуретиков. У больных одновременно развивается дефицит объема внеклеточной жидкости, падение концентрации хлора в моче ниже 10 ммоль/л.

Хлорид-резистентный алкалоз сопровождается содержанием хлора в моче выше 20 ммоль/л, повышенным или нормальным объемом внеклеточной жидкости и артериальной гипертензией. Необходимое условие развития метаболического алкалоза этого типа — увеличение концентрации минералокортикоидов в крови. Это приводит к росту реабсорбции натрия и усилению экскреции протонов водорода и калия.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ

1. Какие лабораторные показатели входят в понятие КОС?
2. Какие системы и органы участвуют в регуляции газового состава крови?
3. От чего зависит адекватная оксигенация органов и тканей человека?
4. Какие системы и органы участвуют в регуляции КОС?
5. Перечислите основные буферные системы организма человека.
6. Перечислите основные формы нарушений КОС.
7. Чем отличается ацидоз дыхательный от метаболического?

### 12.8.11.5. АНАЛИЗАТОРЫ КИСЛОТНО-ОСНОВНОГО СОСТОЯНИЯ

Анализаторы КОС представляют собой приборы различной степени автоматизации, предназначенные для определения параметров кислотно-основного равновесия крови на основе прямого измерения величины рН, парциального давления кислорода и углекислого газа и вычисления производных параметров. Важно понимать, что такие параметры, как концентрация бикарбоната ( $\text{HCO}_3^-$ ) в крови, ВВ — буферные основания крови, ВЕ — избыток или дефицит оснований,  $\text{HbO}_{\text{sat}}$  — насыщение гемоглобина кислородом, служат не измеряемыми, а расчетными показателями. Все расчеты осуществляет компьютер анализатора. Анализаторы КОС могут быть дополнительно оснащены блоком для измерения концентрации электролитов (калий, натрий, кальций, хлор), некоторых метаболитов (глюкоза, лактат), а для опре-

деления концентрации гемоглобина, его производных (оксигемоглобина —  $\text{HbO}$ , карбоксигемоглобина —  $\text{HbCO}$ , метгемоглобина —  $\text{MetHb}$ ) и билирубина — блоком  $\text{CO}$ -оксиметрии.

Степень автоматизации проведения анализа КОС у анализаторов может отличаться и в максимальной комплектации включает автоматическое выполнение таких процедур, как:

- автоматический забор пробы крови;
- автоматическая промывка измерительной камеры;
- автоматическая калибровка измеряющих электродов;
- автоматический контроль качества и распечатка результатов.

На рис. 12.50 и 12.51 представлено устройство анализатора КОС.

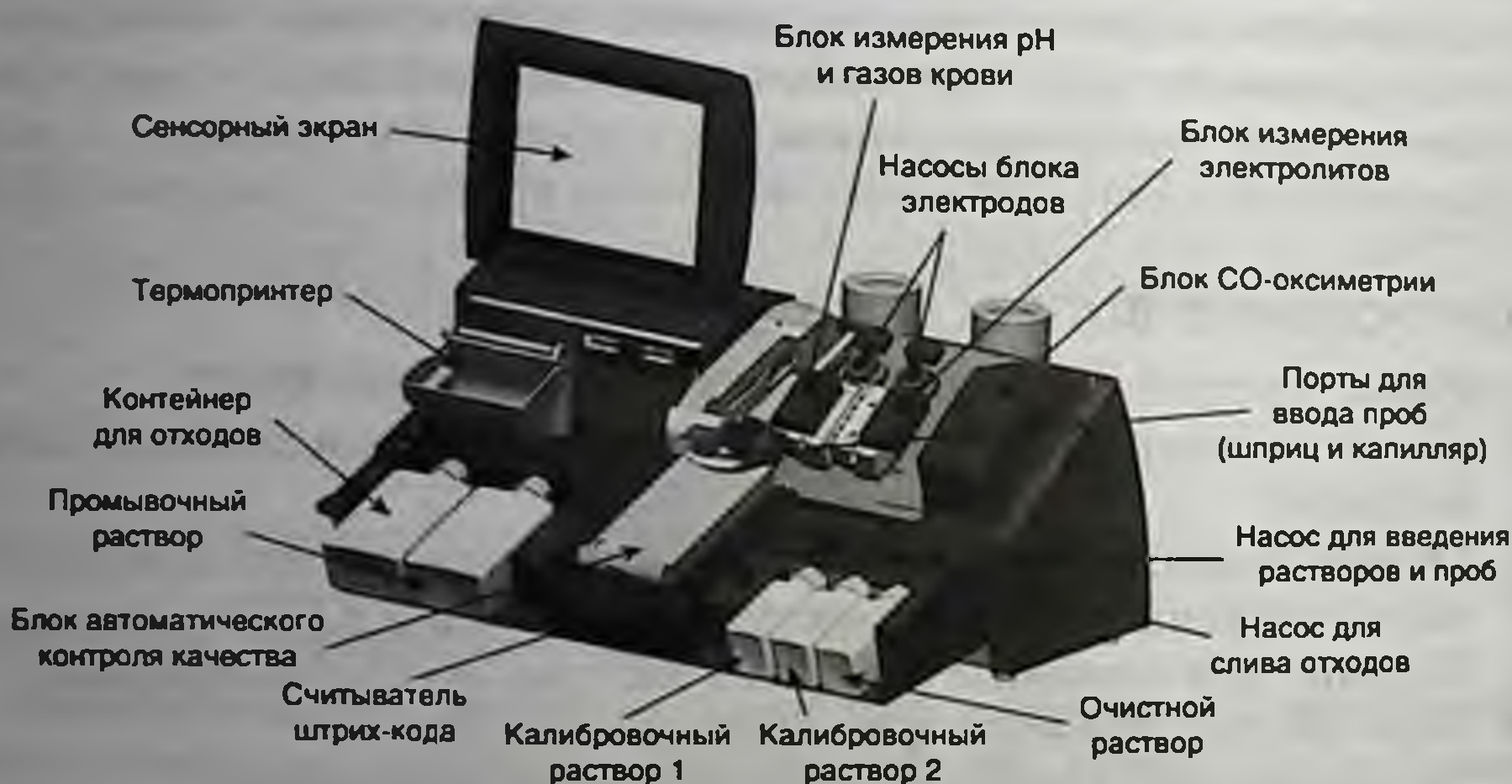


Рис. 12.50. Основные модули анализатора кислотно-основного состояния (вид спереди)

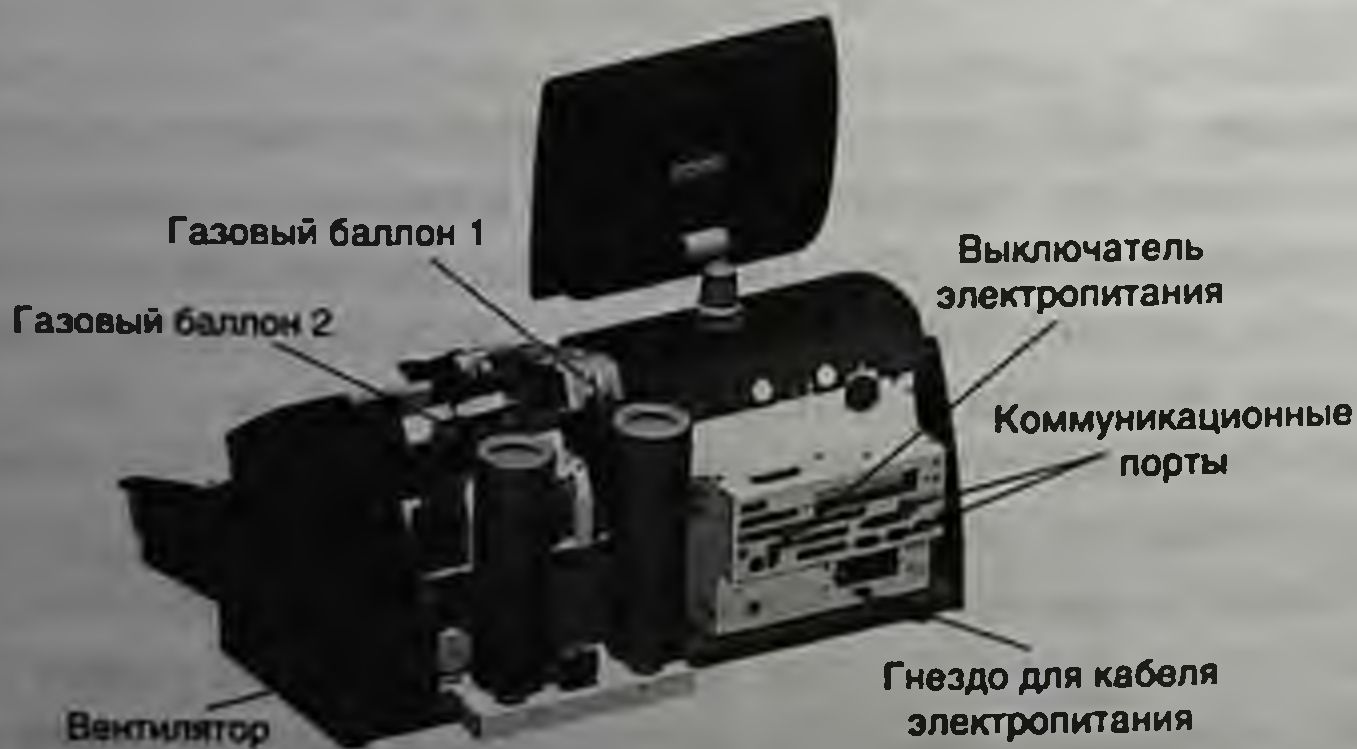


Рис. 12.51. Основные модули анализатора кислотно-основного состояния (вид сзади)

Современные анализаторы КОС оснащены жидкокристаллическим сенсорным дисплеем для управления, устройством для считывания штрихкода, термопринтером для автоматической распечатки как результатов анализа, так и данных о калибровке и состоянии анализатора.

Для ввода пробы в анализаторе используют соответствующий блок, в котором имеются порты для введения проб из шприца/пробирки или капилляра. Входные порты для шприца и капилляра смонтированы так, что одновременно может быть открыт только один порт.

Измерительная секция в анализаторе КОС представлена блоком электродов для измерения рН,  $\text{CO}_2$  и  $\text{O}_2$ . Однако конструкция анализатора предусматривает возможность дополнительной установки в измерительной секции блоков для измерения электролитов и метаболитов в зависимости от запросов лаборатории. Второй важной составляющей измерительной секции служат насосы блока электродов с системой мембранных клапанов. Они прокачивают пробы, растворы и газовые смеси через измерительные блоки.

В анализаторе КОС применяют достаточно сложную систему калибровки. Однако благодаря полной автоматизации этой процедуры она не вызывает затруднений у специалистов лаборатории. Калибровки выполняются с применением растворов и газов известной концентрации для каждого из измеряемых показателей. В анализаторе используют калибровки по одной и двум точкам. Для этого в анализаторе установлены две емкости с калибровочным раствором 1 и 2, которые имеют точно установленное значение рН, концентрации электролитов и метаболитов. Состав калибровочного раствора 1: рН 7,4, калий — 4 ммоль/л, натрий — 145 ммоль/л, кальций — 1,25 ммоль/л, хлор — 102 ммоль/л, глюкоза — 10 ммоль/л, лактат — 4 ммоль/л. Калибровочный раствор 2: рН 6,9, калий — 40 ммоль/л, натрий — 20 ммоль/л, кальций — 5 ммоль/л, хлор — 50 ммоль/л. Эти калибровочные растворы анализатор использует для калибровки рН-электрода, электродов для измерения концентрации электролитов и метаболитов.

Для калибровки  $\text{CO}_2$  и  $\text{O}_2$  электродов используют газовые баллоны со строго установленной концентрацией газов. Газовый баллон 1 содержит газовую смесь следующего состава:  $\text{CO}_2$  — 5,61%,  $\text{O}_2$  — 19,76%,  $\text{N}_2$  — 74,64%. Состав газовой смеси в баллоне 2 следующий:  $\text{CO}_2$  — 11,22%,  $\text{O}_2$  — <0,04%,  $\text{N}_2$  — 88,74%.

При калибровке по одной точке каждый параметр (рН,  $\text{pCO}_2$  и  $\text{pO}_2$ ) измеряют в одном калибровочном растворе и газе известного состава с получением одного значения для каждого параметра. Измеренные значения сравниваются компьютером анализатора с теми, которые в действительности присутствуют в калибровочном растворе и газе. При

калибровке по двум точкам каждый параметр ( $pH$ ,  $pCO_2$  и  $pO_2$ ) измеряется в 2 калибровочных растворах и газах известного состава с получением 2 значений для каждого параметра. Данные калибровки используют для расчетов результатов анализа проб биологического материала. По одной точке калибруют только электроды для измерения концентрации метаболитов (глюкоза, лактат),  $pH$ -электрод и электроды для измерения электролитов калибруются как по одной, так и по двум точкам. При наличии в анализаторе КОС блока Ко-оксиметрии для определения концентрации гемоглобина и его производных для калибровки применяют отдельный калибратор с концентрацией гемоглобина 98 г/л. Этот же блок используют для определения концентрации билирубина и тот же, что и для гемоглобина, калибратор с концентрацией билирубина 369 мкмоль/л, то есть для этих показателей применяют одну точечную калибровку.

Калибровка анализатора выполняется автоматически через определенные интервалы времени, которые может выбрать специалист лаборатории в настройках плана калибровок. Такую калибровку называют плановой. Специалист лаборатории может провести калибровку в любой момент, если этого требует ситуация (например, сомнения в результате анализа, замена электрода), путем нажатия соответствующей кнопки в меню программы анализатора. Соответственно такую калибровку называют внеплановой.

Для обеспечения надежности, правильности и точности результатов анализа проб пациентов в анализаторе используют систему ВКК в отношении каждого из измеряемых показателей —  $pH$ ,  $pCO_2$  и  $pO_2$ , а также каждого электролита и метаболита в случае наличия блоков других электродов. Для этого применяют четыре типа контрольных материалов (растворов), которые обеспечивают контроль рабочих характеристик электродов при измерении параметров на низком, нормальном и высоком уровне.

Если анализатор оснащен блоком для контроля качества, то вся процедура выполняется автоматически по команде специалиста лаборатории (нажатие соответствующей кнопки в меню анализатора). В случае отсутствия такого блока калибровку осуществляют ручным способом.

При проведении измерения пробы крови шприц или капилляр вставляют в соответствующее отверстие входного порта и нажимают кнопку «Старт», а затем для запуска измерения — кнопку «Аспирация». Под действием насоса введения растворов и проб кровь поступает во входной модуль. После закрытия клапана входного порта открывается следующий по ходу клапан блока измерения  $pH$  и газов крови, и с помощью насоса этого блока измерений кровь поступает на электроды (рис. 12.52).



На электродах осуществляется измерение показателей, если необходимо измерить другие показатели, то проба поступает на другой блок (электролитов и/или гемоглобина). По завершении измерения всех показателей включается насос для слива отходов, и проба крови поступает в емкость для отходов. Все трубки и каналы промываются промывочным раствором, и анализатор готов к проведению исследования следующей пробы крови.

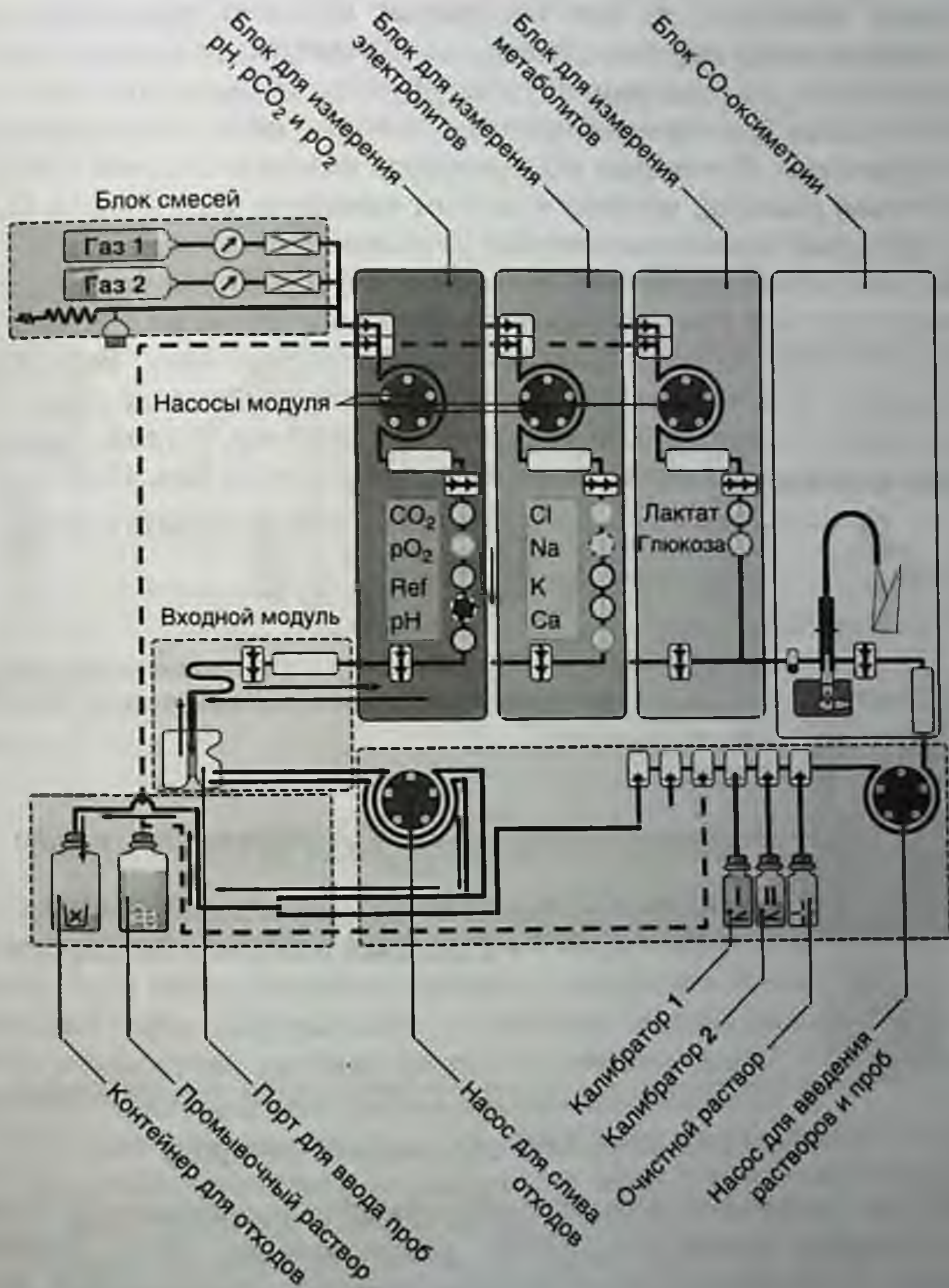


Рис. 12.52. Работа анализатора кислотно-основного состояния

Блок измерения рН и газов крови включает электроды референтный, рН,  $\text{CO}_2$  и  $\text{pO}_2$ . В основу измерения показателей этими электродами положен потенциометрический метод. Однако принцип работы этих электродов при проведении измерений отличается. Такие электроды, как рН и  $\text{pCO}_2$ , измеряют напряжение, возникающее из-за изменения концентрации ионов вследствие их перемещения через мембрану электрода, то есть используют принцип потенциометрии на основе реакций ионного обмена; они по своей сути являются ионо-селективными электродами. В свою очередь,  $\text{pO}_2$ -электрод является металлическим (электронообменным), который обладает электронной проводимостью. Потенциал  $\text{pO}_2$ -электрода возникает за счет электрохимической реакции, поэтому в данном электроде используется амперометрический принцип измерения (измерение тока).

Для получения результатов измерений рН и  $\text{pCO}_2$  необходим референтный электрод (электрод сравнения). Он обеспечивает стабильный, фиксированный потенциал, относительно которого могут быть измерены другие потенциалы, так как потенциал на электроде сравнения не изменяется в зависимости от состава пробы крови. Устройство референтного электрода в анализаторе КОС приведено на рис. 12.53.

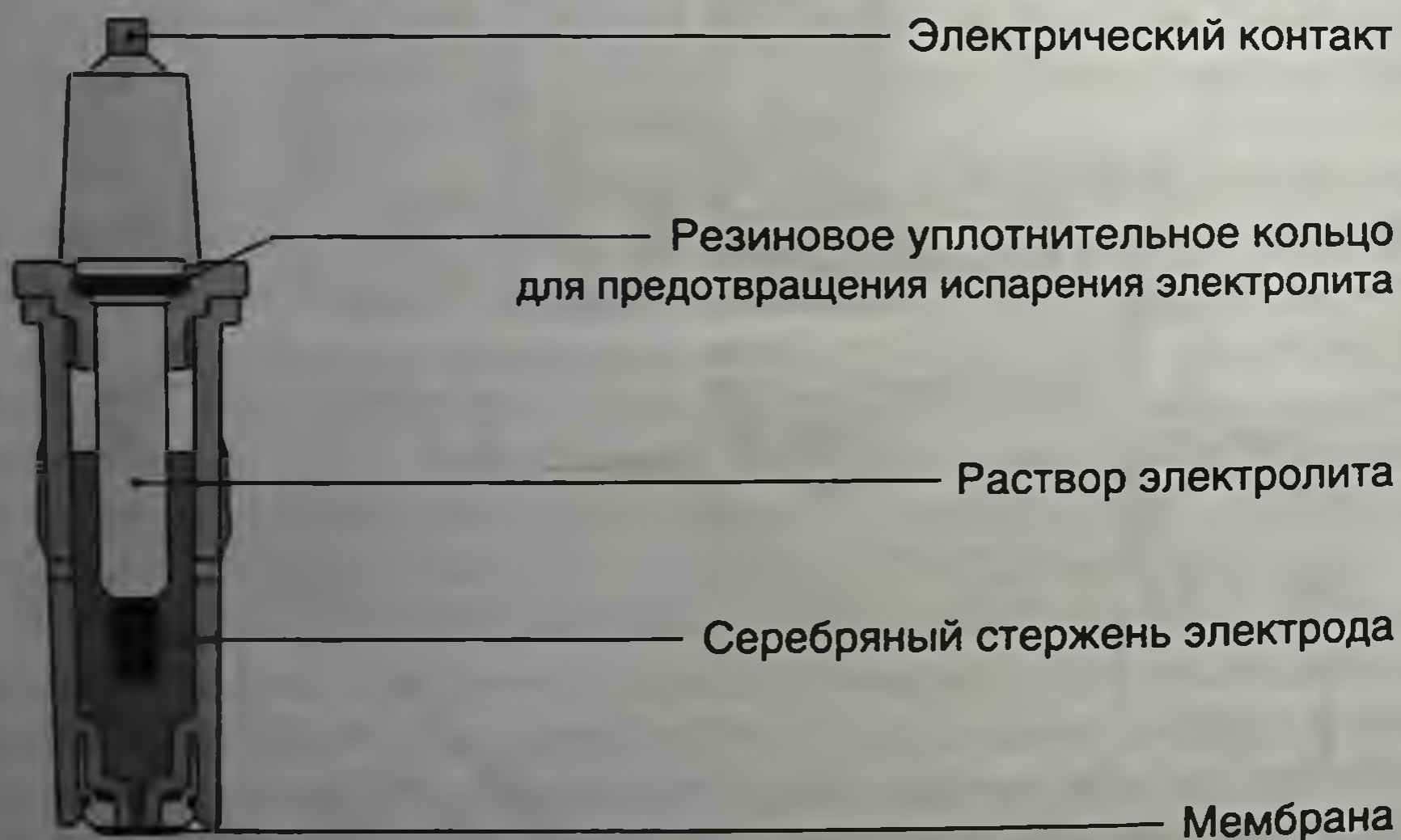


Рис. 12.53. Устройство референтного электрода

Раствор электролита референтного электрода представляет 4 М раствор формиата натрия ( $\text{HCOONa}$ ), доведенный до рН 5,5 соляной кислотой. Он поддерживает электрохимический контакт между серебряным стержнем электрода, покрытого  $\text{AgCl}$ , и исследуемой пробой.

Мембрана состоит из трех отдельных мембранных слоев:

- внутренний — ограничивает диффузию через мембрану и стабилизирует всю мембранную систему;
- средний — устраняет влияние белков пробы на измерение;
- наружный — снижает обмен ионов промывочного раствора и раствора электролита референтного электрода, что увеличивает срок его службы.

Электрод для измерения pH в анализаторах КОС устроен как «классический» стеклянный pH-электрод. Устройство pH-электрода приведено на рис. 12.54.

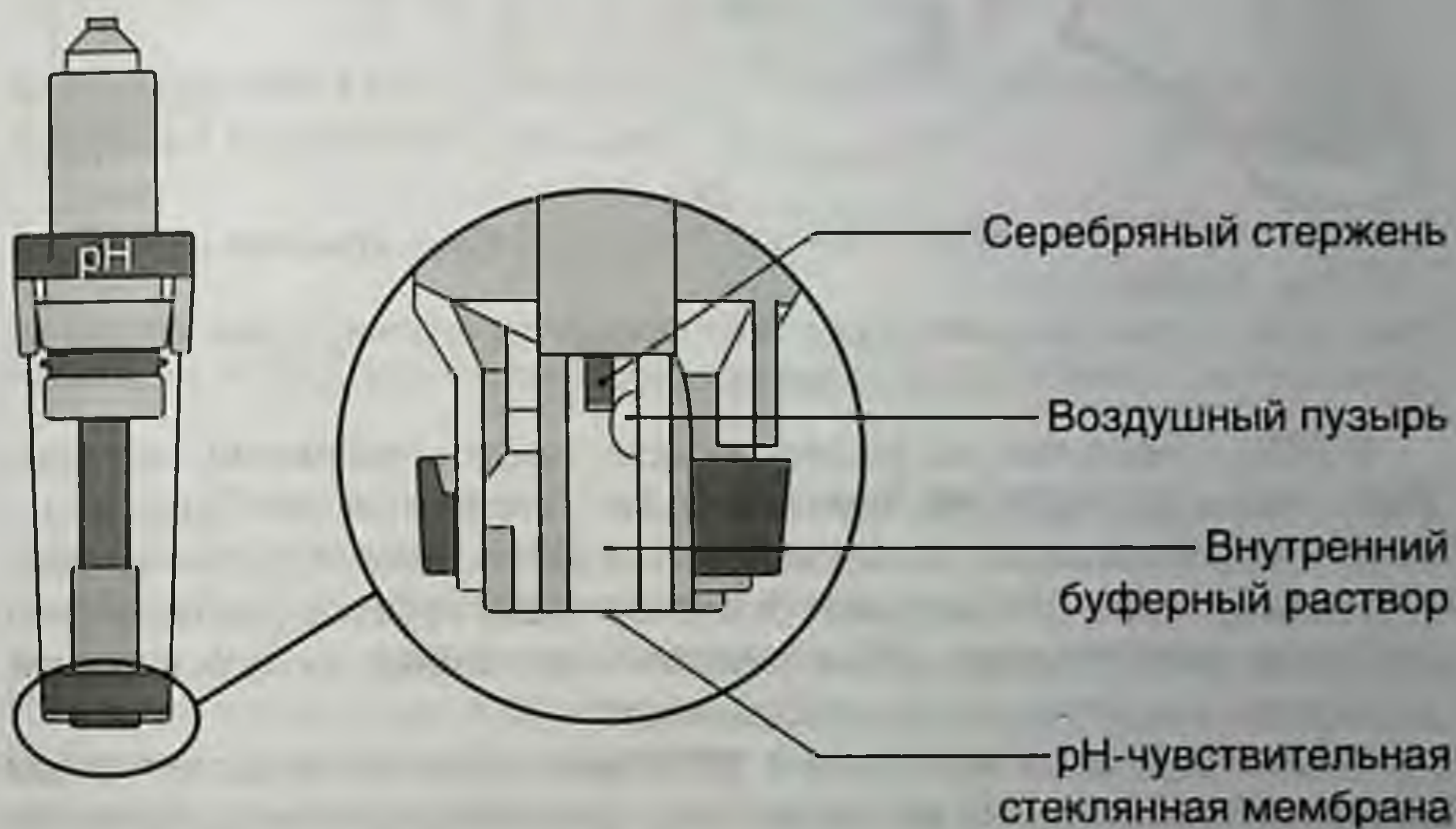


Рис. 12.54. Устройство pH-электрода

Серебрый стержень (Ag) электрода, покрытый AgCl, обеспечивает электрический контакт с внутренним буферным раствором, а равновесие Ag/AgCl поддерживает стабильный потенциал. Воздушный пузырь позволяет буферному раствору расширяться при помещении электрода в блок анализатора, где поддерживается температура 37 °С. Внутренний буферный раствор имеет постоянный и известный pH.

Электрод для измерения CO<sub>2</sub> (pCO<sub>2</sub>-электрод) имеет сложное устройство и состоит из pH-электрода и внутреннего электрода сравнения (референтного) в одном комплекте. Такое сложное устройство pCO<sub>2</sub>-электрода обусловлено тем, что он измеряет парциальное содержание углекислого газа не напрямую. Устройство pCO<sub>2</sub>-электрода представлено на рис. 12.55.

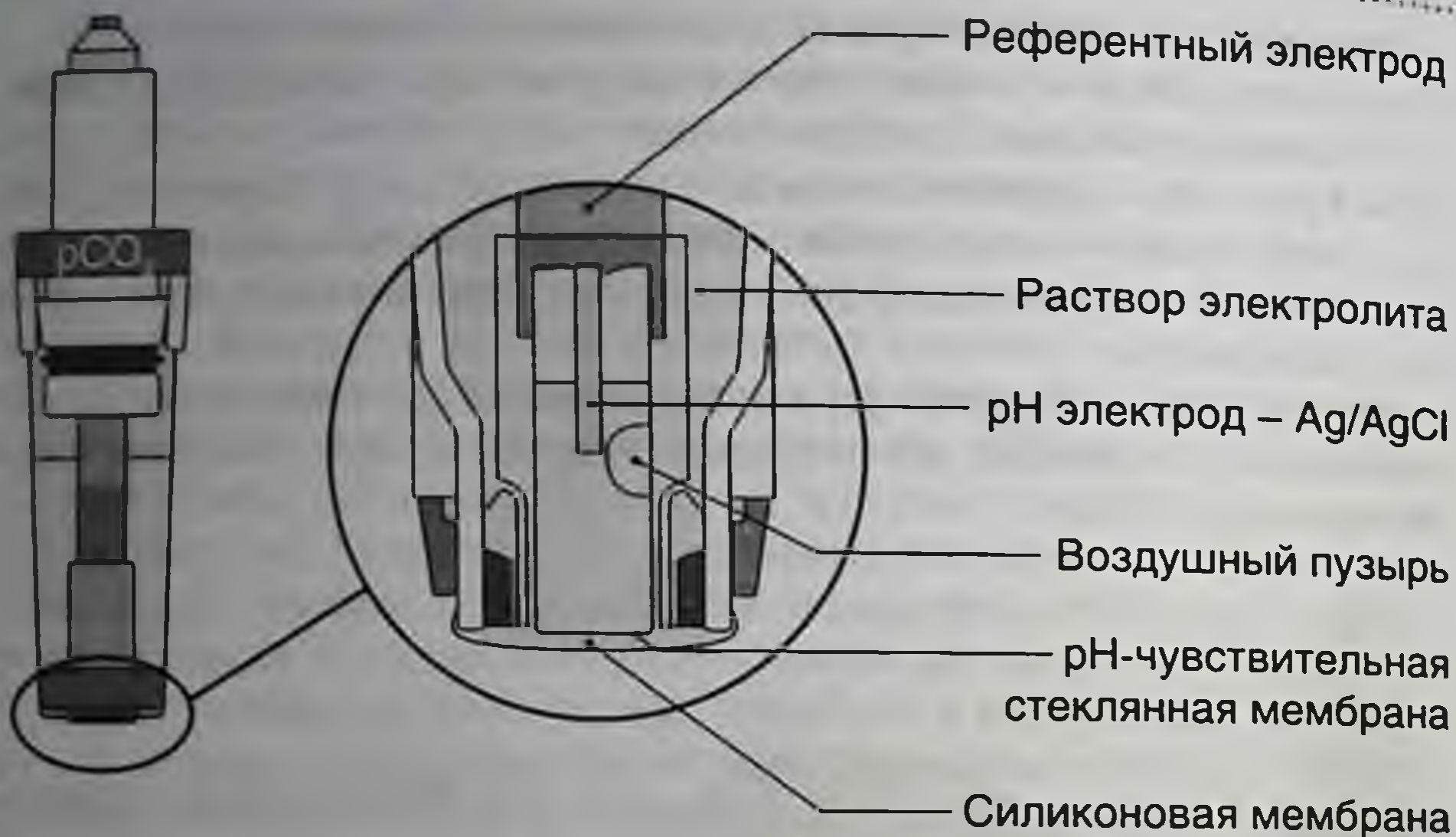


Рис. 12.55. Устройство электрода для измерения парциального давления углекислого газа

В  $p\text{CO}_2$ -электроде рН-электрод также имеет серебряный стержень (Ag), покрытый AgCl; рН-чувствительная стеклянная мембрана изменяет потенциал только за счет изменения рН введенной пробы крови.

Раствор электролита служит бикарбонатным буфером, содержащим глицерин для предотвращения скопления пузырьков воздуха в кожухе электрода, что улучшает его стабильность.

Ионоселективная мембрана в  $p\text{CO}_2$ -электроде представляет собой силиконовую мембрану на нейлоновой сетке. Силикон проницаем для  $\text{CO}_2$ , нейлоновая сетка задерживает раствор электролита. При проведении измерений  $\text{CO}_2$  проникает в силиконовую мембрану и растворяется в растворе электролита, задержанного в нейлоновой сетке. Образуется угольная кислота, происходит изменение рН, которое регистрируют по изменению потенциала на чувствительной к рН стеклянной мембране. Показание потенциала преобразуется в значение рН. Значение рН связано с парциальным давлением  $\text{CO}_2$  в крови, которое рассчитывают по уравнению Гендерсона–Гассельбаха.

Электрод  $p\text{O}_2$  измеряет ток, возникающий при электрохимической реакции на электроде при исследовании пробы крови. Электрохимическая реакция — реакция, в которой происходит перенос электронов. Поток электронов (ток) пропорционален концентрации субстрата —  $p\text{O}_2$ . На этом принципе основано также измерение глюкозы и лактата в крови. Устройство  $p\text{O}_2$ -электрода приведено на рис. 12.56.

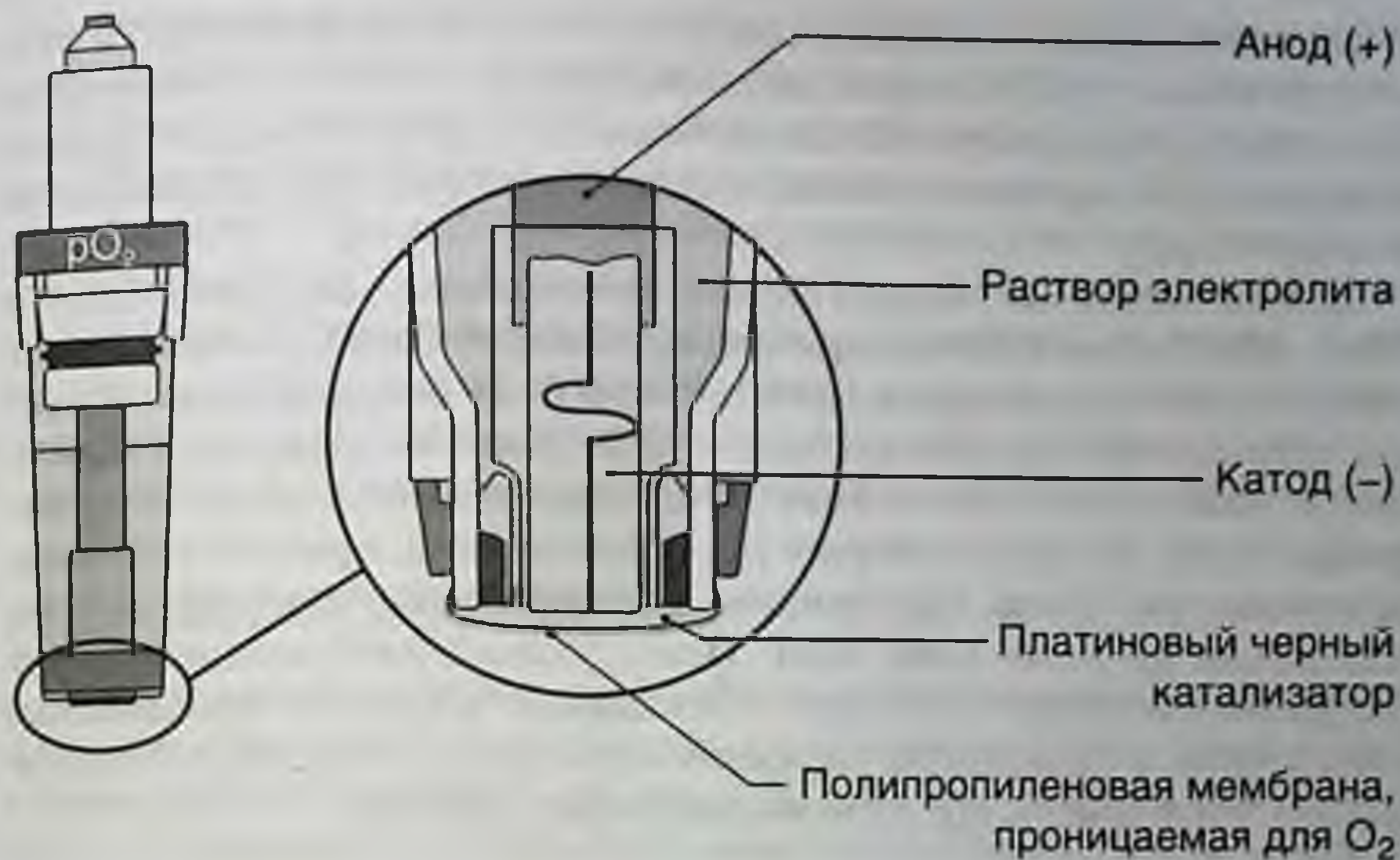


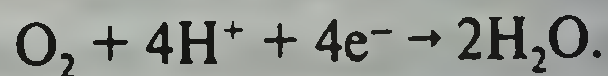
Рис. 12.56. Устройство электрода для измерения парциального давления кислорода

Анод (+) представляет собой серебряный стержень (Ag), покрытый AgCl. Во время измерения  $pO_2$  происходит окисление Ag. Раствор электролита обеспечивает электрический контакт между анодом и катодом.

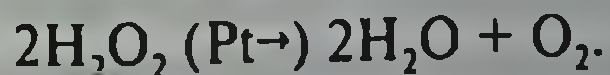
Катод (-) — платиновая проволока (Pt), заключенная в стекло. На катоде происходит восстановление  $O_2$ .

Платиновый черный катализатор представляет собой тонкий черный слой, его предназначение — превращение  $H_2O_2$  в  $H_2O$  и  $O_2$ .

Кислород из пробы крови диффундирует через пропиленовую мембрану  $pO_2$ -электрода в раствор электролита и восстанавливается на катоде. Ионы водорода ( $H^+$ ), необходимые для восстановления кислорода, поступают из раствора электролита, а электроны ( $e^-$ ) — из серебра анода:



Часть кислорода полностью не восстанавливается и превращается в перекись водорода ( $H_2O_2$ ). Разложение перекиси водорода катализируется платиновым черным катализатором:



Для замыкания электрической цепи происходит окисление Ag на серебряном аноде:



Восстановление кислорода производит поток электронов, то есть электрический ток, который пропорционален количеству кислорода и измеряется амперметром в пикоамперах (пА). Сила тока, измеренная во время этого процесса, автоматически преобразуется анализатором в значение  $pO_2$ .

Для определения концентрации гемоглобина, его производных (HbO, HbCO, MetHb) и билирубина используют блок СО-оксиметрии. Название не совсем правильное, так как блок используют не только для определения оксида углерода — СО (угарного газа), но и других производных гемоглобина. Блок СО-оксиметрии по своей сути — спектрофотометр, который измеряет поглощение света, проходящего через лизированную кровь (эритроциты разрушаются ультразвуком) при нескольких десятках длин волн. Последующий многокомпонентный программный анализ спектров поглощения основных производных гемоглобина и билирубина позволяет количественно оценить концентрацию гемоглобина, его производных и билирубина.

## 12.9. ИССЛЕДОВАНИЕ ОБМЕНА ЖЕЛЕЗА И ВИТАМИНОВ

Лабораторные исследования обмена железа и витаминов играют важнейшую роль в установлении причины широко распространенного состояния — анемии. Гематологические показатели, используемые для диагностики анемии, включают определение содержания гемоглобина, подсчет числа эритроцитов в крови и особенно среднего объема эритроцита и средней концентрации гемоглобина в эритроците. Роль этих показателей обсуждается в соответствующей главе. Анемия — не заболевание, а патологический симптом, который имеет много причин. Проведение общего анализа крови позволяет диагностировать анемию и в некоторой степени предположить его причину. Распознавание причины развития анемии в каждом конкретном случае служит конечным этапом диагностического поиска. От того, насколько правильно будет установлена причина анемии, зависит успех лечения последней. Главное значение шести показателей — концентрации железа, общей железосвязывающей способности сыворотки крови (ОЖСС), трансферрина, ферритина, витамина  $B_{12}$  и фолиевой кислоты, рассматриваемых в данном разделе, в том, что они позволяют подтвердить предполагаемую причину анемии.

Дефицит железа — наиболее распространенная причина анемии, от которой страдают в нашей стране более 30% населения. Железодефицитная анемия — клинико-гематологический синдром,

характеризуемый нарушением синтеза гемоглобина в результате дефицита железа, который развивается на фоне различных патологических (физиологических) процессов и манифестирует признаками анемии. Определение сывороточной концентрации железа, ОЖСС крови, трансферрина и ферритина позволяет установить диагноз железодефицитной анемии.

Дефицит в организме витамина  $B_{12}$  и фолиевой кислоты, часто встречающийся у пожилых людей, лежит в основе развития мегалобластной анемии. Соответственно исследование уровня этих витаминов в сыворотке крови позволяет диагностировать данное заболевание.

### 12.9.1. ОБМЕН ЖЕЛЕЗА

Железо входит в состав гемоглобина (включено в состав молекулы гема), где выполняет важнейшую функцию связывания и доставки кислорода клеткам организма человека. Именно поэтому железо необходимо для синтеза и функционирования гемоглобина. Общее содержание железа в организме «стандартного» человека составляет около 4,2 г. Примерно 75–80% его общего количества входит в состав гемоглобина, 20–25% железа являются резервными, 5–10% входят в состав миоглобина, около 1% содержится в дыхательных ферментах, катализирующих процессы дыхания в клетках и тканях. Резервное железо запасается главным образом в печени, селезенке и костном мозге, где хранится в белках ферритине и гемосидерине. Часть ферритина присутствует в плазме, а его концентрация служит надежным индикатором состояния запасов железа в организме. Общее содержание железа в организме человека, входящее в состав гемоглобина, составляет 3000 мг, в составе миоглобина его содержится около 125 мг, в печени — около 700 мг, представленного преимущественно ферритином. От 3 до 4 мг (0,1% общего количества железа) циркулирует в плазме крови в связи с транспортным белком — трансферрином.

Железо осуществляет свою биологическую функцию главным образом в составе других биологически активных соединений (гемоглобин, миоглобин, железосодержащие ферменты), которые выполняют четыре основные функции:

- транспорт электронов (цитохромы, железосеропротеиды);
- транспорт и депонирование кислорода (гемоглобин, миоглобин);
- участие в формировании активных центров окислительно-восстановительных ферментов (оксидазы, гидроксилазы и др.);
- транспорт и депонирование железа (трансферрин, гемосидерин, ферритин).

Гомеостаз железа в организме обеспечивается в первую очередь регулирующей его всасывания в желудочно-кишечном тракте из-за ограниченной способности организма к выделению этого элемента.

Существует выраженная обратная зависимость между обеспеченностью организма человека железом и его всасыванием в пищеварительном тракте. Всасывание железа зависит от:

- возраста и обеспеченности организма железом;
- состояния желудочно-кишечного тракта;
- количества и химических форм поступающего железа с пищей;
- количества и форм прочих компонентов пищи.

Для оптимального всасывания железа необходима нормальная секреция желудочного сока. Прием соляной кислоты способствует усвоению железа. Аскорбиновая кислота, восстанавливающая железо и образующая с ним хелатные комплексы, повышает доступность этого элемента, так же как и прочие органические кислоты. Другим компонентом пищи, улучшающим всасывание железа, считают «фактор животного белка». Улучшают всасывание железа простые углеводы: лактоза, фруктоза, сорбит, а также такие аминокислоты, как гистидин, лизин, цистеин, образующие с железом легко всасываемые хелаты. Всасывание железа снижают такие напитки, как кофе и чай, полифенольные соединения которых прочно связывают этот элемент. Именно поэтому чай применяют для профилактики повышенного усвоения железа у больных талассемией. Большое влияние на усвоение железа оказывают различные заболевания. Оно усиливается при недостаточности железа, анемиях (гемолитической, апластической, мегалобластной), гиповитаминозе В<sub>6</sub> и гемохроматозе, что объясняют усилением эритропоэза, истощением запасов железа и гипоксией.

Современные представления о всасывании железа в кишечнике отводят центральную роль двум видам трансферрина — мукозному и плазменному. Мукозный трансферрин секретируется клетками слизистой оболочки кишечника (энтероцитами) в просвет кишечника, где он загружается железом, после чего проникает в энтероцит. В этой клетке трансферрин освобождается от железа, после чего вступает в новый цикл. Источником мукозного трансферрина служит не сам энтероцит, а печень, из которой этот белок поступает в кишечник с желчью. Из энтероцита мукозный трансферрин отдает железо своему плазменному аналогу. Наиболее интенсивное всасывание железа происходит в проксимальных (начальных) отделах тонкой кишки (в двенадцатиперстной и тощей) и отсутствует в подвздошной кишке. Плазменный трансферрин доставляет железо к тканям, име-



ющим специфические рецепторы. Количество железа, поступающего в клетку, прямо пропорционально числу мембранных рецепторов. Наибольшее количество рецепторов содержат клетки костного мозга, ретикулоэндотелиальной системы печени и селезенки. В клетках этих органов происходит высвобождение железа из трансферрина. Затем плазменный трансферрин возвращается в циркуляцию. Повышение потребности клеток в железе при их быстром росте или синтезе гемоглобина ведет к индукции (усилению) биосинтеза рецепторов трансферрина, и, напротив, при повышении запасов железа в клетке число рецепторов на ее поверхности снижается. У взрослого человека в костном мозге железо трансферрина с помощью специфических рецепторов включается в нормо- и ретикулоциты, использующие его для синтеза гемоглобина. В прочие ткани трансферрин доставляет в 4 раза меньшее количество железа, чем в костный мозг.

Организм человека хорошо сохраняет железо. После того как эритроциты, прожив 120 сут, погибают, железо возвращается в резерв костного мозга для образования новых эритроцитов. За счет распада гемоглобина высвобождается около 21–24 мг/сут железа, что во много раз превышает поступление его из пищеварительного тракта (1–1,5 мг/сут). Более 95% железа поступает в плазму из клеток ретикулоэндотелиальной системы печени и селезенки, которые в сутки поглощают путем фагоцитоза более  $10^{11}$  старых эритроцитов. Железо, поступившее в клетки ретикулоэндотелиальной системы, либо быстро возвращается в циркуляцию в виде ферритина, либо откладывается про запас. Гемоглобин, поступающий в плазму крови при распаде эритроцитов, специфически связывается с гаптоглобином, что предупреждает его фильтрацию через почки.

Железо выделяется из организма в основном путем слущивания слизистой оболочки кишечника и с желчью. Оно теряется также с волосами, ногтями, мочой и потом. Общее количество выделяемого таким образом железа составляет у здорового мужчины 0,6–1 мг/сут, а у женщин репродуктивного возраста — более 1,5 мг.

Нормальная сбалансированная диета обеспечивает поступление в желудочно-кишечный тракт около 10–15 мг железа ежедневно. Основными источниками железа служат мясо, рыба, овощи и крупы. Железо из животной пищи усваивается в несколько раз лучше, чем из растительной. В норме из пищи всасывается около 10% содержащегося в ней железа (1–1,5 мг/день), и этого вполне достаточно для возмещения дневных потерь.

Таким образом, концентрация железа в сыворотке зависит от резорбции в желудочно-кишечном тракте, накопления в кишечнике, селезен-

ке и костном мозге, от синтеза и распада гемоглобина и его потери организмом.

Оптимальным для хорошего здоровья пациента служит состояние, при котором запасы железа в организме достаточны, но не избыточны.

## 12.9.2. ЛАБОРАТОРНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ, ХАРАКТЕРИЗУЮЩИЕ ОБМЕН ЖЕЛЕЗА

Оценка содержания железа в сыворотке крови может потребоваться тогда, когда подозревают его дефицит или избыток в организме пациента. Железодефицитные состояния (железодефицитная анемия) — одно из наиболее распространенных заболеваний человека. Избыток железа в организме встречаются значительно реже. Для подтверждения дефицита или избытка железа необходимо проведение комплекса биохимических тестов, характеризующих метаболизм железа. К таким тестам относят определение концентрации железа в сыворотке, ОЖСС, трансферрина и ферритина в сыворотке крови. Каждый из этих тестов имеет свою цель. Выполненные каждый в отдельности, они не всегда служат надежными показателями метаболизма железа в организме. При комплексном исследовании этих показателей их ценность существенно возрастает.

### 12.9.2.1. КОНЦЕНТРАЦИЯ ЖЕЛЕЗА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Концентрация железа в крови у людей значительно варьирует. Она имеет суточный ритм, и колебания ее уровня в сыворотке крови у здорового человека в течение суток могут составлять 100%. У женщин существует связь концентрации железа в крови с менструальным циклом. При беременности содержание железа в организме уменьшается, особенно в ее второй половине. Референтные величины содержания железа в сыворотке приведены в табл. 12.23.

Таблица 12.23. Референтные величины содержания железа в сыворотке

Возраст	Содержание железа	
	мкг/дл	мкмоль/л
Новорожденные	100–250	17,90–44,75
Дети до 2 лет	40–100	7,16–17,90
Дети	50–120	8,95–21,48
Взрослые:		
мужчины	65–175	11,6–31,3
женщины	50–170	9,0–30,4

Определение концентрации железа в сыворотке крови дает представление об уровне транспортируемого железа в плазме крови, связанного с трансферрином. При недостатке железа в организме концентрация его в сыворотке крови снижается. Однако его уровень в крови не всегда позволяет надежно оценить выраженность дефицита железа. Большие вариации содержания железа в сыворотке крови, возможность его увеличения при некротических процессах в тканях (например, при некрозе печеночных клеток), его снижение при воспалительных процессах (инфекция, травма, хронические воспалительные заболевания) вследствие перемещения из крови в депо ограничивают диагностическое значение определения железа сыворотки. Измеряя только содержание железа в сыворотке крови, нельзя получить информацию о причинах нарушенного обмена железа. Для этого необходимо определять в крови ОЖСС или содержание трансферрина и ферритина.

### 12.9.2.2. ОБЩАЯ ЖЕЛЕЗОСВЯЗЫВАЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ СЫВОРОТКИ

ОЖСС считают непрямым показателем концентрации в сыворотке крови белка трансферрина. Однако следует учитывать, что при оценке содержания трансферрина по результатам определения ОЖСС данный метод исследования завышает значения трансферрина на 16–20%, так как при более чем половинном насыщении трансферрином железо связывается с другими белками. Под ОЖСС понимают не абсолютное количество трансферрина, а количество железа, которое может связаться с трансферрином.

В норме ненасыщенная железосвязывающая способность сыворотки крови (НЖСС) составляет в среднем 50,2 ммоль/л (279 мкг/дл). Пределы колебаний референтных значений ОЖСС представлены в табл. 12.24.

Таблица 12.24. Референтные величины общей железосвязывающей способности сыворотки

Возраст	Референтные величины ОЖСС	
	мкг/дл	ммоль/л
Дети до 2 лет	100–400	17,90–71,60
Впоследствии	250–425	44,75–76,1

Хотя ОЖСС увеличивается при дефиците железа, на ее уровень могут влиять многие факторы. К ним относят острые заболевания печени (острые гепатиты), беременность и прием контрацептивов *per os*.

### 12.9.2.3. ТРАНСФЕРРИН В СЫВОРОТКЕ

Трансферрин относят к  $\beta$ -глобулинам. Главная функция — транспорт всосавшегося в кишечнике железа в его депо (печень, селезенка), ретикулоциты и их предшественники в костном мозге. Трансферрин способен также связывать ионы других металлов (цинк, кобальт и др.). Из общего количества трансферрина в организме человека только его 25–40% содержит железо. Основное место синтеза трансферрина — печень. В сопоставлении с содержанием железа в сыворотке крови уровень трансферрина служит более стабильной величиной с менее выраженными различиями по полу и возрасту.

Определение концентрации трансферрина в сыворотке считают наиболее достоверным тестом оценки железодефицитных состояний. Референтные величины трансферрина представлены в табл. 12.25.

Таблица 12.25. Референтные величины содержания трансферрина в сыворотке

Возраст	Содержание трансферрина	
	мг/дл	г/л
Новорожденные	130–275	1,30–2,75
Взрослые	200–320	2,00–3,20
Беременные	305	3,05

При дефиците железа в организме и снижении его уровня в сыворотке крови содержание трансферрина повышается. Такое разнонаправленное изменение этих показателей служит одним из наиболее важных признаков железодефицитной анемии. Подобные же изменения могут наблюдаться при беременности и в детском возрасте, но они менее выражены. Увеличение содержания трансферрина в этих случаях связано с усилением его синтеза для обеспечения повышенных потребностей организма в железе.

В то же время необходимо отметить, что трансферрин служит одним из «отрицательных» белков острой фазы, и при различных воспалительных заболеваниях его концентрация снижается, что может приводить к ошибкам в диагностике дефицита железа. Основными причинами сниженного содержания трансферрина в сыворотке крови считают торможение синтетических процессов в гепатоцитах при хроническом гепатите, циррозе печени, хронической нефропатии, голодании, неопластических процессах, а также значительную потерю белка при нефротическом синдроме или заболеваниях тонкой кишки.

Снижение содержания трансферрина и повышение концентрации железа в сыворотке обнаруживают при состояниях, характеризующих-

ся накоплением железа в организме (идиопатический гемохроматоз), или в случаях гипопластических, гемолитических и мегалобластических анемий, что считают следствием угнетения синтеза белка под влиянием высоких концентраций железа.

#### 12.9.2.4. ФЕРРИТИН В СЫВОРОТКЕ

Ферритин — основной белок человека, депонирующий железо. Он находится в клетках печени, селезенки, костного мозга и ретикулоцитах. В небольших количествах ферритин присутствует в сыворотке крови, где он выполняет функцию транспорта железа. Хотя в крови ферритин присутствует в небольших количествах, его концентрация в сыворотке отражает запасы железа в организме. Референтные величины содержания ферритина в сыворотке представлены в табл. 12.26. Низкие значения ферритина — первый показатель уменьшения запасов железа в организме. Определение ферритина в сыворотке крови используют для диагностики и мониторинга дефицита или избытка железа, дифференциальной диагностики анемий.

Таблица 12.26. Референтные величины содержания ферритина в сыворотке

Возраст	Содержание ферритина, нг/мл (мкг/л)
Новорожденные	25–200
1 мес	200–600
2–5 мес	50–200
6 мес–15 лет	7–140
Взрослые:	
мужчины	20–250
женщины	10–120

При железодефицитной анемии концентрация ферритина в сыворотке снижается, указывая на истощение запасов железа в организме. Однако ферритин относят к белкам «острой фазы», и его нормальная или повышенная концентрация не обязательно отражает запасы депонированного железа при воспалительных процессах или злокачественных опухолях в организме. Ферритин высвобождается из печени в кровь при всех заболеваниях, опухолях печени или метастазах в нее, при длительном злоупотреблении алкоголем либо при приеме оральных контрацептивов. В этих случаях диагностическая ценность определения только одного ферритина для диагностики железодефицитной анемии невелика.

Повышение содержания ферритина в сыворотке крови может быть выявлено при избыточном содержании железа (например, при гемохроматозе уровень ферритина выше 500 мкг/л) при некоторых заболеваниях печени, воспалительных процессах (легочные инфекции, остеомиелит, артрит, системная красная волчанка, ожоги), острых и хронических заболеваниях с поражением печеночных клеток (алкогольное поражение печени, гепатит), раке молочной железы, остром миелобластном и лимфобластном лейкозе, лимфогранулематозе.

### 12.9.3. СОСТОЯНИЯ, СВЯЗАННЫЕ С НЕДОСТАТКОМ И ИЗБЫТКОМ ЖЕЛЕЗА В ОРГАНИЗМЕ

Дефицит железа — широко распространенное состояние, связанное с несбалансированным питанием. Дефицит железа приводит к увеличению заболеваемости, снижению работоспособности и качества жизни. Формы клинических проявлений железodefицитных состояний разнообразны и варьируют от латентных состояний до тяжелых прогрессирующих заболеваний, способных привести к типичным органным и тканевым повреждениям и даже летальному исходу. Диагностика анемий включает данные осмотра и физикального обследования, а также лабораторные исследования. В настоящее время общепринято, что диагноз железodefицитных состояний клиницист обязан установить до развития полной картины заболевания, то есть до возникновения гипохромной анемии. При железodefиците страдает весь организм, а гипохромная анемия — поздняя стадия болезни.

Как правило, железodefицитные состояния встречаются у детей, молодых женщин и пожилых людей, а также они сопровождают различные хронические заболевания.

Причины, приводящие к развитию дефицита железа, многочисленны. В связи с этим необходимо использовать целый комплекс лабораторных показателей, позволяющих установить истинную причину железodefицитных состояний и выработать обоснованную стратегию лечения, главная цель которого — устранение дефицита железа в организме больного.

Состояния, связанные с отклонением показателей обмена железа в организме:

- железodefицитная анемия;
- хронические инфекции и воспаления;
- избыток железа в организме.

Клинические проявления зависят от этиологии, выраженности и скорости развития анемии. Сопутствующие заболевания, в частности

болезни сердца и легких, усугубляют тяжесть анемии. Как правило, при уровне гемоглобина  $<70$  г/л появляются признаки тканевой гипоксии (утомляемость, головная боль, одышка, головокружение, стенокардия). При тяжелой анемии отмечают бледность и компенсаторную тахикардию. Даже тяжелая анемия может хорошо переноситься, если она развивается постепенно.

### 12.9.3.1. ЖЕЛЕЗОДЕФИЦИТНАЯ АНЕМИЯ

Среди различных анемических состояний железodefицитные анемии — самые распространенные, составляют около 80% всех анемий. Железодефицитная анемия развивается при:

- недостаточном поступлении железа с пищей;
- нарушении всасывания железа вследствие заболеваний желудочно-кишечного тракта;
- кровопотерях;
- состояниях, когда увеличивается потребление железа (например, беременность или период роста организма).

Недостаточное поступление железа с пищей — довольно распространенная причина дефицита железа у нас в стране. Низкая доля продуктов животного происхождения в рационе приводит к недостаточному поступлению железа. В результате в организме человека возникает отрицательный баланс железа (потери преобладают на поступлением), который, если он сохраняется в течение длительного времени, приводит к развитию недостаточности железа и железodefицитной анемии.

Эритроциты содержат 70% общего количества железа, поэтому кровотечение (острое и хроническое) служит не менее частой причиной его дефицита, чем недостаточное поступление с пищей. Например, нормальные менструальные кровотечения связаны с потерей около 15 мг железа каждый месяц, так что здоровая женщина в это время теряет в среднем 1,5–2 мг/сут железа. Для возмещения потерь и поддержания нормальных запасов железа женщина должна восполнять во время менструаций такое же его количество. Если этого не происходит, то со временем развивается железodefицитная анемия. Хроническая кровопотеря — самая частая причина железodefицитной анемии у взрослых (составляет около 80% всех случаев анемии). У женщин в пременопаузе обильные менструальные кровотечения приводят к дефициту железа.

Вслед за менструальной кровопотерей вторая ведущая причина дефицита железа у взрослых — кровопотеря через желудочно-кишечный тракт. Хроническое кровотечение из желудочно-кишечного тракта — клиническое проявление многих широко распространенных

заболеваний, включая язвенный колит, язвенную болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки, цирроз печени, рак желудка и толстой кишки. Длительный прием нестероидных противовоспалительных препаратов [ацетилсалициловой кислоты (Аспирин<sup>®</sup>), диклофенака (Вольтарен<sup>®</sup>)] связан с высоким риском хронической кровопотери через изъязвленную слизистую оболочку желудка. Трудности своевременной диагностики анемии у таких больных обусловлены тем, что в большинстве случаев желудочно-кишечного кровотечения кровь теряется незаметно для пациента, выделяясь с калом. Гинекологические заболевания, такие как эндометриоз и фибромиома матки (сопровождаются хроническими кровотечениями), — довольно распространенная причина анемии у женщин. Пока запасы железа в тканях сохраняются, дефицит его не развивается. Даже единичный случай тяжелой кровопотери не вызовет дефицита железа. Однако продолжительная или регулярная кровопотеря небольших количеств крови в течение длительного периода медленно истощает запасы железа в организме пациента.

Беременность сопровождается повышенной физиологической потребностью растущего плода в железе так же, как и интенсивный рост, кормление грудью, занятие спортом. При неадекватном поступлении железа с пищей у таких пациентов может развиваться железодефицитная анемия.

Необходимо придерживаться четкого правила: во всех случаях железодефицитной анемии следует установить ее причину. Это обусловлено тем, что железодефицитная анемия может быть клиническим симптомом серьезных заболеваний желудочно-кишечного тракта или органов репродуктивной системы у женщин.

Ранних клинических симптомов дефицита железа не существует, а признаки анемии возникают только после истощения запасов железа в организме. Клинические проявления анемии разнообразны и варьируют от невыраженных (общая слабость, недомогание, снижение работоспособности, извращение вкуса, сухость и пощипывание языка, нарушение глотания с ощущением инородного тела в горле, сердцебиение, одышка) до тяжелых прогрессирующих состояний, способных привести к типичным органным и тканевым повреждениям и даже летальному исходу. Диагноз железодефицитных состояний необходимо установить до развития полной картины заболевания — железодефицитной анемии. Лабораторные исследования позволяют практически решить эту задачу. Типичные изменения в результатах лабораторных анализов при различных степенях дефицита железа в организме человека приведены в табл. 12.27.



Таблица 12.27. Критерии диагностики дефицита железа

Показатели	Норма	Латентный дефицит железа	Железодефицитная анемия
Гемоглобин (г/л): мужчины женщины	130–160 120–150	>130 >120	<130 <120
Сывороточное железо (мкмоль/л): мужчины женщины	11,6–31,3 9,0–30,4	<7,5 <6,0	<7,5 <6,0
ОЖСС, ммоль/л	44,75–71,60	>71,60	>71,60
Ферритин (мкг/л): мужчины женщины	20–250 10–120	<40 <20	<12 <10

При латентном дефиците железа у пациентов отсутствуют какие-либо симптомы, уровень гемоглобина находится в пределах нормы. Уровень ферритина в сыворотке крови снижен, а содержание железа снижено или может находиться на нижней границе нормы. Железодефицитная анемия отражает истощение запасов железа в организме больного. Больные с железодефицитной анемией могут иметь специфические клинические симптомы, включающие глоссит (воспаление языка), стоматит (изъязвление губ в углах рта) и изменения ногтей (необычайно легкая ломкость). Содержание ферритина в сыворотке и насыщение трансферрина находятся на очень низком уровне. К другим лабораторным признакам относят низкий уровень железа в сыворотке, повышение ОЖСС и низкую концентрацию гемоглобина в крови.

### 12.9.3.2. АНЕМИЯ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Многие больные с хроническими заболеваниями могут страдать легкой или умеренной анемией. Обычно уровень гемоглобина у таких больных не падает ниже 90 г/л. Анемия может сопровождать болезни:

- инфекционные (туберкулез, бактериальный эндокардит, пневмонию);
- воспалительные (ревматоидный артрит, системную красную волчанку, болезнь Крона);
- онкологические;
- хроническую почечную недостаточность.

Анемия при хронических заболеваниях занимает 2-е место по распространенности после железодефицитной и характеризуется чаще нормальными или увеличенными запасами железа в организме. Механизм развития анемии при хронических заболеваниях обусловлен активацией иммунной системы и повышением концентрации воспалительных цитокинов в крови. Воспалительные цитокины оказывают ряд эффектов, которые приводят к развитию анемии:

- подавляют синтез эритропоэтина и чувствительность эритроидных клеток-предшественников к его стимулирующему воздействию;
- оказывают эффект, противоположный эритропоэтину, на эритроидные клетки-предшественники;
- стимулируют гибель эритроидных клеток-предшественников.

Уровень железа в сыворотке крови у больных с анемией при хронических заболеваниях обычно снижен, как при железодефицитной анемии. Однако ОЖСС понижена, а уровень ферритина в сыворотке крови нормальный или даже повышен. Поскольку дефицит железа у пациентов отсутствует, назначение препаратов железа в этих случаях больному не оправдано и даже может быть вредно, так как повышает риск накопления избытка железа. Лечение у таких больных должно быть направлено на устранение основного заболевания. При его эффективности анемия постепенно исчезает.

### 12.9.3.3. ИЗБЫТОЧНОЕ НАКОПЛЕНИЕ ЖЕЛЕЗА

У здорового человека все железо связано с белками. Гемоглобин связывает железо в эритроцитах, ферритин — в тканях, трансферритин — в плазме крови. В таком состоянии оно нетоксично. Однако свободное (несвязанное) железо оказывает токсическое и повреждающее действие на ткани. Количество белков, связывающих железо и защищающих ткани в организме человека, ограничено. Как только они насыщаются железом, любое избыточное поступление или образование его внутри организма приводит к накоплению избытка в органах в свободном (токсическом) состоянии. При хронической перегрузке организма железом возрастает образование высокоактивных свободных радикалов, которые повреждают нормальные структуры клетки и нарушают их функции. Кроме того, стимулируется синтез коллагена и формирование фиброза в органах и тканях. Наиболее часто повреждаются поджелудочная железа (развитие фиброза и затем сахарного диабета), печень (развитие цирроза и печеночной недостаточности, рака печени), сердце (развитие аритмий, сердечной недостаточности),

гонады (развитие импотенции) и суставы (сильные суставные боли и развитие артрита).

К синдромам избыточного накопления железа относят врожденный и парентеральный гемохроматоз (парентеральная перегрузка железом).

Врожденный гемохроматоз представляет собой наследственное заболевание, характеризуемое увеличением всасывания железа в кишке и отложением его в паренхиматозных клетках печени, сердца, поджелудочной железы и других эндокринных желез. У больных гемохроматозом в день из пищи всасывается 3–4 мг железа вместо 1–2 мг, как у здоровых людей. У человека не существует механизмов, усиливающих выведение железа из организма, поэтому оно накапливается со скоростью 0,5–1 г в год. В среднем возрасте, когда обнаруживаются первые клинические проявления избыточного накопления железа, его общее количество может составлять 20–40 г вместо нормальных 4–5 г. Это заболевание обычно плохо диагностируют. Именно поэтому всех пациентов с заболеваниями печени необходимо обследовать на гемохроматоз (то есть назначить исследование показателей, отражающих величину запасов железа в организме), если нет другой очевидной причины их заболевания. Необходимо также проводить скрининговое обследование на гемохроматоз мужчин, у которых в среднем возрасте развивается сахарный диабет. Основным методом лечения наследственного гемохроматоза считают повторные кровопускания.

Парентеральный гемохроматоз развивается у пациентов, которым вводят избыточное количество железа парентерально (при переливании эритроцитарной массы или железа с декстраном). Одна стандартная единица переливаемой крови содержит около 250 мг железа в эритроцитах, что более чем в 100 раз перекрывает суточную потребность. Больные с талассемией и серповидноклеточной анемией, которым долгое время переливают кровь, особенно подвержены риску перегрузки железом. Пациентам с не железододефицитной анемией могут ошибочно назначаться препараты железа. Поскольку любая анемия, независимо от причины, сама по себе способствует повышению всасывания железа в кишечнике, назначение таким больным препаратов железа может привести к перегрузке им организма.

У пациентов с избытком железа результаты анализов крови противоположны тем, которые наблюдают при его дефиците. В сыворотке крови определяют:

- повышение уровня железа;
- снижение ОЖСС;
- повышение уровня ферритина.

### 12.9.4. ФУНКЦИИ И МЕТАБОЛИЗМ ВИТАМИНА $B_{12}$ И ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ

К витаминам относят различные по химическому строению вещества с высокой биологической активностью, которые незаменимы для организма и в ничтожно малых количествах играют важнейшую роль в процессах его жизнедеятельности. Они не могут синтезироваться в организме человека, и единственный их источник — пища. Большинство витаминов служат составной частью ферментов, что определяет их активное участие во всех жизненных функциях организма.

Из множества витаминов важнейшую роль в развитии одной из форм анемии (мегалобластной) играет дефицит витамина  $B_{12}$  и фолиевой кислоты. Эти витамины необходимы для процессов нормального созревания эритроцитов. Витамин  $B_{12}$  (цианокобаламин) выполняет функцию кофермента при синтезе нуклеиновых кислот — ДНК и РНК и метионина из гомоцистеина. Метионин необходим для превращения фолиевой кислоты в фолиновую, которая обеспечивает нормобластический тип кроветворения. Кроме того, витамин  $B_{12}$  обеспечивает синтез липопротеинов в миелиновой ткани нервной системы. Именно поэтому дефицит витамина  $B_{12}$  сопровождается развитием мегалобластической анемии, нейтропении и неврологических расстройств (фуникулярный миелоз). Иммунодефицит при недостаточности витамина  $B_{12}$  связан с образованием гиперсегментированных нейтрофилов, отличающихся сниженной активностью, кислородозависимого механизма бактерицидности, который необходим для уничтожения внутриклеточных бактерий и вирусов.

Основным источником витамина служат пищевые продукты животного происхождения: говяжья печень, рыба, продукты моря, мясо, молоко, сыры. В растениях витамин  $B_{12}$  не встречаются, так как они не способны его синтезировать.

Суточная потребность взрослого человека в витамине  $B_{12}$  равна 3 мкг; беременных и кормящих женщин — 4 мкг; детей 1-го года жизни — 0,3–2 мкг. Обычно запасов витамина  $B_{12}$  в печени человека вполне достаточно, чтобы предохранить от развития авитаминоза в течение 1–2 лет. Здоровый организм способен вырабатывать этот витамин самостоятельно.

Фолиевая кислота — водорастворимый витамин группы В. Она необходима для поддержания нормального эритропоэза, синтеза нуклеопротеинов, размножения клеток, обеспечения свертываемости крови, предупреждения атеросклероза. Организм человека обеспечивается фолиевой кислотой за счет ее эндогенного синтеза микрофлорой кишечника и употребления с пищей. Этот витамин всасывается после

гидролиза, восстановления и метилирования в желудочно-кишечном тракте. Среднесуточное потребление обычно составляет 500–700 мкг/сут фолатов. Из этого количества 50–200 мкг фолатов обычно всасывается в желудочно-кишечном тракте в зависимости от метаболической потребности (у беременных до 300–400 мкг). В организме фолиевая кислота восстанавливается до тетрагидрофолиевой кислоты (для этого необходимо присутствие витамина  $B_{12}$ ), служащей коферментом, который участвует в различных метаболических процессах. Обычно от 5 до 20 мг (до 75%) фолатов накапливается в печени и других тканях. Фолаты выводятся из организма с мочой и калом, а также подвергаются метаболизму, поэтому их уровень в сыворотке крови снижается в течение нескольких дней после прекращения поступления с пищей.

Основными источниками фолатов для человека служат дрожжи, капуста, морковь, помидоры, грибы, салат, шпинат, лук, печень, почки, яичный желток, сыр. Суточная потребность взрослого человека в фолиевой кислоте составляет 200 мкг. Она увеличивается при беременности, в период кормления грудью, при тяжелом физическом труде, недостатке белка в рационе, приеме больших доз витамина С (2 г и более).

Для ткани костного мозга характерно постоянное деление и быстрое обновление клеток. Эти процессы сильно зависят от нормального синтеза ДНК и, следовательно, от наличия витамина  $B_{12}$  и фолиевой кислоты. Продукция клеток крови в костном мозге продолжается на протяжении всей жизни, и для постоянного обеспечения этого процесса необходимо адекватное поступление витамина  $B_{12}$  и фолиевой кислоты в организм человека. Как указывалось выше, основным источником этих витаминов — пища. Однако важнейшим этапом поступления витамина  $B_{12}$  и фолиевой кислоты в организм человека является их всасывание в желудочно-кишечном тракте. Это достаточно сложный процесс, особенно в отношении витамина  $B_{12}$ , и его нарушение служит основной причиной дефицита витаминов в организме человека и развития мегалобластной анемии.

Наличие секреции соляной кислоты слизистой оболочкой желудка (кислая среда желудка) важно для высвобождения витамина  $B_{12}$  из пищи до его всасывания в дистальных отделах подвздошной кишки. Однако оно возможно только после связывания витамина  $B_{12}$  с внутренним фактором — белком, секретлируемым клетками слизистой оболочки желудка. Всосавшийся в кровь витамин доставляется в костный мозг и другие ткани специфическим белком-переносчиком — транс-кобаламином. Именно поэтому нормальное воспроизводство эритроцитов в костном мозге зависит от следующих факторов:

- достаточного содержания витамина  $B_{12}$  в пище;
- секреции соляной кислоты и внутреннего фактора в желудке;

- нормального всасывания в тонкой кишке;
- наличия в плазме транскобаламина в достаточном количестве.

Кроме того, необходимо иметь в виду, что витамин  $B_{12}$  используется для роста некоторыми бактериями кишечника, которые препятствуют всасыванию этого витамина, конкурируя за него с клетками кишечника. Именно поэтому на всасывание витамина  $B_{12}$  может влиять и характер микрофлоры кишечника (при дисбактериозе кишечника всасывание нарушается).

Организм способен сохранять в печени большие запасы витамина  $B_{12}$ , достаточные для поддержания нормального производства эритроцитов в течение нескольких лет (1–2 года) при отсутствии этого витамина в пище. Поэтому мегалобластная анемия — довольно позднее проявление дефицита витамина  $B_{12}$  в организме. Референтные величины содержания витамина  $B_{12}$  в сыворотке крови у новорожденных — 160–1300 пг/мл, у взрослых — 200–835 пг/мл (средние значения 300–400 пг/мл).

Всасывание фолиевой кислоты происходит в верхних отделах тонкой кишки, и затем она доставляется кровью к костному мозгу и другим тканям в свободной форме или в связи с альбумином. Следовательно, и перечень факторов, способных повлиять на поступление фолиевой кислоты в организм, ограничивается содержанием витамина в пище и состоянием функции тонкой кишки, обеспечивающей его всасывание. Как и витамин  $B_{12}$ , фолиевая кислота запасается главным образом в печени. Однако этих запасов хватает только на несколько месяцев. Референтные величины содержания фолиевой кислоты у взрослых в сыворотке крови составляют 7–45 нмоль/л (3–20 нг/мл), в эритроцитах — 376–1450 нмоль/л (166–640 нг/мл).

### 12.9.5. СОСТОЯНИЯ, СВЯЗАННЫЕ С НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ ВИТАМИНА $B_{12}$ И ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ В ОРГАНИЗМЕ

Витамин  $B_{12}$  и фолиевая кислота участвуют в синтезе гемоглобина и процессах кроветворения, поддерживают обновление миелина в ткани нервной системы. Они необходимы для нормального синтеза ДНК, поэтому незаменимы в тканях и органах с активным обновлением и делением клеток, таких как костный мозг и слизистая оболочка желудочно-кишечного тракта. Дефицит витамина  $B_{12}$  и фолиевой кислоты характеризуется поражением кроветворной ткани, пищеварительной и нервной системы. Клинически наиболее ярко все эти изменения проявляются при развитии заболевания, обусловленного дефицитом витамина  $B_{12}$  и фолиевой кислоты, — мегалобластной анемии.

### 12.9.5.1. МЕГАЛОБЛАСТНАЯ АНЕМИЯ

Термин «мегалобластная анемия» объединяет группу анемий, в основе которых лежит нарушение синтеза ДНК в клетках костного мозга. Эти нарушения приводят к образованию крупных эритробластов (мегалобластов — предшественников эритроцитов), многие из которых не созревают и подвергаются разрушению в костном мозге. Следствием этого служит заметное снижение количества эритроцитов в циркулирующей крови и развитие анемии. Эритроциты, которые все же созревают и поступают в кровь, крупнее нормальных, поэтому их часто называют макроцитами. Соответственно нередко в качестве синонима мегалобластной анемии используют термин «макроцитарная анемия». В действительности, если строго подходить к сущности этих терминов, это не синонимы. Поскольку синтез нуклеиновых кислот нарушается во всех костномозговых клетках, частые признаки болезни — уменьшение числа тромбоцитов, лейкоцитов, увеличение числа сегментов в гранулоцитах. В подавляющем большинстве случаев (более 90% случаев) причиной мегалобластной анемии служит дефицит витамина  $B_{12}$  и фолиевой кислоты в организме человека. Дефицит этих витаминов может быть как отдельным, так и совместным.

Причины дефицита витамина  $B_{12}$  и/или фолиевой кислоты:

- недостаточное поступление витаминов с пищей;
- нарушение всасывания витамина  $B_{12}$  вследствие недостаточного образования внутреннего фактора в слизистой оболочке желудка;
- нарушение всасывания витамина  $B_{12}$  и/или фолиевой кислоты при заболеваниях желудочно-кишечного тракта;
- повышенная потребность организма в витамине  $B_{12}$  и фолиевой кислоте во время беременности.

Недостаточное поступление витамина  $B_{12}$  с пищей встречается редко — в основном у лиц пожилого возраста и придерживающихся строгого вегетарианства. Недостаток фолиевой кислоты в пище — распространенное явление. Это самая частая причина ее дефицита в организме человека. В целом дефицит фолиевой кислоты — самый распространенный среди нехватки различных витаминов. Фолиевая кислота легко разрушается при термической обработке пищи, в результате ее поступление в организм становится минимальным. Сниженное потребление фолиевой кислоты с пищей часто встречаются у хронических алкоголиков, а отрицательное влияние алкоголя на ее метаболизм усугубляет дефицит этого витамина. Недостаточное поступление фолиевой кислоты с пищей часто встречаются у пожилых людей. Именно поэтому всех пожилых людей следует рассматривать как группу риска по дефициту этого витамина.

Самая распространенная причина дефицита витамина  $B_{12}$  в нашей стране — нарушение его всасывания из-за недостатка внутреннего фактора. Это особый тип анемии. Раньше, до открытия витамина  $B_{12}$ , эту форму анемии называли пернициозной (злокачественной), так как без использования в пищу сырой печени или парентерального введения витамина  $B_{12}$  больные не выживали. Пациенты с пернициозной анемией не способны синтезировать внутренний фактор вследствие повреждения клеток слизистой оболочки желудка, вырабатывающих этот фактор, аутоантителами к ним. Пернициозной анемией чаще страдают женщины среднего и пожилого возраста. Таким пациентам витамин  $B_{12}$  следует вводить в виде инъекций, так как принятый внутрь он не может всосаться. Поступление фолиевой кислоты с пищей у пациентов с пернициозной анемией не нарушается.

Пернициозная анемия может развиваться после тотальной гастрэктомии (когда полностью ликвидируется секреция внутреннего фактора). Однако клинически она проявляется после операции только через 5—8 лет и более. В течение этого срока больные живут запасами витамина в печени при минимальном пополнении его за счет незначительного всасывания в тонкой кишке не соединенного с внутренним фактором витамина. Одной из причин нарушенного синтеза внутреннего фактора может быть хроническая алкогольная интоксикация, когда она сопровождается токсическим поражением слизистой оболочки желудка.

Тяжелые клинические формы дефицита витамина  $B_{12}$  и фолиевой кислоты возникают при нарушениях их всасывания в тонкой кишке вследствие осложнений после оперативных вмешательств (особенно резекций) на кишечнике, прогрессирующего течения энтерита, болезни Крона. Дисбактериоз кишечника как причина дефицита витамина  $B_{12}$  все чаще встречается в клинической практике. Весьма редкой причиной дефицита служит нарушение всасывания витамина в тонкой кишке при инвазии широким лентецом, когда паразит поглощает большое количество витамина  $B_{12}$ .

Относительная недостаточность витамина  $B_{12}$  и фолиевой кислоты может возникать при беременности вследствие повышенной потребности организма в этих витаминах.

Дефицит фолиевой кислоты наблюдается при гипертиреозе у детей, цинге, дефиците витамина С, заболеваниях печени, язвенном колите, злокачественных новообразованиях, миелопролиферативных заболеваниях, сепсисе, гемолитической анемии, острых воспалительных заболеваниях (особенно кожи). Кроме того, недостаток фолиевой кислоты выявляют у некоторых беременных, недоношенных детей, при вскармливании детей козьим молоком.



Клиническая картина мегалобластной анемии характеризуется поражением кроветворной ткани, пищеварительной и нервной системы (дегенеративные изменения в спинном мозге). Отмечают резчайшую, как бы внезапно появившуюся слабость, снижение работоспособности, головокружение. Кожа больных иногда слегка желтушна, в сыворотке крови увеличен уровень непрямого билирубина (за счет повышенной гибели гемоглобинсодержащих мегалобластов костного мозга). Определяются симптомы глоссита: «полированный» язык, ощущение жжения в нем. Желудочная секреция угнетена, часты диспептические явления, возможна стойкая ахлоргидрия (отсутствие секреции соляной кислоты). В связи с повышенным гемолизом увеличиваются селезенка и реже печень. Нередко наблюдают признаки глоссита — «полированный» язык, ощущение жжения в нем. Один из характерных признаков мегалобластной анемии — наличие неврологических симптомов нейропатии, которые включают:

- парестезии — аномальную чувствительность кожи, которая наиболее часто проявляется покалыванием в пальцах рук и ног;
- затруднения при ходьбе;
- повышенную раздражительность;
- потерю памяти.

Эти признаки нейропатии более характерны для больных с дефицитом витамина  $B_{12}$ . При недостаточности фолиевой кислоты их встречают значительно реже.

При мегалобластной анемии в анализах крови — снижение числа эритроцитов, эритроциты очень крупные (более 12 мкм в диаметре), повышенное содержание гемоглобина в эритроците — гиперхромия, тромбоцитопения, лейкопения и появление полисегментированных нейтрофилов при подсчете лейкоцитарной формулы крови. Степень уменьшения числа клеток крови может быть различной, редко отмечают одновременное снижение уровня всех трех видов форменных элементов крови (эритроцитов, тромбоцитов и лейкоцитов).

Уровень витамина  $B_{12}$  в сыворотке крови обычно снижен при мегалобластной анемии. Нередко в клинической практике встречают случаи, когда у пациента имеются только неврологические симптомы дефицита витамина  $B_{12}$ , а другие признаки анемии отсутствуют. У таких больных уровень сывороточного витамина  $B_{12}$  также снижен. Уровень фолиевой кислоты в сыворотке крови у больных с изолированным дефицитом витамина  $B_{12}$  обычно в норме или даже повышен. Напротив, в эритроцитах содержание фолиевой кислоты в норме или снижено.

Поскольку запасы фолатов в организме ограничены, а суточная потребность высока, дефицит витамина и мегалобластная анемия могут

развиться через 1–6 мес после прекращения поступления фолиевой кислоты. Уровень фолиевой кислоты в эритроцитах служит лучшим показателем ее запасов в организме, чем содержание в сыворотке, так как не зависит от последнего поступления витамина с пищей. Для дефицита фолиевой кислоты характерна следующая последовательность событий:

- в течение первых 3 нед отмечают снижение уровня фолиевой кислоты в сыворотке крови;
- спустя примерно 11 нед от начала дефицита при исследовании мазка крови определяют гиперсегментацию ядер нейтрофилов, базофилов, эозинофилов (гиперсегментация служит хорошим показателем дефицита);
- несколько позже обнаруживают низкий уровень витамина в эритроцитах (17 нед);
- макрооцитария эритроцитов (18 нед);
- мегалобластный костный мозг (19 нед);
- развернутая клиническая картина мегалобластной анемии проявляется спустя 19–20 нед.

Содержание витамина  $B_{12}$  в сыворотке крови при мегалобластной анемии, обусловленной изолированным дефицитом фолиевой кислоты, остается в пределах нормы.

### 12.9.6. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЖЕЛЕЗА И ВИТАМИНОВ

Состояние обмена железа лучше всего характеризует количество негеминового (не связанного с гемоглобином) сывороточного железа и запасы железа в депо (в клетках печени, селезенки, костного мозга и ретикулоцитах). Показателем, объективно отражающим содержание сывороточного железа в организме пациента, служит концентрация железа в сыворотке крови, а запасы железа в депо — концентрация ферритина.

#### 12.9.6.1. Методы определения железа

В настоящее время в лабораторной практике используют большое число различных методов определения железа в сыворотке крови. Наиболее часто применяют фотометрические методы.

В основе фотометрических методов лежит способность железа образовывать комплексы с рядом хелатирующих соединений. Однако железо в сыворотке крови находится не в свободном виде, а связано в основном с белком трансферрином и в незначительном количестве с ферритином. Именно поэтому методически определение концентрации железа в сыворотке крови происходит в три этапа.

На I этапе необходимо добиться диссоциации железа из комплекса с трансферрином, что достигается снижением рН. Прочность комплекса трансферрин—железо максимальна при рН 7,0. При увеличении кислотности комплекс трансферрин—железо распадается. Другие соединения, например гемоглобин, в этих условиях не разрушаются или разрушаются лишь незначительно, не оказывая существенного влияния на результат анализа.

На II этапе происходит восстановление иона железа из  $Fe^{3+}$  в  $Fe^{2+}$  (с помощью гидразина, меркаптоацетата, сульфита, гидроксиламина, тиогликолевой и аскорбиновой кислоты).

На III этапе восстановленное железо взаимодействует с комплексом и происходит формирование окрашенного железо-хелатированного хромогенного комплекса.

В качестве комплексонов предложены ферен-В, феррозин, батофенантролин. Из множества реакций как на восстановленное, так и на окисленное железо лучшие результаты получаются с батофенантролином, который образует наиболее прочный и ярко окрашенный комплекс. Методы с батофенантролином имеют самый низкий коэффициент вариации — 3%.

В организме человека железо транспортируется белком трансферрином. Обычно приблизительно 35% транспортного белка связано с железом, то есть насыщено им. Это и есть связывающая способность трансферрина, а так как трансферрин — основной белок сыворотки, связывающий железо, то соответственно ее называют железосвязывающей способностью сыворотки. Насытившись железом приблизительно на треть (в среднем 35%), на трансферрине остается еще много свободного места (60—70%). Эти неиспользованные возможности транспортного белка называют ненасыщенной или латентной железосвязывающей способностью сыворотки.

ОЖСС — максимальное количество железа, которое может присоединить трансферрин до своего полного насыщения. ОЖСС устанавливают как сумму показателей — сывороточное железо и НЖСС (латентная).

В настоящее время для определения показателей ОЖСС и НЖСС используют два основных методологических подхода.

- **Метод предварительного насыщения трансферрина ионами железа.** В исследуемую сыворотку добавляют известное избыточное количество ионов трехвалентного железа, которые специфически связываются с белками сыворотки. При этом весь трансферрин насыщается железом. Избыток железа (которое не связалось с трансферрином) удаляют путем добавления в реакционную

смесь сорбента — магния карбоната ( $MgCO_3$ ). Затем в надосадочной жидкости определяют содержание железа с батофенантролином или другим хромогенным субстратом. Разница между добавленным к сыворотке известным количеством железа и определенным в виде железо-хромогенного комплекса соответствует НЖСС. ОЖСС определяют как сумму НЖСС и количества железа в сыворотке.

- **Добавление к сыворотке известного количества ионов железа в щелочной среде.** Внесенные ионы железа соединяются с трансферрином в свободных местах связывания. Излишек несвязанных ионов железа определяется характерной реакцией (например, с феррозином). Разница между количеством добавленных и оставшихся ионов представляет собой НЖСС. ОЖСС — сумма содержания железа в сыворотке и НЖСС.

Используя результаты, полученные при определении железа сыворотки крови и ОЖСС, можно найти значения коэффициента насыщения трансферрина железом (процентное содержание Fe в ОЖСС):

$$\text{коэффициент насыщения} = (\text{железо сыворотки} / \text{ОЖСС}) \times 100.$$

У здоровых лиц коэффициент насыщения находится в диапазоне от 16 до 47% (среднее значение — 31,5%).

### 12.9.6.2. Методы определения трансферрина и ферритина

Исследование уровня трансферрина несет немного полезной клинической информации. Именно поэтому наиболее часто его концентрацию оценивают косвенно по НЖСС, которую определяют с помощью насыщения сыворотки избытком железа.

Для прямого измерения концентрации трансферрина применяют иммунохимические методы анализа с использованием специфических моноклональных антител к человеческому трансферрину. Иммунотурбидиметрия — один из таких методов анализа, который автоматизирован и применяется в лабораториях. При наличии в сыворотке трансферрина внесенные в реакционную смесь антитела специфически свяжутся с ним, сформируют иммунные комплексы, и в результате появится мутная суспензия, оптическую абсорбцию которой измеряют фотометрически. Величина оптической абсорбции зависит от содержания трансферрина в сыворотке пробы.

Результаты определения концентрации ферритина играют важнейшую роль в диагностике железодефицитных состояний и оценке эффективности их лечения. Разработано большое количество иммунохимических методов для определения концентрации ферритина на основе

следующих принципов анализа: иммунотурбидиметрии, радиоиммунного, иммуноферментного и флуоресцентного иммунного анализа.

При использовании метода иммунотурбидиметрии моноклональные антитела к ферритину нанесены на латексные частицы. При взаимодействии ферритина с моноклональными антителами происходит их агглютинация. Выраженность ее определяют по изменению оптической абсорбции пробы, степень которой пропорциональна концентрации ферритина в пробе.

В радиоиммунном анализе для измерения концентрации ферритина используют антитела, меченные радиоактивным йодом, которые добавляют в пробу сыворотки. В результате иммунной реакции антител с ферритином сыворотки непрореагировавшие с ферритином меченые антитела удаляют. Затем на  $\gamma$ -счетчике измеряют радиоактивность антител в составе иммунного комплекса антитело–ферритин. Измеренная радиоактивность пропорциональна количеству ферритина в сыворотке пробы.

В настоящее время для определения ферритина стали широко применять иммуноферментный твердофазный анализ (ИФА) и иммунохемилюминесцентный с использованием антител, содержащих ферментную либо флуоресцентную метку.

### 12.9.6.3. Методы определения витамина $B_{12}$ и фолиевой кислоты

Содержание витамина  $B_{12}$  и фолиевой кислоты в организме крайне незначительно, поэтому для их определения применяют только современные высокочувствительные методы анализа — радиоиммунный, ИФА, иммунофлуоресцентный, иммунохемилюминесцентный. Отличия в этих методах связаны с типом используемой метки и способом измерения результата на конечной стадии исследования.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ

1. Какие функции в организме выполняет железо?
2. Перечислите лабораторные показатели, характеризующие обмен железа.
3. Что отражает концентрация ферритина в крови?
4. Перечислите состояния, связанные с дефицитом железа.
5. Назовите причины железодефицитной анемии.
6. Опишите основные клинические проявления железодефицитной анемии.
7. Какова причина развития анемии при хронических заболеваниях?
8. Чем опасен избыток железа в организме?

9. К чему приводит дефицит в организме витамина  $B_{12}$  и фолиевой кислоты?
10. Перечислите причины недостаточности витамина  $B_{12}$  и фолиевой кислоты в организме.
11. Опишите основные клинические проявления мегалобластной анемии.
12. Назовите основные методы определения концентрации железа.
13. Назовите основные методы определения концентрации трансферрина и ферритина.
14. Какие методы используют для определения концентрации витамина  $B_{12}$  и фолиевой кислоты?

## 12.10. БИОХИМИЧЕСКИЕ АНАЛИЗАТОРЫ

Биохимические анализаторы — аналитические системы для проведения биохимических исследований. Они способны определять концентрацию электролитов, белков, ферментов, продуктов метаболизма, гормонов и других веществ в любых видах биологического материала. По степени автоматизации проведения исследований различают автоматические фотометры (спектрофотометры), полуавтоматические и автоматические биохимические анализаторы.

### 12.10.1. ТИПЫ БИОХИМИЧЕСКИХ АНАЛИЗАТОРОВ

Автоматические фотометры (спектрофотометры) позволяют регистрировать величины оптической абсорбции и производить элементарные математические расчеты с полученными величинами. Спектрофотометры подразделяют на одно- и многоканальные системы. Между собой их различают по наличию (или отсутствию) ряда дополнительных возможностей, таких как термостатирование пробы, вывод результатов анализа на дисплей или печатающее устройство и др. В таких фотометрах внесение проб и реагентов в кювету, управление процессом фотометрирования и калибровки производит специалист лаборатории вручную, и только представление данных анализа бывает автоматизировано. Именно поэтому такие методы анализа называют ручными. Примером такого программируемого фотометра-анализатора может служить приведенный на рис. 12.57 биохимический анализатор «БиАн». Он предназначен для определения концентрации веществ в жидких биологических пробах по измеренному значению оптической абсорбции в стандартных кварцевых и стеклянных кюветах или цилин-

дрических пробирках с длиной оптического пути 10 мм при проведении биохимических анализов кинетическим методом и по конечной точке.



Рис. 12.57. Автоматический фотометр «БиАн»

Главной отличительной чертой автоматических фотометров (спектрофотометров) от полуавтоматических биохимических анализаторов считают необходимость вручную вносить в измерительную кювету реакционную смесь, состоящую из пробы биологического материала и реактивов.

Полуавтоматические биохимические анализаторы требуют участия в работе с ними специалиста лаборатории, но сводят его функции к минимуму. Как и в автоматических фотометрах, специалист лаборатории смешивает реагенты и готовит пробы, но внесение их в кювету осуществляет сам анализатор. Для этого у него имеется специальное устройство с перистальтическим насосом, эластичными трубками и проточной кюветой (рис. 12.58).

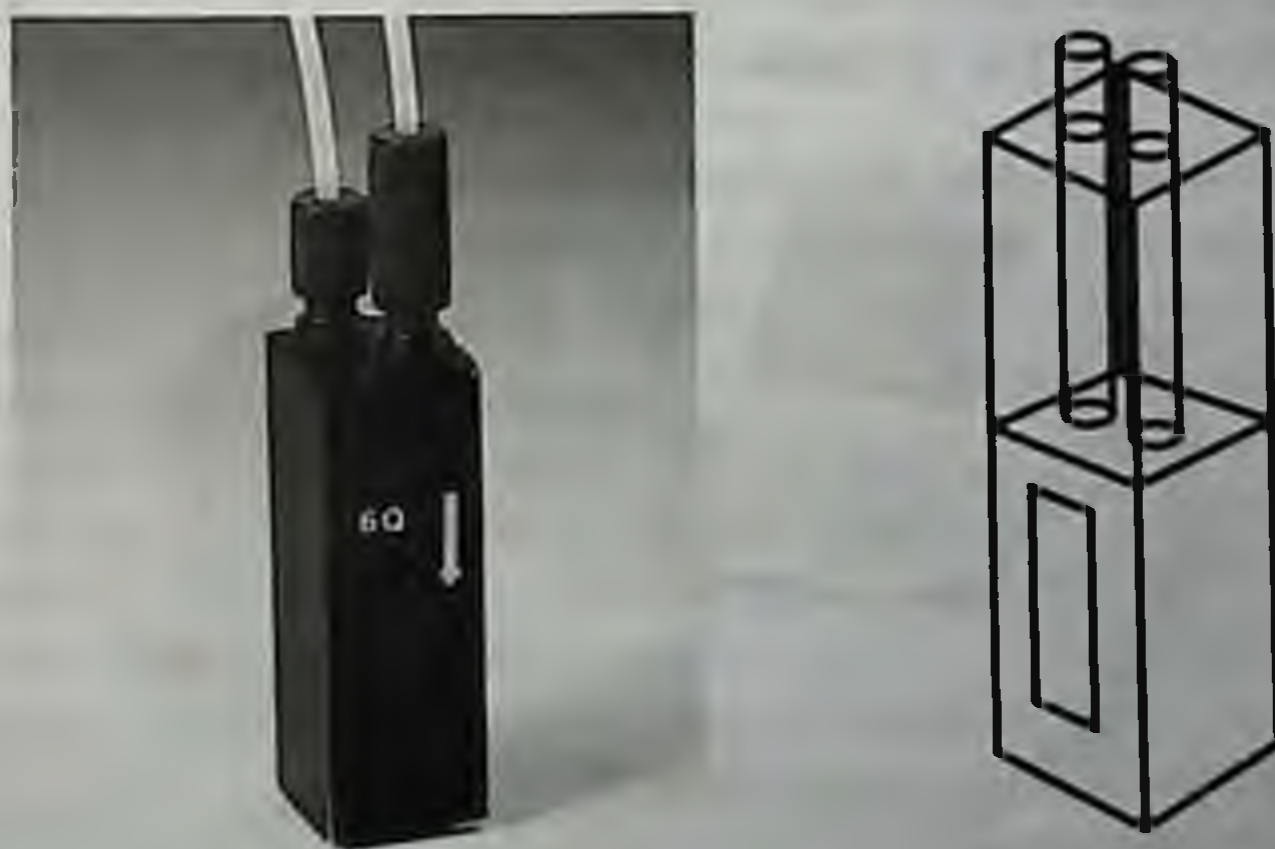


Рис. 12.58. Вид и схема проточной кюветы

Проточные кюветы имеют длину оптического пути 10 мм. С помощью перистальтического насоса в оптическую кювету по одному каналу через трубку поступает анализируемая реакционная смесь, а по другому каналу через другую трубку жидкость удаляется из кюветы. Трубка, по которой поступает жидкость в кювету, находится над уровнем жидкости в кювете, а трубка, по которой производится отбор жидкости из кюветы, находится на уровне жидкости дна кюветы. При этом производительность канала для откачки жидкости из кюветы должна быть больше производительности канала подачи жидкости в кювету. Техническим результатом служит обеспечение возможности хорошей промывки кюветы при поступлении в нее проб с сильно разнящимися концентрациями определяемого элемента, постоянного уровня жидкости в кювете и удаления пузырьков воздуха, которые всплывают на поверхность жидкости и не перекрывают световой поток при проведении измерений.

Термостатируемый кюветодержатель позволяет задавать необходимый диапазон температур для инкубации реагентов и протекания аналитической реакции.

В полуавтоматических биохимических анализаторах, как правило, имеется программное устройство, содержащее алгоритм фотометрирования по биохимическим методикам. Специалист лаборатории выбирает необходимый алгоритм и устанавливает исследуемый образец в прибор. Программное устройство автоматически выбирает спектральные диапазоны фотометрирования, последовательность измерений, временные интервалы измерений и т.д. При этом алгоритм предусматривает и процедуры калибровки с запоминанием калибровочных данных, автоматическим построением калибровочной кривой. Данные измерений могут быть представлены на устройствах индикации или распечатаны на встроенных принтерах (рис. 12.59).



Рис. 12.59. Полуавтоматический биохимический анализатор



Полностью автоматизированные биохимические анализаторы требуют минимального участия специалиста лаборатории, который задает алгоритм работы анализатора в соответствии с заявкой на лабораторные тесты. Все остальные действия по подготовке пробы (выбор и смешивание реагентов, расчет результатов и др.) осуществляются в автоматическом режиме. Автоматические биохимические анализаторы выполняют большой спектр операций: отбор материалов и реагентов, их смешивание и нагрев, анализ, обработку и печать полученной информации, автоматическое промывание анализатора, калибровку и контроль качества.

По своим функциональным возможностям все автоматические анализаторы можно условно разделить на три типа.

- Одноцелевые биохимические анализаторы, предназначенные для определения в анализируемой пробе лишь одного компонента биологической жидкости. Примером могут служить анализаторы глюкозы, гликированного гемоглобина, лактата, альбумина и др.
- Анализаторы для определения целевой группы компонентов, например группы показателей для диагностики неотложных состояний — исследования газов крови, электролитов.
- Многоцелевые биохимические анализаторы, предназначенные для определения содержания в биологических жидкостях большого количества различных по химической природе компонентов.

## 12.10.2. УСТРОЙСТВО АВТОМАТИЧЕСКИХ БИОХИМИЧЕСКИХ АНАЛИЗАТОРОВ

Многоцелевые автоматические биохимические анализаторы — самый распространенный и востребованный в лабораториях тип оборудования. Его устройство следующее.

Любой биохимический автоматический анализатор имеет 1 блок (или несколько) для размещения реагентов, проб, дозаторы (или 1 дозатор) для проб и реагентов и реакционный узел (рис. 12.60). Среди разнообразных конструкций блока реагентов чаще всего встречаются блок по типу «карусели» и реже линейный реагентный.

В реагентном блоке по типу «карусели» круговое расположение реагентов (см. рис. 12.60). В современных моделях биохимических анализаторов карусель охлаждается до 10–15 °С, что обеспечивает сохранность реагентов на протяжении всего срока годности.

Линейный реагентный блок представляет собой штатив или горизонтальную площадку с гнездами для емкостей с реагентами (рис. 12.61). Чаще всего реагенты хранятся при комнатной температуре.



Рис. 12.60. Основные узлы автоматического биохимического анализатора



Рис. 12.61. Линейный реагентный блок

Конструкция блока проб и реагентного (линейная или карусель) в ряде анализаторов аналогична. Однако карусельный тип встречается гораздо чаще, так как он имеет ряд преимуществ: возможность использовать первичные пробирки с кровью для установки непосредственно в карусель блока проб анализатора, размещения в нем дополнительных калибраторов или проб в процессе работы анализатора.

Реакционный узел представляет собой в простом варианте анализатора проточную кювету, в более сложных — термостатируемую платформу с реакционными кюветами, пробирками или планшетами, которые, в свою очередь, бывают одно- или многоразовыми. В случае использования многоразовых кювет реакционный блок дополнительно оснащен автоматическим моющим узлом. В высокопроизводительных биохимических анализаторах в качестве реакционного блока выступает многоразовый реакционный ротор (рис. 12.62), состоящий из определенного количества кювет, промывку и просушку которых выполняет сам анализатор.



Рис. 12.62. Многоходовый реакционный ротор биохимического анализатора

Фотометрическая система служит основой получения информации об определяемом компоненте, из которой компьютер с мощным программным обеспечением собирает необходимые данные. Для получения многопараметрической информации биохимические анализаторы оснащены, как правило, полихроматорами, которые позволяют одновременно регистрировать оптическую плотность исследуемых растворов на нескольких длинах волн.

Источник света (как правило, галогеновая лампа) находится внутри карусели с измерительными кюветами, в которых содержатся пробы для измерения. Карусель через фиксированные промежутки времени (примерно 20 с) совершает оборот, при котором все кюветы освещаются белым светом, проходящим через входную щель. Таким образом, каждые 20 с все кюветы, находящиеся на карусели, фотометрируются белым светом, причем часть из кювет может быть пустой или моется в этот период, тем не менее данные о них поступают в компьютер. Прошедший через кювету свет разлагается на решетке в спектр и измеряется серией (до 12 штук) детекторов, каждый из которых настроен на определенную длину спектра, включая измерение в УФ и ближнем инфракрасном диапазоне (полихроматор). Компьютер анализирует результаты измерений всех детекторов, представляет их в конечном виде. Кроме того, компьютер через соответствующие датчики контролирует работу практически всех узлов анализатора. Таким образом, в фотометрах и спектрофотометрах происходит селекция светового сигнала, отражающего концентрацию субстрата или активность фермента

в пробе. В биохимических анализаторах измеряются многократно многочисленные кюветы с пробами по нескольким спектральным характеристикам, а компьютер по заданной программе выбирает необходимые сигналы и на основе анализа их изменения рассчитывает концентрацию или активность аналитов. Типичная схема основных узлов фотометрического блока биохимического анализатора приведена на рис. 12.63.

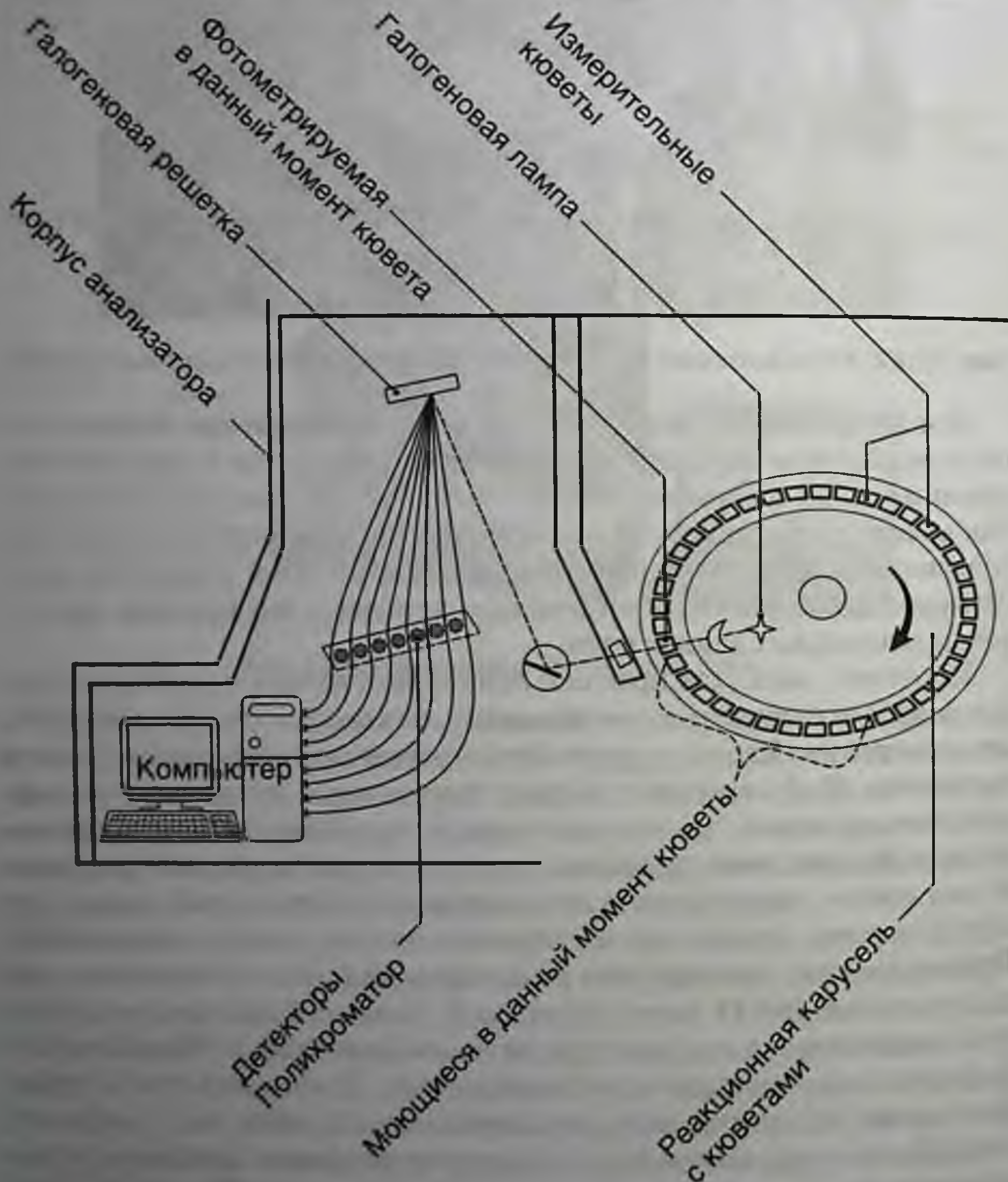


Рис. 12.63. Основные узлы фотометрического блока биохимического анализатора

Если объединить все основные блоки автоматического биохимического анализатора и пути прохождения анализируемой пробы, то его функционирование как единой системы можно представить в виде схемы, приведенной на рис. 12.64.

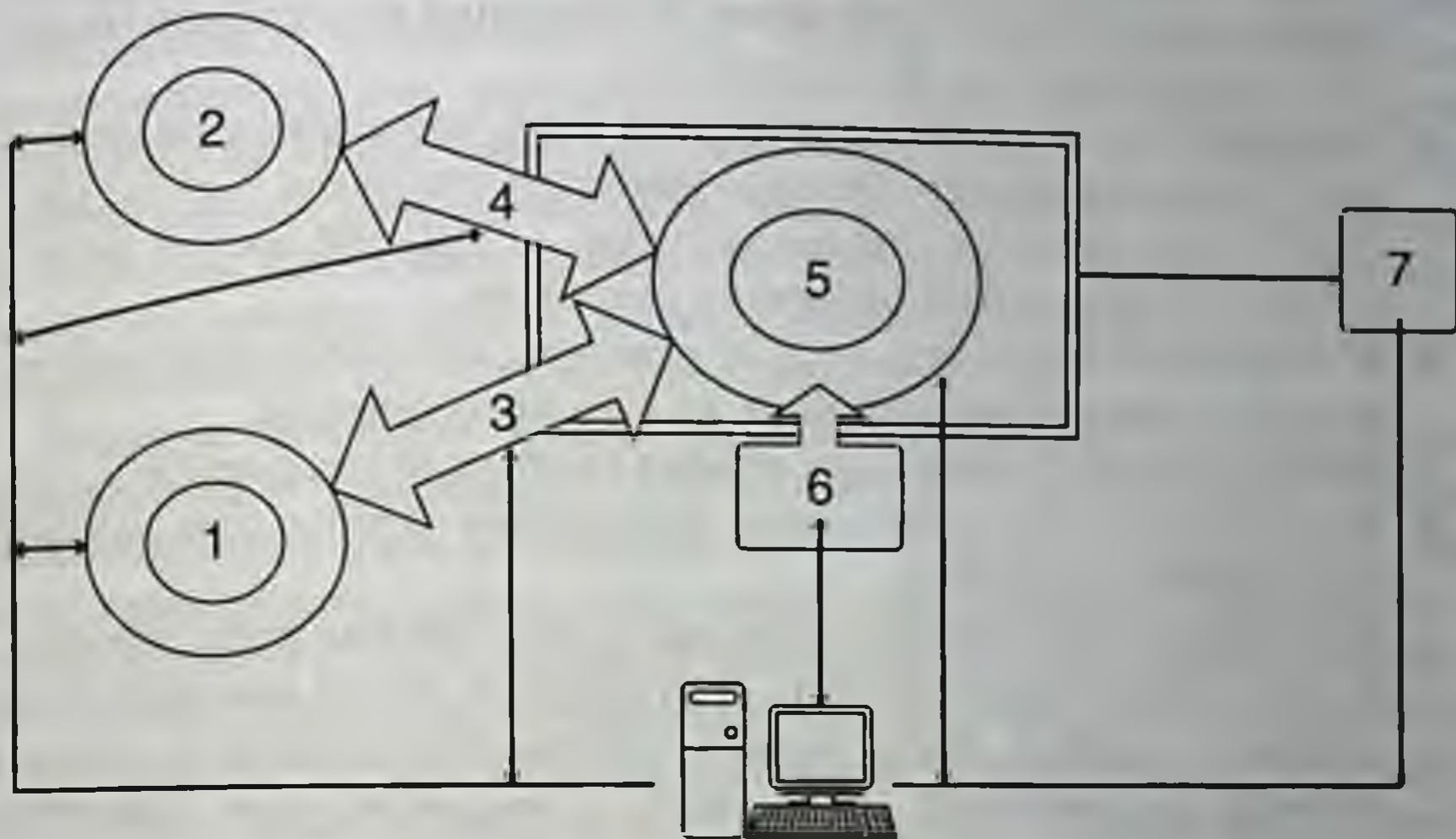


Рис. 12.64. Функционирование биохимического автоматического анализатора (объяснение в тексте)

Исследуемая проба загружается в карусель для проб (1). Реагенты, необходимые для определения назначенного врачом анализа, размещаются в карусели блока реагентов (2), откуда с помощью дозатора (4) переносятся в кювету реакционной карусели (5), где происходит ее термостатирование во встроенном термостате. В эту кювету с помощью дозатора (3) добавляется нужное количество пробы и происходит ее перемешивание. Если для определения анализа используется 2 реагента, то второй реагент добавляется после внесения пробы. Полученная реакционная смесь термостатируется определенное время (в зависимости от методики определения анализа) и затем подвергается фотометрии. В дальнейшем кювета после мойки и сушки с помощью моеющего узла (6) может использоваться для исследования другой пробы. Фотометрический сигнал поступает в регистрирующее устройство (7), а оттуда в компьютер для анализа и проведения расчетов. Программное обеспечение компьютера осуществляет синхронизацию (↔) работы всех узлов и блоков автоматического анализатора.

Основные преимущества автоматических биохимических анализаторов следующие.

- Широкий спектр определяемых веществ: метаболиты, ферменты, специфические белки, гормоны, электролиты, факторы свертывания крови, иммуноглобулины, чужеродные соединения (наркотики, лекарственные вещества и др.).
- Экономное расходование реагентов. При проведении исследования с использованием фотоколориметра требуется 3–4 мл реактива, на автоматическом анализаторе — 150–300 мкл (и менее); отсюда 15–20-кратная экономия реагентов.
- Возможность охлаждать жидкие реагенты «на борту» анализатора, что обеспечивает поддержание их высокого качества.
- Использование небольшого объема пробы для анализа (3–7 мкл).
- Возможность автоматического разведения пробы при высоких концентрациях аналита.
- Возможность внепланово выполнять неотложные исследования.
- Высокая производительность — от сотен до тысяч анализов в час.
- Гибкость в работе. Возможность использования разных методик анализа: по конечной точке, двух- и многоточечной кинетике, с привлечением технологии турбидиметрии (иммунонефелометрии), ионометрии, поляризационной флуориметрии и др.
- Наличие компьютера и программного обеспечения.
  - ◊ Встроенная программа контроля качества, в том числе:
    - оценка аналитической вариации с расчетом среднеквадратичного отклонения и коэффициента вариации на разных уровнях концентраций контрольных сывороток с иллюстрацией на графике Леви–Дженнингса;
    - определение процента отклонения от линейности в измерениях по кинетике, калибровка по эталону для нелинейных реакций;
    - контроль пригодности рабочих растворов реагентов по соответствию их оптической плотности значениям.
  - ◊ Возможность вносить в компьютерную память анализатора все необходимые параметры проведения биохимической реакции: сведения о длине волны, характере измерения, температурном режиме, значении эталона (или коэффициенте), контроле реактивов и пробы, продолжительности измерения, времени задержки, инкубационном периоде, объеме пробы и реагента и др.
  - ◊ Возможность архивировать данные (результаты анализа, сведения о больных).
  - ◊ Возможность передачи данных от анализаторов в лабораторную (ЛИС) и медицинскую информационную систему.

Помимо выраженных достоинств, каждый автоматический биохимический анализатор характеризуется определенными технико-аналитическими возможностями. По возможности применения для исследований реагентов условно различают биохимические анализаторы «открытого» и «закрытого» типа. Возможность программирования автоанализатора под реактивы разных фирм-производителей путем введения в программу компьютера всех необходимых параметров биохимической реакции — так называемый открытый тип биохимического анализатора. Когда конструкция анализатора или программное обеспечение не позволяет использовать в работе анализатора реагенты других производителей, это — анализатор закрытого типа.

Большое значение имеет производительность биохимического анализатора — определяют количеством анализов (тестов), которые способен выполнить анализатор за 1 ч работы (тестов в час). При этом производительность анализаторов оценивают по фотометрическим тестам, а если он оснащен ионоселективной приставкой (метод потенциометрии) для определения электролитов, то производительность ионоселективного блока оценивают отдельно, а затем приводят суммарную производительность анализатора (количество фотометрических тестов за 1 ч работы + количество ионоселективных тестов за 1 ч работы). Биохимические анализаторы различают по производительности:

- низкой — до 150 тестов в час;
- средней — до 400 тестов в час;
- высокой — 400–1200 тестов в час;
- высокоавтоматизированные системы — более 1200 тестов в час.

Среди других технико-аналитических возможностей биохимических анализаторов следует обратить внимание на следующие.

- Габариты и масса, по которым анализаторы различают настольные (малогабаритные) и напольные (крупногабаритные).
- Система последовательности выполнения анализов. Различают две системы организации работы анализаторов:
  - ▶ «от методики к методике», то есть «по тестам», когда для всех проб выполняется один и тот же тест, затем для этих проб другой тест и т.д., пока все тесты для анализируемых проб не будут выполнены;
  - ▶ «по пациентам», когда выполняются все тесты для первого пациента, затем для второго и т.д.
- Количество позиций для размещения контейнеров с реактивами в реагентном блоке; от их количества зависит, сколько методик, а значит и количество анализов может определять анализатор.

- Потребности в очищенной воде для проведения анализов. Чем выше производительность анализатора, тем большее количество воды он потребляет. Потребление воды может составлять 20–40 л/ч, поэтому часто анализаторы подключают напрямую к станциям водоподготовки.
- Особенности оптической системы регистрации:
  - ▶ источник света (ксеноновая, галогеновая лампа с длительным сроком эксплуатации, лампа накаливания и др.);
  - ▶ диапазон длин волн;
  - ▶ монохроматизация светового потока — с помощью дифракционной решетки, набора простых или интерференционных светофильтров;
  - ▶ режим фотометрического измерения — моно-, бихроматический.
- Характер измерения оптической абсорбции раствора и оценки результата по:
  - ▶ конечной точке;
  - ▶ кинетике;
  - ▶ двум точкам;
  - ▶ фиксированной абсорбции;
  - ▶ калибровочной кривой;
  - ▶ нелинейной калибровке (иммунотурбидиметрия).

### 12.10.3. КАЛИБРОВКА БИОХИМИЧЕСКИХ АНАЛИЗАТОРОВ

При работе с биохимическими анализаторами могут быть использованы различные виды калибровки — линейная и нелинейная. Калибровка может быть выполнена с помощью калибровочного коэффициента (калибровочного фактора) или калибратора. Калибровку проводят теми же методами и в тех же условиях, при которых исследуется проба биологического материала. Для обеспечения качественных результатов исследований применение каждого вида калибровки должно быть строго определено в инструкциях.

При калибровке анализатора по калибратору можно встретить по меньшей мере два варианта линейной калибровки: по «одной точке» и «линейной регрессии». Если при использовании метода трудно достичь достаточной линейности результатов, можно выбрать участок калибровочной кривой с достаточной линейностью. Нелинейная калибровочная кривая требует математической линеализации (логарифмирования). Вид калибровки можно выбрать в меню анализатора.



При калибровке «по одной точке» калибровочный коэффициент рассчитывает компьютер анализатора по абсорбции калибратора и его известной концентрации. Компьютер анализатора на основании этого измерения создает калибровочную кривую, которая является линейной и проходит через точку пересечения осей  $X$  и  $Y$ . Нулевым значением считают величину абсорбции при отсутствии оптически активного вещества. Калибровочная кривая может быть направлена и вверх, и вниз в зависимости от того, что происходит с оптически активным веществом, то есть по возрастанию или убыли которого судят о концентрации (активности) исследуемого компонента. Современные анализаторы сами определяют направление реакции. В качестве нулевого калибратора часто используют «холостую» пробу на реактивы (бланк реактивов).

Калибровку по «линейной регрессии» используют реже. В этом случае калибровочная кривая не проходит через нулевое значение графика, то есть при  $X = 0$  кривая проходит выше (ниже) оси  $X$ . При данном виде калибровки нужно использовать минимум 2 калибратора, один из которых необходим для определения величины  $Y$  при  $X = 0$ . В дальнейшем эта постоянная величина будет использоваться для расчета окончательного результата. При калибровке по «линейной регрессии» может быть использовано до 6 калибраторов. Такое большое количество калибраторов требуется, чтобы уловить возможные изменения прямолинейной зависимости, что часто бывает при турбидиметрических измерениях.

Если калибровочная кривая носит нелинейный характер, то в этом случае используются минимум 5 калибраторов и холостая проба.

Большое значение для обеспечения качества результатов анализов имеет частота калибровки. В настоящее время выбор интервалов повторной калибровки анализатора остается не в полной мере решенной проблемой. В ряде случаев частота повторных калибровок определяется сроком сохранности реактивов в анализаторе, определенном фирмой-производителем реактивов. В закрытых аналитических системах эти сроки внесены в программу анализатора. Любое вмешательство в аналитическую систему анализатора (замена лампы, воды, ремонт) должно заканчиваться повторной калибровкой. Более частое ее выполнение необходимо либо в связи с указаниями фирмы-производителя, либо при неудовлетворительных результатах контроля качества. Следует подчеркнуть, что отступление от инструкций производителя, например использование старых растворов, калибраторов или контрольных материалов, несоответствующая частота калибровок или сокращение количества калибровочных точек, замена парных проб

на одиночные, недопустимо. Даже если предполагают или уверены, что частота калибровки неоправданно завышена, отступать от инструкций фирмы нельзя.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ

1. Назовите основные типы биохимических анализаторов.
2. Что такое «проточная» кювета и для чего ее используют?
3. Какие типы автоматических биохимических анализаторов используются в лабораториях?
4. Перечислите основные функциональные блоки автоматических биохимических анализаторов.
5. Назовите основные преимущества автоматических биохимических анализаторов.
6. Какие типы калибровок используются в автоматических биохимических анализаторах?

# ИССЛЕДОВАНИЕ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА

Кровь обладает уникальной способностью свертываться. Свертывание — свойство крови превращаться из жидкости в эластичный сгусток, способный остановить кровотечение, которое возникло при повреждении тканей. Комплекс процессов, который при этом происходит, называют гемостазом, а все компоненты этого процесса и сами процессы — системой гемостаза.

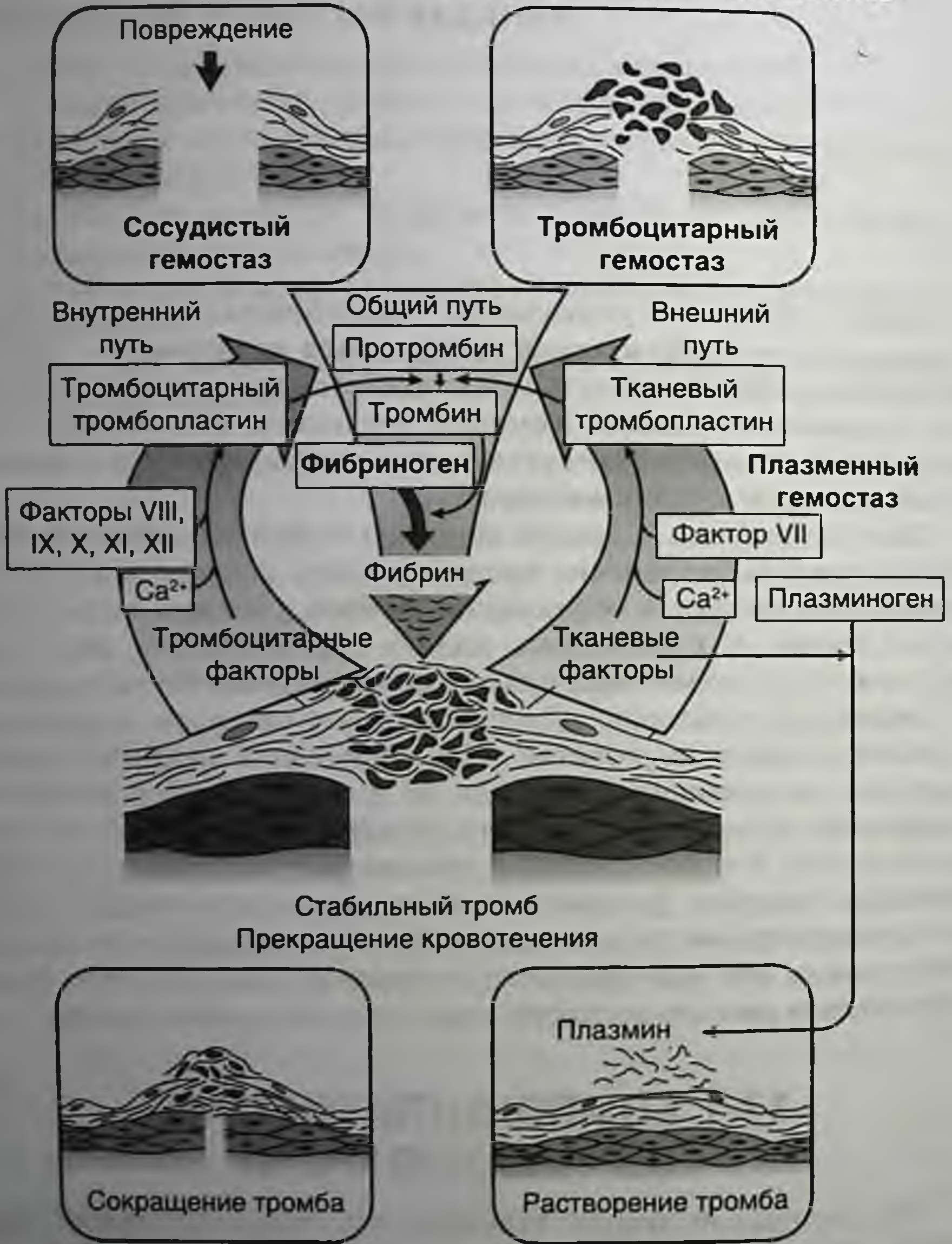
Система гемостаза — одна из защитных систем организма человека, обеспечивающая сохранение крови в жидком состоянии в пределах кровеносных сосудов и образование тромбов в области повреждения стенки сосуда. В кровеносных сосудах при отсутствии каких-либо патологических воздействий жидкое состояние крови служит следствием равновесия факторов, обуславливающих процессы свертывания и препятствующих их развитию. При нарушениях подобного баланса в системе свертывания крови или ее элементах может возникнуть повышенная кровоточивость или тромбообразование (тромбоз) в сосудах. И первое, и второе состояние представляет потенциальную угрозу для жизни пациента. Для диагностики подобных нарушений у пациентов, предупреждения их развития, выбора оптимальных методов лечения и оценки его эффективности проводят ряд лабораторных тестов, позволяющих оценить состояние свертывающей системы крови.

## 13.1. КОМПОНЕНТЫ СИСТЕМЫ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

Гемостатический процесс включает пять стадий: локальный спазм сосуда, формирование тромбоцитарного тромба, стабилизацию его фибрином, ретракцию (сокращение) тромба и его растворение после восстановления поврежденной стенки сосуда. Последовательность

событий, которые ведут к формированию стабильного фибринового сгустка и прекращению кровотечения из поврежденного сосуда, представлена на рис. 13.1.

Спазм сосуда, снижение кровотока      Агрегация и адгезия тромбоцитов



Посткоагуляционная фаза гемостаза

Рис. 13.1. Нормальный гемостаз

Тромбообразование в организме происходит по единым законам с включением в процесс определенных клеточных элементов, ферментов и факторов свертывания. В свертывании крови различают два звена: клеточный (сосудисто-тромбоцитарный) и плазменный (коагуляционный) гемостаз.

Под клеточным гемостазом понимают адгезию клеток (прилипание тромбоцитов к поврежденной поверхности сосуда), агрегацию (склеивание одноименных клеток крови между собой), а также высвобождение из форменных элементов веществ, активирующих плазменный гемостаз.

Плазменный (коагуляционный) гемостаз представляет собой каскад реакций, в которых участвуют факторы свертывания крови, завершающийся процессом фибринообразования. Образовавшийся фибрин подвергается далее разрушению под влиянием плазмина (фибринолиз).

Важно отметить, что деление гемостатических реакций на клеточные и плазменные условно. В организме эти два звена свертывающей системы крови тесно связаны и не могут функционировать отдельно.

Спазм сосудов и снижение кровотока в поврежденном участке уменьшает величину кровопотери. Повреждение сосуда также вызывает два важных физиологических эффекта. Первый из них — адгезия и агрегация тромбоцитов с формированием из них тромбоцитарного тромба, второй — запуск плазменного (коагуляционного) гемостаза или свертывающего каскада, который заканчивается образованием фибрина. Нити фибрина формируются вокруг агрегатов тромбоцитов и между ними, придавая устойчивость образовавшемуся тромбоцитарному тромбу.

Нормальный гемостаз в первую очередь зависит от двух факторов:

- адекватного числа нормально функционирующих тромбоцитов;
- нормально функционирующего плазменного (коагуляционного) гемостаза.

Чтобы понять возникающие нарушения в системе гемостаза, вызванные заболеваниями, и правильно использовать лабораторные тесты для их выявления, необходимо рассмотреть эти факторы более детально.

### 13.1.1. СОСУДИСТО-ТРОМБОЦИТАРНЫЙ ГЕМОСТАЗ

Очень важную роль в осуществлении реакций гемостаза играет сосудистая стенка. Эндотелиальные клетки (эндотелиоциты) сосудов способны синтезировать различные биологически активные вещества, формирующие тромбообразование. К ним относят фактор Виллебранда, простациклин, тромбомодулин, эндотелин, тканевый фактор (тромбопластин) и др. При отсутствии каких-либо повреждений выстилающие сосуд эндотелиальные клетки обладают тромборезистентными свой-

ствами (свойствами, противостоящими образованию тромбов), что способствует поддержанию жидкого состояния крови.

Нарушение целостности сосудистой стенки и/или изменение функциональных свойств эндотелиоцитов может, напротив, способствовать развитию протромботических реакций (образованию тромбов). Причины, приводящие к травме сосудов, весьма разнообразны и включают как экзогенные факторы (механические повреждения, лучевое воздействие, гипер- и гипотермию, токсичные вещества, в том числе и лекарственные средства, и др.), так и эндогенные. К последним относят биологически активные вещества (тромбин, ряд цитокинов). Такой механизм поражения сосудистой стенки характерен для многих заболеваний, сопровождающихся склонностью к тромбообразованию.

Абсолютно все клеточные элементы крови участвуют в образовании тромбов. Однако для тромбоцитов (в отличие от эритро- и лейкоцитов) эта функция — основная. Тромбоциты не только главные клеточные участники процесса тромбообразования в артериях и венах, но также оказывают существенное влияние на плазменный гемостаз. При повреждении сосудов происходят активация тромбоцитов и стимуляция процессов их адгезии и агрегации. Адгезия (прилипание) тромбоцитов к поврежденной поверхности сосуда обеспечивается фактором Виллебранда, который высвобождается из разрушенных эндотелиальных клеток. Вслед за адгезией тромбоциты выделяют в плазму крови много биологически активных веществ (АДФ, тромбоксан, серотонин, адреналин), влияющих на плазменный гемостаз и сами тромбоциты. Эти вещества заставляют тромбоциты приклеиваться друг к другу и увеличиваться в размерах. Совокупность этих превращений называют агрегацией. Она продолжается до тех пор, пока масса склеившихся тромбоцитов не станет достаточной, чтобы закрыть повреждение в сосудистой стенке. Образование тромботического тромба обычно бывает достаточно, чтобы остановить кровотечение из сосуда малого диаметра. При повреждениях сосудов большего диаметра на помощь сосудисто-тромботическому гемостазу приходит коагуляционный каскад.

### 13.1.2. ПЛАЗМЕННЫЙ (КОАГУЛЯЦИОННЫЙ) ГЕМОСТАЗ

Одновременно с процессами агрегации тромбоцитов у стенки сосуда происходит активация плазменного (коагуляционного) гемостаза. Совместно эти два звена обеспечивают образование фибрина. Свертывание крови происходит в результате серии реакций, в которой белки, находящиеся в плазме крови и называемые факторами, последовательно активируются. Все реакции ферментативные. В своем неак-

тивном состоянии факторы служат проферментами, то есть не могут участвовать в реакциях. Активация их происходит путем ограниченного протеолиза (изменения белка), в результате которого факторы становятся активными ферментами. Каждая реакция коагуляционного каскада превращает профермент в фермент. Часть факторов не является проферментами или ферментами, а часть из них — простые вещества, которые помогают протеканию ферментативных реакций (коферменты или кофакторы).

Гемостатические реакции, совокупность которых принято называть плазменным (коагуляционным) гемостазом и имеющих своим итогом образование фибрина, обеспечиваются в основном протеинами, носящими название плазменных факторов. В табл. 13.1 приведен перечень факторов, участвующих в свертывании крови.

Таблица 13.1. Факторы свертывания крови

Фактор	Синонимы	Характеристика
I	Фибриноген	Гликопротеин, предшественник фибрина, синтезируемый в печени
II	Протромбин	Профермент, синтезируемый в печени
III	Тканевый тромбопластин, тканевый фактор	Липопротеин, имеющийся во многих тканях; запускает внешний путь свертывания
IV	Ионы кальция	Неорганическое вещество, кофактор
V	Проакцелерин, Ас-глобулин	Белок, кофактор, синтезируемый в печени
VI	Акцелерин (исключен из употребления)	
VII	Проконвертин	Профермент, синтезируемый в печени
VIII	Антигемофильный глобулин А	Белок, кофактор
IX	Кристалмас-фактор, плазменный тромбопластиновый компонент, антигемофильный фактор В	Профермент, синтезируемый в печени
X	Фактор Стюарта-Прауэр	Профермент, синтезируемый в печени
XI	Антигемофильный фактор С	Профермент
XII	Фактор Хагемана, фактор контакта	Профермент
XIII	Фибриназа, фибрин-стабилизирующий фактор	Профермент

Упрощенная схема свертывающего каскада крови представлена на рис. 13.2. Два типа взаимодействий могут приводить к запуску каскада, условно их называют внешним и внутренним путями. Внешний путь получил свое название, так как для его запуска необходим тканевый фактор (тромбопластин), который в норме в крови отсутствует и появляется при повреждении сосудов или тканей. Внутренний путь, все компоненты которого присутствуют в крови, активируется путем контакта фактора XII с белком коллагеном, попавшим в кровоток в результате нарушения целостности сосудистой стенки. Оба пути в результате каскада реакций приводят к активации фактора X. В действительности в любой клинической ситуации всегда задействованы оба пути вместе, а не изолированно. Именно поэтому путь к активации фактора X и вплоть до образования фибрина называют общим путем.

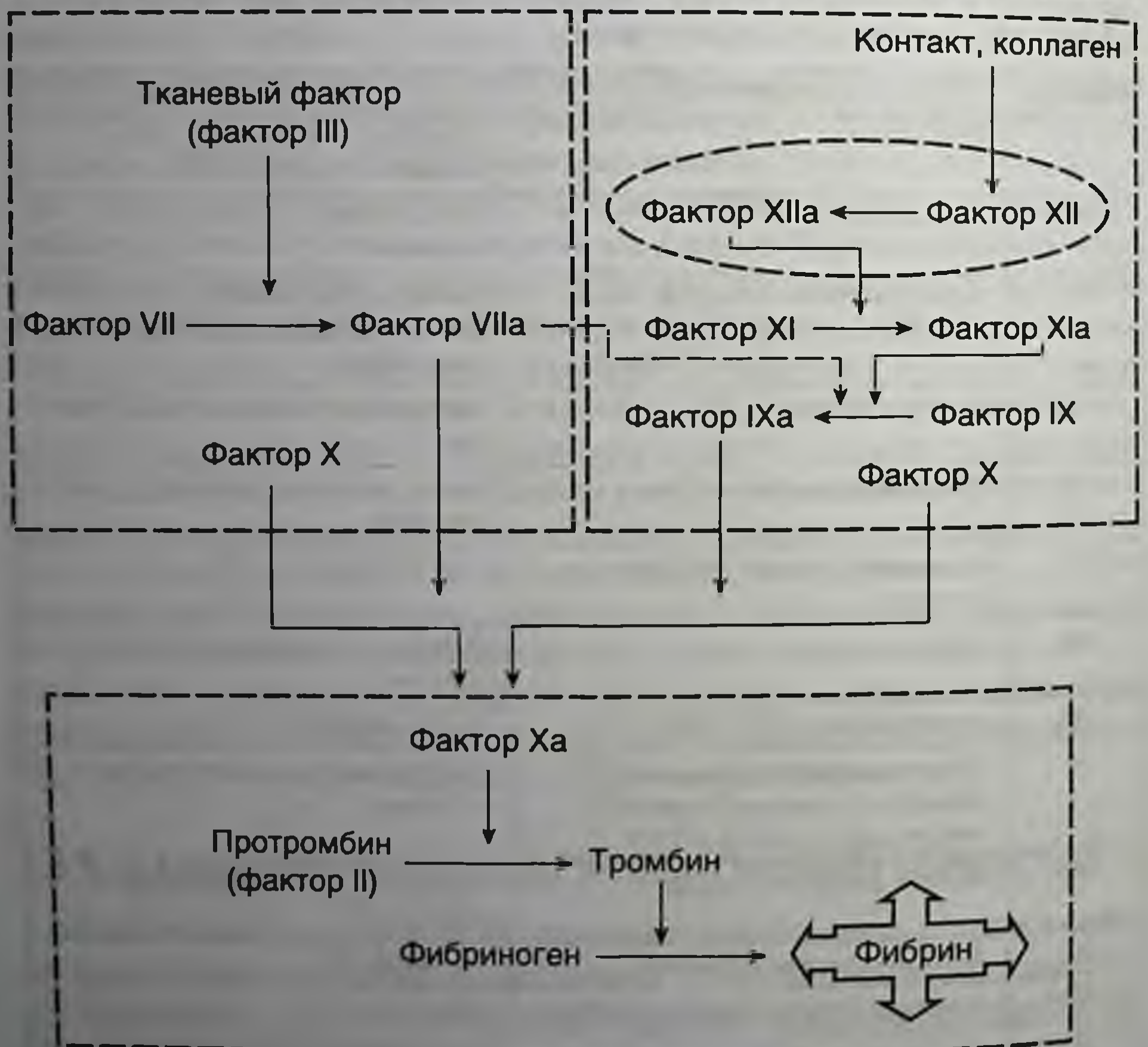


Рис. 13.2. Плазменный (коагуляционный) каскад



Пусковым фактором внутреннего пути служит фактор XII, который активируется вследствие контакта крови либо с чужеродной поверхностью, либо с коллагеном и другими компонентами соединительной ткани при повреждении стенок сосудов; либо фактор XII активируется путем его ферментативного расщепления (калликреином, плазмином, другими протеазами). Активированный фактор XII далее активирует фактор XI, который уже, в свою очередь, активирует фактор X. Для протекания последней реакции необходимы кофакторы — фактор VIII (антигемофильный глобулин А) и фактор IV (ионы кальция).

Во внешнем пути основную роль играет тканевый фактор (фактор III — тромбопластин), который содержится на клеточных поверхностях при повреждении тканей и образует с фактором VII и ионами кальция комплекс, способный активировать фактор X.

В конце общего пути активированный фактор X активирует фактор II (протромбин), который превращается в активный тромбин. Фактор V служит кофактором, необходимым для превращения протромбина в тромбин. Возникший тромбин отщепляет от молекулы фибриногена 4 пептида и переводит его в фибрин-мономер. Молекулы последнего полимеризуются сначала в димеры, затем в фибрин-полимеры. Кроме того, тромбин активирует фактор XIII. Последний в присутствии ионов кальция изменяет фибрин-полимер из формы легко растворимой в медленно и ограниченно растворимую, составляющую основу кровяного сгустка.

Большинство факторов плазменного гемостаза, включая фибриноген, протромбин и факторы V, VII, IX, X, XI и XII, синтезируются в печени. Для клинической практики важно знать, что синтез факторов II, VII, IX и X в первую очередь зависит от наличия в организме витамина К. Эта важность обусловлена тем, что дефицит витамина в организме и используемые для лечения больных непрямые антикоагулянты (реализуют свое действие за счет ослабления всасывания витамина К) могут приводить к нарушению свертывания крови. Источниками витамина К в организме человека служат пищевые продукты и обитающие в толстой кишке бактерии, его синтезирующие.

Таким образом, образование фибрина и соответственно формирование кровяного тромба зависят от адекватной концентрации всех факторов свертывания крови в плазме, что обусловлено:

- нормальной функцией печени;
- адекватным поступлением витамина К;
- нормальной микрофлорой толстого кишечника;
- нормальным всасыванием витамина К.

В процессе образования гемостатического тромба не происходит распространения тромбообразования от места повреждения стенки сосуда по сосудистому руслу, так как этому препятствуют быстро возрастающий вслед за свертыванием антикоагулянтный потенциал крови и активация фибринолитической (плазминовой) системы.

После стабилизации фибрина, вместе с форменными элементами образующего первичный красный тромб, начинаются два основных процесса посткоагуляционной фазы — спонтанный фибринолиз (растворение тромба под действием плазмина) и ретракция (сокращение), приводящие в итоге к формированию гемостатически полноценного окончательного тромба. В норме эти два процесса идут одновременно. Физиологический спонтанный фибринолиз (растворение) и ретракция (уплотнение) способствуют уплотнению тромба и выполнению им гемостатических функций. В дальнейшем происходит восстановление стенки поврежденного сосуда и растворение тромба под действием плазмина.

Сохранение крови в жидком состоянии и регуляция скоростей взаимодействия факторов во все фазы коагуляции во многом определяются наличием в кровотоке естественных веществ, обладающих антикоагулянтной активностью. Жидкое состояние крови достигается равновесием между факторами, индуцирующими (стимулирующими) свертывание крови, и факторами, препятствующими его развитию, причем последние не выделяются в отдельную функциональную систему, так как реализация их эффектов чаще всего невозможна без участия факторов свертывания крови. Вещества, обладающие антикоагулянтной активностью, постоянно синтезируются в организме и с определенной скоростью выделяются в кровоток. К ним относят антитромбин III, гепарин, протеины С и S.

В клинической практике исследование системы гемостаза проводится в целях:

- диагностики нарушений в системе гемостаза;
- выяснения допустимости оперативного вмешательства при выявленных нарушениях в системе гемостаза;
- проведения контроля лечения антикоагулянтами прямого и непрямого действия, а также тромболитической терапии.

## 13.2. ЛАБОРАТОРНЫЕ ТЕСТЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ОЦЕНКИ СВЕРТЫВАЮЩЕЙ СИСТЕМЫ КРОВИ

В свертывании крови участвуют сосуды, тромбоциты и плазменные факторы. Для оценки состояния каждого из перечисленных факторов используют различные клинические и лабораторные тесты.

### 13.2.1. ТЕСТЫ, ХАРАКТЕРИЗУЮЩИЕ СОСУДИСТЫЙ КОМПОНЕНТ ГЕМОСТАЗА

Сосуды активно участвуют в остановке кровотечения. Во многом состояние сосудистой стенки определяет риск развития кровотечения. Некоторые заболевания (аллергические, эндокринные), а также дефицит витаминов (например, витамина С) могут вызывать дистрофические изменения в сосудистой стенке, повышая риск возникновения кровотечений. Для оценки состояния сосудов используются некоторые пробы, которые может выполнить медицинская сестра.

**Проба шипка.** Медицинская сестра собирает под ключицей кожу в складку и делает шипок. У здоровых людей никаких изменений на коже не наступает ни сразу после шипка, ни спустя 24 ч. Однако если резистентность (стойкость) капилляров нарушена, то на месте шипка возникают петехии или кровоподтек, особенно отчетливо видимые через 24 ч.

**Проба жгута.** Отступив на 1,5–2 см вниз от ямки локтевой вены, очерчивают круг диаметром приблизительно 2,5 см. На плечо накладывают манжетку тонометра и создают давление 80 мм рт.ст. Давление поддерживают строго на одном уровне в течение 5 мин, после чего в очерченном круге подсчитывают все появившиеся петехии.

*Оценка результатов исследования.* У здоровых людей петехии не образуются или их не более 10 (отрицательная проба жгута). При нарушении резистентности стенки капилляров количество петехий после проведения пробы резко возрастает.

### 13.2.2. ТЕСТЫ, ХАРАКТЕРИЗУЮЩИЕ ТРОМБОЦИТАРНЫЙ КОМПОНЕНТ ГЕМОСТАЗА

Для оценки тромбоцитарного компонента гемостаза подсчитывают число тромбоцитов в крови прямым методом. Напомним, что тромбоциты нужны для осуществления нормального гемостаза. Больные с тромбоцитопенией подвержены риску кровотечения. Спонтанные кровотечения возникают, если количество тромбоцитов становится ниже  $50,0 \times 10^9/\text{л}$ . Смертельное кровотечение почти неизбежно, если количество тромбоцитов снижается до  $5,0 \times 10^9/\text{л}$ . Тромбоцитопения имеет тяжелые клинические проявления, включая меноррагии, спонтанное образование гематом, кровоточивость десен, носовые кровотечения, петехиальные подкожные кровоизлияния в виде сыпи. Повышенное количество тромбоцитов в крови — тромбоцитоз несет с собой риск повышения свертываемости и проявляется тромбозами

сосудов. В клинических ситуациях риск тромбоза становится реальным, если количество тромбоцитов достигает значений  $1000,0 \times 10^9/\text{л}$  и выше.

Однако, помимо подсчета тромбоцитов, в нашей стране широко используют тест по определению длительности (времени) кровотечения.

**Время кровотечения** определяют в тесте при проколе кожи скарификатором или иглой, фиксируя время, в течение которого кровотечение прекратится (время кровотечения по Дукке). Длительность кровотечения зависит от эластичности кровеносных сосудов и их способности к сокращению при травме, количества тромбоцитов в крови и их функциональных свойств. У здорового человека длительность кровотечения по Дукке составляет 2–3 мин.

**Длительность кровотечения** — скрининговый тест, основное достоинство которого в том, что он позволяет одновременно качественно оценить количество тромбоцитов в крови, их адгезивные и агрегационные функции, функциональные свойства стенки кровеносных сосудов, а также выраженный дефицит плазменных факторов свертывания крови (например, факторов VIII и IX, недостаток которых служит причиной гемофилии А и В).

Практическое значение имеет удлинение времени кровотечения. Оно отражает нарушение гемостаза вследствие тромбоцитопений, тромбоцитопатий (нарушения функций тромбоцитов — адгезии и агрегации), нарушения сосудистой стенки или сочетания этих факторов. Удлинение времени кровотечения при нормальном количестве тромбоцитов в крови позволяет предположить нарушение их функций. В этом и состоит основная ценность теста, так как для оценки адгезивных и агрегационных свойств тромбоцитов в лабораторных условиях необходимо сложное и дорогое оборудование (агрегометр). Когда функции тромбоцитов не нарушены, время кровотечения остается в норме даже при снижении числа тромбоцитов до  $100,0 \times 10^9/\text{л}$ . При количестве тромбоцитов ниже этого уровня время кровотечения постепенно увеличивается в линейном соотношении с числом тромбоцитов, что отражено на рис. 13.3.

Длительность кровотечения увеличивается при:

- выраженных тромбоцитопениях (см. причины снижения количества тромбоцитов в главе 2);
- нарушении функций тромбоцитов — тромбоцитопатиях, которые бывают врожденными (например, синдром Бернара–Сулье) и приобретенными [при пернициозной анемии, остром и хроническом лейкозе, миеломной болезни, длительном приеме ацетилсалициловой кислоты (Аспирина<sup>®</sup>)];

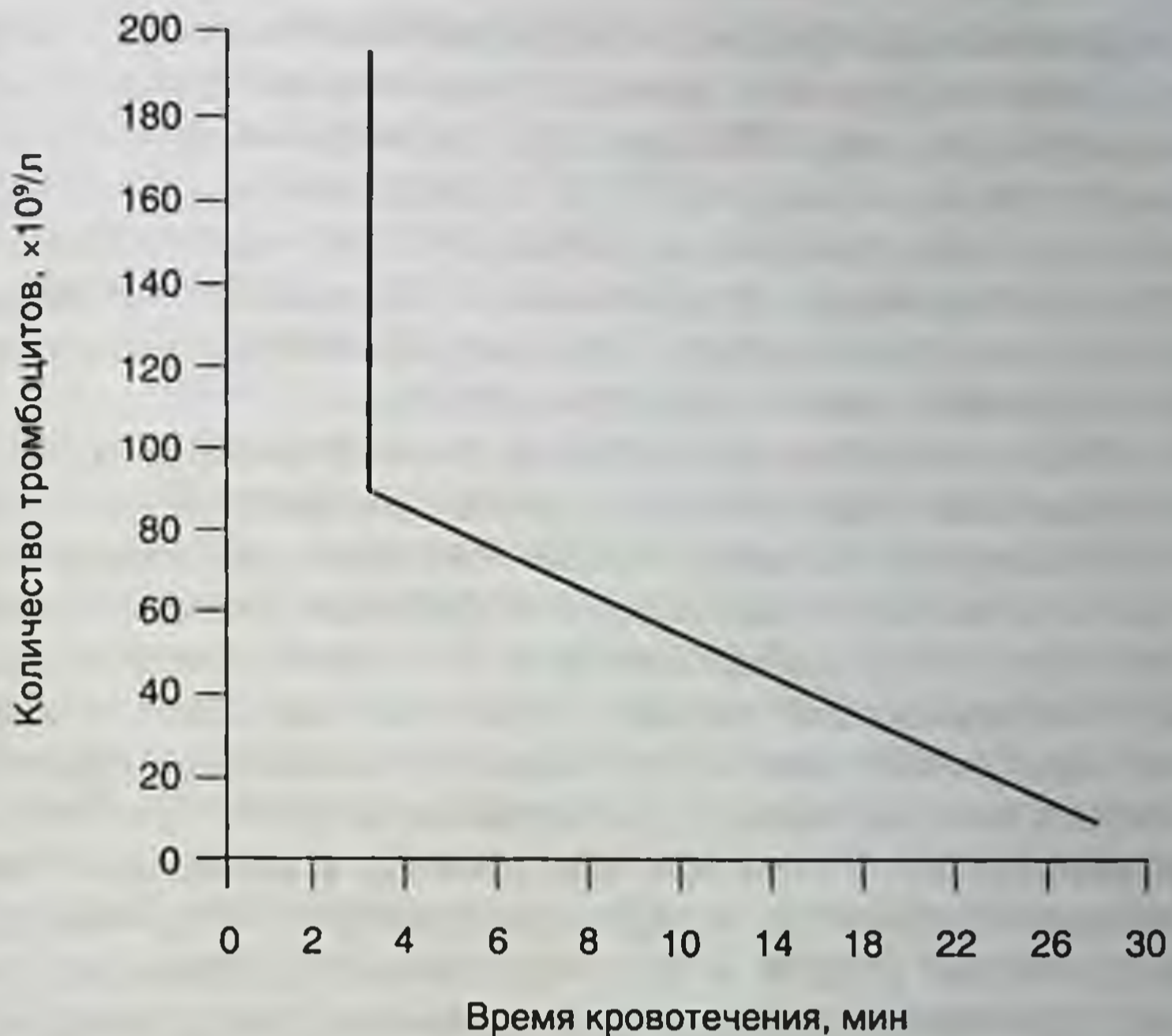


Рис. 13.3. Зависимость времени кровотечения от количества тромбоцитов

- выраженном снижении уровня плазменных факторов свертывания крови (например, отсутствие фактора VIII — гемофилия А, недостаток фактора IX — гемофилия В, выраженная гипофибриногенемия);
- нарушении резистентности стенки капилляров (например, при недостатке витамина С, дефектах сокращения прекапилляров — микроангиопатиях).

Укорочение времени кровотечения диагностического значения не имеет и чаще всего бывает следствием технической ошибки при проведении теста или свидетельствует о повышенной спастической способности капилляров. Оценить склонность к тромбообразованию по данным теста длительности кровотечения невозможно.

### 13.2.3. ТЕСТЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ОЦЕНКИ КОАГУЛЯЦИОННОГО ГЕМОСТАЗА

Приведенные выше тесты достаточно просты и понятны. Труднее оценивать данные (результаты), которые получают с помощью тестов, характеризующих состояние коагуляционного гемостаза. Наиболее

часто в клинической практике коагуляционный гемостаз оценивают по результатам определения времени свертывания крови, тромбинового и протромбинового (ПВ) времени, активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) и фибриногена.

Время свертывания крови представляет собой скрининговый тест, позволяющий наблюдать за протеканием свертывания крови (коагуляционного каскада) в пробирке или специальной стеклянной трубке. Результат теста выражают в минутах и секундах.

ПВ, АЧТВ и тромбиновое время позволяют оценить способность крови образовывать фибрин в результате искусственного запуска в пробирке свертывающего каскада. Во всех этих анализах измеряют время, необходимое для формирования сгустка фибрина в плазме крови, взятой у больного, после добавления того или иного реактива, который запускает свертывающий каскад. Результаты выражают в секундах. При определении ПВ в плазму добавляют тромбопластин (фактор III), который запускает внешний путь свертывания крови. Именно поэтому определение ПВ — тест для проверки функционального состояния внешнего и общего пути. Дефицит фактора свертывания любого из этих двух путей (VII, X и V, протромбина и фибриногена) характеризуется удлинением времени формирования сгустка выше нормы. У такого пациента в результате анализа, полученного из лаборатории, ПВ будет удлинено.

Аналогичным образом, добавляя активатор внутреннего пути свертывания крови к плазме пациента, определяют АЧТВ, что позволяет оценить состояние внутреннего и общего пути свертывания крови. В этом случае удлинение АЧТВ указывает на дефицит одного фактора или более внутреннего и/или общего пути.

При выполнении теста по определению тромбинового времени в плазму крови пациента добавляют тромбин. Этот тест позволяет оценить функциональное состояние конечной стадии общего пути — превращения фибриногена в фибрин. Удлинение тромбинового времени указывает на дефицит фибриногена (фактор I). Если ПВ, АЧТВ и тромбиновое время в норме, можно утверждать, что свертывающий каскад работает нормально. Вместо тромбинового времени можно непосредственно в плазме определить концентрацию фибриногена количественно.

### 13.2.3.1. ВРЕМЯ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

**Методика выполнения теста** — время свертывания крови по Сухареву. Кровь берут из пальца в чистый и сухой капилляр Панченкова. Первую каплю крови удаляют тампоном, затем в капилляр набирают столбик

крови высотой 25–30 мм и переводят ее в середину капиллярной трубки. Включают секундомер и через каждые 30 с наклоняют капилляр под углом 30–45°. Кровь свободно перемещается внутри капилляра. С началом свертывания ее движение замедляется. В момент полного свертывания кровь перестает двигаться. Начало свертывания крови у здорового человека — от 30 с до 2 мин, окончание — от 3 до 5 мин.

Время свертывания крови служит ориентировочным показателем состояния многоступенчатого коагуляционного каскада, в результате которого растворимый фибриноген переходит в нерастворимый фибрин. Данный показатель характеризует процесс свертывания в целом (оценивает состояние внутреннего, внешнего и общего пути свертывания крови) и не позволяет обнаружить механизмы, ведущие к его нарушению. Вместе с тем время свертывания крови может укорачиваться только в результате ускорения образования кровяной протромбиназы вследствие попадания в кровь пациента тромбопластина (фактора III). Именно поэтому укорочение времени свертывания крови часто обусловлено появлением в кровеносном русле тканевого тромбопластина при механических повреждениях тканей, ожогах, обширных операциях, переливании несовместимой крови, сепсисе, васкулите и др. Укорочение времени свертывания свидетельствует о необходимости профилактики гиперкоагуляции, которая нередко угрожает тромбозом и тромбоземболией.

Свертывание крови существенно увеличивается вследствие врожденного или приобретенного дефицита факторов протромбинообразования (прежде всего VIII, IX и XI), при повышении в крови концентрации антикоагулянтов, а также продуктов разрушения фибриногена и фибрина.

### 13.2.3.2. ПРОТРОМБИНОВОЕ ВРЕМЯ

ПВ характеризует состояние внешнего и общего пути коагуляционного каскада свертывания крови. Нормальные величины ПВ для взрослых составляют 11–15 с, для новорожденных — 13–18 с.

Увеличение ПВ говорит о склонности к гипокоагуляции и может зависеть от различных причин.

- Недостаточность одного или нескольких факторов протромбинового комплекса, которую наблюдают при таких редких наследственных коагулопатиях, как гипопроконвертинемия (дефицит фактора VII) и гипопротромбинемия (дефицит фактора II).
- Отмечаемое иногда при амилоидозе увеличение ПВ связано с дефицитом фактора X, который поглощается амилоидом, а при

нефротическом синдроме — с дефицитом факторов VII и V, которые выделяются с мочой.

- Синтез факторов протромбинового комплекса происходит в клетках печени, при заболеваниях которой количество их снижается, и ПВ в определенной степени может служить показателем функционального состояния печени. Увеличение его отмечают при острых и хронических гепатитах, циррозах, подострой дистрофии и других поражениях паренхимы печени и служит плохим прогностическим признаком. При этом причиной увеличения ПВ может служить и развивающееся в результате уменьшения поступления желчи в кишечник нарушение всасывания витамина К, который необходим для синтеза факторов протромбинового комплекса. Такова же причина увеличения ПВ и при механической желтухе.
- Энтеропатия и кишечные дисбактериозы, ведущие к недостаточности витамина К, также могут сопровождаться увеличением ПВ.
- При лечении антагонистами витамина К (антикоагулянтами непрямого действия) нарушается конечный этап синтеза факторов протромбинового комплекса, и ПВ удлиняется.
- Потребление факторов протромбинового комплекса при остром ДВС-синдроме ведет к довольно раннему увеличению ПВ (в 2 раза и более).
- При хроническом панкреатите, раке поджелудочной железы и желчного пузыря увеличение ПВ может быть результатом поражения печени и/или развития ДВС-синдрома.
- Афибриногенемия, гипофибриногенемия (снижение содержания в крови фибриногена до 1 г/л и менее), а также избыточное содержание гепарина в крови ведут к увеличению ПВ.
- Удлинение ПВ определяют при острых и хронических лейкозах, вследствие развития ДВС-синдрома.
- Повышение уровня антитромбина или антитромбопластина в крови также ведет к удлинению ПВ.
- Целая группа лекарственных средств способна удлинять ПВ: ацетогексамид<sup>®</sup>, анаболические стероиды, антибиотики, ацетилсалициловая кислота (в больших дозах), слабительные средства, метотрексат, никотиновая кислота, хинидин, хинин, тиазидные диуретики, толбутамид.

Укорочение ПВ свидетельствует о наклонности к гиперкоагуляции и может быть отмечено в начальных стадиях тромбоза глубоких вен нижних конечностей, при полицитемии, в последние месяцы беременности.



### 13.2.3.3. АКТИВИРОВАННОЕ ЧАСТИЧНОЕ ТРОМБОПЛАСТИНОВОЕ ВРЕМЯ

Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) — один из наиболее ценных общих тестов для получения представления о системе свертывания крови. АЧТВ — тест, выявляющий исключительно плазменные дефекты внутренней системы активации фактора X свертывания крови. Нормальные величины АЧТВ составляют 25–35 с. Удлинение его отражает дефицит плазменных факторов (кроме VII и XIII) и наблюдается при их значительном (ниже 25–10%) снижении в плазме.

Удлинение АЧТВ указывает на гипокоагуляцию, наблюдается при дефиците факторов VIII, IX, XI, XII свертывания в плазме. Дефицит может быть наследственным или (чаще) приобретенным в результате заболевания. Из наследственных форм патологии наиболее часто встречаются дефицит фактора VIII или IX (сопровождается выраженной кровоточивостью), что характерно для гемофилии.

Развитие гемофилии А обусловлено врожденным недостатком фактора VIII. Дефект находится в гене, кодирующем синтез фактора VIII. При этом в крови больных фактора VIII или нет, или он находится в функционально неполноценной форме, которая не может принимать участия в свертывании крови.

Гемофилия А — наследственное заболевание, но у 20–30% больных гемофилией семейный анамнез со стороны родственников матери никакой информации не дает. При гемофилии внешний и общий путь свертывающего каскада не страдает, поэтому ПВ в норме. Однако АЧТВ, характеризующее состояние внутреннего пути, который зависит от наличия в плазме фактора VIII, удлиняется. В связи с этим определение АЧТВ имеет большую клиническую ценность для диагностики гемофилии. При выраженном дефиците фактора VIII без заместительной терапии больные подвержены риску опасных для жизни кровотечений. У больных с легкой формой и «носителей» гемофилии А клинические проявления заболевания возникают только после травм и хирургических вмешательств. Определение АЧТВ играет важнейшую роль в диагностике гемофилии В (дефицит фактора IX — болезнь Кристмаса). Это более редко встречаемая форма гемофилии, но она также представляет большую опасность для больного.

Большинство факторов свертывания синтезируется в печени. С их дефицитом связывают большинство кровотечений при заболеваниях печени (острый или хронический гепатит, цирроз). При тяжелых заболеваниях печени ПВ и АЧТВ увеличиваются. Однако ПВ служит более чувствительным тестом для оценки поражения печени, чем АЧТВ.

Все состояния, связанные с дефицитом витамина К, приводят не только к удлинению ПВ, но также и АЧТВ.

Укорочение АЧТВ свидетельствует о преобладании гиперкоагуляции, что отмечают в первой (гиперкоагуляционной) фазе острого ДВС-синдрома. При развитии фазы гипокоагуляции АЧТВ увеличивается. Афибриногенемии (отсутствие фибриногена) и гипофибриногенемии, как врожденные, так и связанные с тяжелыми поражениями печени, сопровождаются удлинением АЧТВ.

#### 13.2.3.4. ТРОМБИНОВОЕ ВРЕМЯ

Тромбиновым называют время, необходимое для образования сгустка фибрина в плазме при добавлении к ней тромбина. Оно зависит только от концентрации фибриногена и активности ингибиторов тромбина и оценивает общий путь коагуляционного каскада — образование фибрина, а также наличие в плазме крови пациента антикоагулянтов. В норме величины тромбинового времени в плазме крови составляют 12–16 с.

В клинической практике определение тромбинового времени чаще всего преследует следующие цели:

- контроль гепаринотерапии;
- контроль фибринолитической терапии;
- диагностика гиперфибринолитических состояний;
- диагностика афибриногенемии и дисфибриногенемии.

Тромбиновое время, являясь косвенным показателем содержания фибриногена, удлиняется при наследственных и приобретенных афибриногенемиях и гипофибриногенемиях (при тяжелых поражениях печени, фибринолизе, остром ДВС-синдроме). Удлиняется тромбиновое время и при парапротеинемиях.

Определение тромбинового времени служит одним из распространенных методов контроля лечения гепарином натрия и фибринолитиками. В этих случаях тромбиновое время должно увеличиваться в 2–3 раза. При проведении тромболитической терапии определение тромбинового времени рекомендуют проводить каждые 4 ч.

#### 13.2.3.5. ФИБРИНОГЕН

Фибриноген (фактор I) — белок, синтезирующийся в основном в печени. В крови он находится в растворенном состоянии, но в результате ферментативного процесса под воздействием тромбина и фактора XIIIa может превращаться в нерастворимый фибрин. Референтные величины концентрации фибриногена в плазме приведены в табл. 13.2.

Таблица 13.2. Референтные величины фибриногена в плазме

Возраст	Концентрация фибриногена	
	мг/дл	г/л
Новорожденные	125–300	1,25–3,00
Взрослые	200–400	2,00–4,00

Фибриноген служит белком острой фазы, и его уровень в плазме повышается при инфекции, воспалении, травме и стрессе. Синтез фибриногена стимулируется гормонами (инсулин, прогестерон), жирными кислотами и продуктами деградации фибриногена. Уровень фибриногена в плазме повышен у курильщиков табака, больных СД. С повышением уровня фибриногена увеличивается риск сердечно-сосудистых заболеваний. У женщин уровень фибриногена выше, чем у мужчин, и у них более заметно его увеличение с возрастом.

Повышение концентрации фибриногена или ее снижение отмечено при следующих состояниях и заболеваниях.

- Гиперкоагуляция при различных стадиях тромбоза, ИМ, а также в последние месяцы беременности, после родов, хирургических операций.
- Воспалительные процессы, в частности пневмония; в связи с этим используют определение концентрации фибриногена в плазме одновременно с определением СОЭ для контроля течения воспалительного процесса.
- Неопластические процессы, особенно рак легкого.
- Легкие формы гепатита (концентрация фибриногена может быть повышена); тяжелые поражения печени (острый гепатит, цирроз) сопровождаются снижением концентрации фибриногена.
- Наследственные а- и гипофибриногенемии, первичный фибринолиз (концентрация фибриногена снижена).
- ДВС-синдром.

### 13.3. ТЕСТЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ТРОМБОЗОВ ГЛУБОКИХ ВЕН И ТРОМБОЭМБОЛИИ ЛЕГОЧНОЙ АРТЕРИИ

Тромбозы глубоких вен нижних конечностей — довольно распространенные заболевания и к тому же могут приводить к одному из наиболее опасных для жизни осложнений — тромбозу легочной артерии (ТЭЛА). Многие пациенты имеют повышен-

ный риск тромбоза глубоких вен нижних конечностей и соответственно ТЭЛА. Повышен риск развития тромбоза глубоких вен у тучных и пожилых людей, а также у беременных. Нередко тромбоз глубоких вен развивается у больных после обширных хирургических вмешательств, перенесенного инсульта в период нахождения в палате интенсивной терапии. Пациенты с сердечно-сосудистыми заболеваниями также подвержены риску развития тромбоза. Клинически выраженные тромбозэмболические расстройства развиваются у 15% пациентов с онкологическими процессами.

ТЭЛА — окклюзия (закупорка) артериального русла легких тромбом, первично образовавшимся в глубоких венах нижних конечностей либо полостях правого отдела сердца и мигрировавшим в сосуды легких с током крови. В большинстве (около 80–90%) случаев причиной развития ТЭЛА служит тромбоз глубоких вен нижних конечностей.

ТЭЛА — одно из наиболее распространенных и грозных осложнений многих заболеваний, послеоперационного и послеродового периода, неблагоприятно влияющее на их течение и исход.

Своевременная диагностика ТЭЛА до настоящего времени представляет значительные трудности в связи с вариабельностью развивающихся клинических синдромов, невозможностью использовать в ряде лечебных стационаров высокоинформативных методов исследования (перфузионная сцинтиграфия легких, ангиопульмонография), внезапностью развития и катастрофической быстротой течения заболевания. При этом летальность среди нелеченых пациентов достигает 30%, при рано начатой терапии антикоагулянтами она не превышает 10%.

В настоящее время основным и первоначальным исследованием, которое должно быть назначено больному при подозрении на наличие ТЭЛА, считают лабораторный тест на определение уровня D-димера в плазме крови.

**D-димеры** представляют собой фрагменты, образующиеся в плазме крови при расщеплении возникших внутри сосудистого русла волокон фибрина. Именно поэтому появление в плазме крови D-димера свидетельствует о том, что внутри сосудистого русла идут процессы тромбообразования. Повышенное содержание фрагмента фибрина (D-димера) служит одним из главных маркеров (указателей) активации системы гемостаза, так как отражает образование фибрина в исследуемой крови. В норме содержание D-димера в плазме крови составляет меньше 0,25 мкг/мл (250 мкг/л).

Определение в плазме D-димера используют для исключения тромбоза любой локализации и диагностики ДВС-синдрома. В настоящее время разработаны тесты для количественного определения D-димера

с помощью приборов, а также качественные экспресс-тесты. Для определения D-димера достаточно нескольких минут, что имеет особое значение для диагностики такого быстро развивающегося состояния, как ТЭЛА. У пациентов с ТЭЛА тест положителен в 95–98% случаев заболевания.

## 13.4. ТЕСТЫ ДЛЯ КОНТРОЛЯ АНТИКОАГУЛЯНТНОЙ ТЕРАПИИ

Антикоагулянтную терапию широко используют для лечения и профилактики различных тромбозов и их осложнений. Антикоагулянты оказывают выраженное действие на многие факторы коагуляционного каскада, увеличивая риск развития кровотечений. Именно поэтому контроль лечения антикоагулянтами имеет жизненно важное значение. Регулярное определение ПВ и АЧТВ — два основных лабораторных теста, которые позволяют следить за результатами антикоагулянтной терапии.

Антикоагулянты, которые наиболее часто используют в лечении и профилактике тромбозов, делят на прямые (гепарин натрия) — реализующие свой эффект, непосредственно воздействуя на факторы коагуляционного каскада (ингибируя их активность), и непрямые — антагонисты витамина К, нарушающие синтез факторов с участием витамина К в печени. Поскольку непрямые антикоагулянты пациент принимает перорально, они получили название оральные антикоагулянты. В нашей стране распространение получили следующие оральные антикоагулянты — дикумарин<sup>®</sup>, неодикумарин<sup>®</sup>, аценокумарол (Синкумар<sup>®</sup>), фениндион (Фенилин<sup>®</sup>), этил бискумацетат (Пелентан<sup>®</sup>). В западных странах чаще всего используют непрямой антикоагулянт варфарин. При этом определение АЧТВ применяют для оценки гепаринотерапии, а ПВ — для контроля лечения непрямыми антикоагулянтами.

### 13.4.1. ПРЯМЫЕ АНТИКОАГУЛЯНТЫ (ГЕПАРИНОТЕРАПИЯ)

Обнаружение в результатах лабораторных исследований признаков гиперкоагуляции (укорочение времени свертывания крови, ПВ, АЧТВ) служит показанием для назначения препаратов гепарина.

До введения в широкую клиническую практику гепарина натрия тромбоз глубоких вен нижних конечностей лечили поддерживающей терапией, состоящей из постельного режима, возвышенного положе-

ния ноги, пиявок и теплых носков. Обычно лечение таких больных продолжалось 4–8 нед. В течение этого времени тромбоз вен голени распространялся на бедро в 80% случаев, на другую ногу — в 20%, в 28% регистрировали ТЭЛА, каждая третья из которых была фатальной. У большинства из выживших больных развивались осложнения с хроническим отеком, цианозом, часто обеих ног, приводящие к потере трудоспособности.

Гепарин был открыт в 1918 г. как вещество, ингибирующее коагуляцию, причем выраженность ингибирующего эффекта прямо зависела от концентрации этого вещества в крови. Его называли гепарином, так как его максимальная концентрация была обнаружена в печени. В настоящее время гепаринотерапия — наиболее распространенный и часто применяемый в клинической практике метод лечения больных тромбозами.

Геморрагические осложнения при лечении гепарином натрия встречаются нечасто, тем не менее они представляют угрозу жизни больного. Именно поэтому проведение современной антикоагулянтной терапии невозможно без надлежащего лабораторного контроля состояния системы гемостаза. Для контроля адекватности проводимой терапии необходимо 2 раза в сутки определять время свертывания крови или АЧТВ. При исследовании времени свертывания крови дозировку и введение гепарина натрия следует подбирать таким образом, чтобы поддерживать этот показатель в пределах 15–23 мин, а АЧТВ — в 2–3 раза выше нормы.

### **13.4.2. НЕПРЯМЫЕ АНТИКОАГУЛЯНТЫ, ПРОТРОМБИНОВОЕ ВРЕМЯ, МЕЖДУНАРОДНОЕ НОРМАЛИЗОВАННОЕ ОТНОШЕНИЕ**

Определению ПВ отводят ведущую роль в контроле лечения непрямыми антикоагулянтами. Результаты исследования традиционно выражают в секундах. Напомним, что при лабораторном определении ПВ к плазме пациента добавляют активатор свертывания крови — тромбопластин (фактор III). Именно поэтому ПВ зависит от качества (чувствительности) используемого для этих целей тромбопластина. Если в лаборатории (или лабораториях) сегодня используют один тромбопластин, а завтра другой, то ПВ у пациента будет отличаться день ото дня. Чтобы исключить это влияние тромбопластина на результаты определения ПВ, применяют показатель международного нормализованного отношения (МНО). Он позволяет выразить результаты ПВ, принимая во внимание различную активность тромбопластина,

который используют для анализа в разных лабораториях. В результате МНО обеспечивает возможность сравнения результатов, полученных в разных лабораториях, и гарантирует более точный контроль лечения непрямыми антикоагулянтами. Показатель МНО рассчитывают путем деления ПВ пациента (с) на значения нормального или контрольного ПВ (с). Затем результат возводят в степень, показатель которой равен международному индексу чувствительности (МИЧ) тромбопластина, используемого в лаборатории при проведении анализа:

$$\text{МНО}_{\text{пациента}} = \left( \frac{\text{ПВ}_{\text{пациента}}}{\text{ПВ}_{\text{контроля}}} \right)^{\text{МИЧ}}$$

Основная задача мониторинга приема непрямым антикоагулянтов — предупреждение кровотечения. Доза антикоагулянта должна быть подобрана таким образом, чтобы поддерживать МНО на необходимом уровне, зависящем от характера заболевания. У большинства больных МНО необходимо поддерживать на уровне 2,0–3,0. В некоторых случаях значения МНО должны быть выше (табл. 13.3).

**Таблица 13.3.** Рекомендуемые уровни антикоагулянтов в международном нормализованном отношении при различных заболеваниях

Клиническое состояние	Рекомендуемое МНО
Профилактика тромбоза глубоких вен	2,0–3,0
Лечение тромбоза глубоких вен и легочной тромбоэмболии	2,0–3,0
Возвратный тромбоз глубоких вен, легочной тромбоэмболии	2,0–3,0
Протезы сердечных клапанов из собственной ткани	2,0–3,0
Механические протезы сердечных клапанов	2,5–3,5
Сосудистые заболевания, включая ИМ	3,0–4,5

Больным, получающим лечение непрямыми антикоагулянтами, МНО необходимо определять каждые 2–3 нед.

## 13.5. ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КОАГУЛОЛОГИИ

Контакт крови с поврежденной сосудистой стенкой или чужеродной поверхностью, замедление и остановка кровотока (стаз) приводят к последовательной активации звеньев гемостаза: адгезии и агрегации тромбоцитов, каскадной активации плазменных белковых факторов, формированию протромбиназы, образованию тромбина, а затем фибринового сгустка.

Для оценки способности плазменной системы гемостаза к образованию сгустка, определения активности свертывающих факторов крови и наличия продуктов тромбообразования в КДЛ используют различные методы. В основе большинства лабораторных тестов оценки плазменного звена гемостаза лежит клоттинговый (от англ. *clot* — сгусток) принцип. Сущность всех клоттинговых тестов состоит в определении времени образования фибринового сгустка после добавления в исследуемую плазму ионов кальция и активатора коагуляционного гемостаза (тромбопластин, тромбин). В свою очередь, для измерения времени образования сгустка в клоттинговых тестах используют приборы, называемые коагулометрами, анализаторами свертывания крови или гемостаза.

### 13.5.1. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА

Для исследования показателей системы гемостаза применяют несколько групп методов, основанных на разных принципах.

- Клоттинговые, основанные на регистрации времени образования сгустка.
- Хромогенные, основанные на фотометрическом определении активности факторов по расщеплению хромогенных или флуорогенных субстратов.
- Иммунологические или иммунохимические, основанные на реакции антиген—антитело (ИФА, латексная агглютинация, нефелометрия, турбидиметрия и др.).

**Клоттинговые методы** исследования плазменного гемостаза относят к наиболее широко используемым методам диагностики свертывающей системы крови. Они основаны на регистрации времени образования фибринового сгустка, точнее — на измерении промежутка времени с момента внесения реагента, запускающего ферментативный процесс свертывания плазмы (каскад реакций), до момента коагуляции — образования фибринового сгустка (нитей фибрина). В зависимости от присутствия в реакционной пробе тех или иных активаторов либо ингибиторов, добавляемых при проведении исследования, можно оценивать активность отдельных звеньев или путей плазменного гемостаза. Клоттинговые методы позволяют выполнять исследования протромбинового теста (протромбиновое отношение, по Квику, МНО), определение концентрации фибриногена, АЧТВ, тромбинового времени, антитромбина III, определение активности фактора VIII и IX свертывающей системы, волчаночного антикоагулянта и др. Такой достаточно большой перечень клоттинговых тестов,



используемых в лаборатории, обусловлен тем, что каждый из тестов подходит для детектирования нарушений в каком-либо одном звене гемостаза, не диагностируя при этом другие возможные изменения. Именно поэтому для целостного представления о состоянии системы гемостаза или выявления дефектного звена приходится использовать обширный спектр тестов.

Например, АЧТВ используют как скрининговый тест для оценки внутреннего пути активации коагуляционного гемостаза. Метод основан на измерении времени свертывания бестромбоцитарной плазмы при добавлении в нее оптимального количества кальция хлорида или каолина, что обеспечивает стандартизацию контактной активации факторов свертывания. Реагент для АЧТВ содержит контактный активатор (суспензия каолина) и фосфолипиды (кефалин). Контакт плазмы с частицами каолина стимулирует продукцию активного фактора XII (XIIa), предоставляя поверхность для функционирования высокомолекулярного кининогена, калликреина и фактора XIIa. Фосфолипиды необходимы для образования комплексов с активным фактором X (Xa) и протромбином. После определенного времени инкубации в реакционную смесь добавляют кальция хлорид. Тем самым имитируют запуск свертывания по внутреннему пути и определяют возможный дефицит факторов, участвующих в нем, либо наличие ингибиторов свертывания.

В свою очередь, ПВ — скрининговый тест для оценки внешнего пути активации коагуляционного гемостаза. ПВ используют для определения активности фактора VII и контроля лечения непрямыми антикоагулянтами. ПВ представляет собой коагуляционный тест, в котором определяют время свертывания плазмы пациента после добавления к ней смеси тканевого тромбопластина и ионов кальция, что приводит к запуску свертывания по внешнему пути.

Определение тромбинового времени позволяет оценить конечный этап коагуляционного гемостаза (фибринообразование). Метод заключается в определении времени свертывания плазмы при добавлении в нее раствора стандартного тромбина, который обладает способностью индуцировать превращение фибриногена в фибрин без участия других факторов свертывания крови. Тромбиновое время зависит от концентрации фибриногена, его свойств и наличия в крови ингибиторов тромбина (гепарин, антитромбин III).

Для определения ключевого фактора свертывания крови — фибриногена — также используют клоттинговые методы. Определение фибриногена по Клауссу считают наиболее адекватным тестом. Оно основано на определении времени образования сгустка при добавлении высокой

концентрации тромбина к разбавленной в 10–20 раз плазме. При этом логарифм времени образования сгустка прямо пропорционален логарифму концентрации фибриногена. Если время свертывания очень короткое ( $< 5$  с), то тест проводят с использованием разведенной плазмы. Гравиметрический метод определения фибриногена заключается в высушивании и взвешивании сгустка, который образуется при добавлении к плазме 0,2 мл стандартного раствора тромбина.

Производство стандартизованных готовых форм реагентов и контрольных материалов, а также применение коагулометров сделало клоттинговые исследования быстрыми, точными, воспроизводимыми.

Ряд факторов свертывающей и противосвертывающей системы гемостаза служат ферментами, поэтому их можно исследовать по ферментативной активности. Для этого нужно к конкретному фактору подобрать такой субстрат, чтобы в результате ферментативной реакции образовалось вещество, хорошо поглощающее свет в видимой области спектра. По скорости образования этого вещества можно судить о ферментативной активности фактора. На этом принципе основаны методы определения активности антитромбина III, фактора VIII и IX, плазминогена и  $\alpha$ -2-антиплазмина.

Принцип реакции с применением хромогенных субстратов в коагулологии состоит в том, что синтетический пептид (или хромогенный субстрат) добавляют в реакционную пробу, он взаимодействует со специфическим ферментом (например, фактором свертывания), краситель высвобождается, и его количество измеряют фотометрически. По количеству высвободившегося красителя (интенсивности окраски) определяют активность искомого фактора. Фотометрию проводят в интервале длин волн 405–410 нм на фотометрах. Эти тесты схожи с тестами клинической биохимии, поэтому легко автоматизируются и могут выполняться на биохимических анализаторах.

Принцип тестов с хромогенными субстратами представлен на рис. 13.4. Фактор свертывающей системы крови, обладающий ферментативной (протеазной) активностью, расщепляет короткоцепочечный пептид (из 3–10 аминокислот), к которому через эфирную связь пришит хромоген (паранитроанилин — рНА). Комплекс пептид–рНА имеет максимум поглощения в области короткого УФ, свободный рНА — при 380 нм. Итоговая концентрация рНА пропорциональна активности фактора свертывания крови, ее определяют по увеличению поглощения светового пучка с длиной волны 405 нм.

**Иммунологические или иммунохимические методы.** Большинство факторов свертывающей и противосвертывающей системы служит белковыми соединениями, к которым могут быть получены антитела

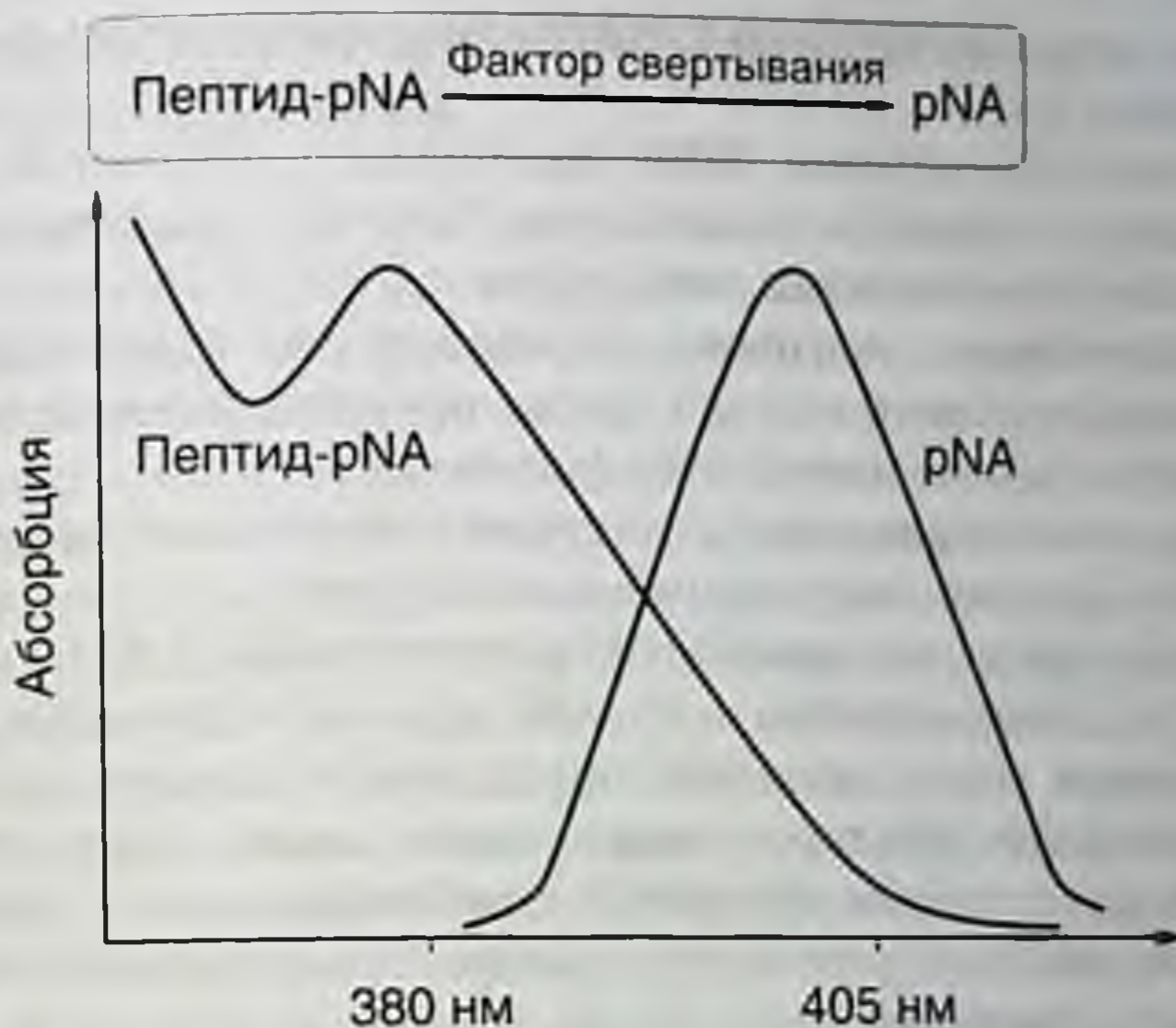


Рис. 13.4. Принцип определения активности протеолитического фермента (протеазы) с использованием хромогенного субстрата

и соответственно можно использовать реакцию антиген–антитело для количественного определения конкретного фактора. Этим иммунохимические методы отличаются от коагуляционных, в которых определяют функциональную активность компонентов свертывающей системы, а не их концентрацию. В КДЛ доступны иммунохимические методы для ручного и автоматизированного определения ряда компонентов свертывающей системы крови, основанные на латекс-агглютинации и методе ИФА.

При применении латекс-агглютинации результаты анализа оценивают визуально или на автоматизированных нефелометрах. В методе ИФА для выявления концентрации факторов гемостаза, как правило, используют принцип «сэндвича». На стенки микропланшета наносят антитела к исследуемому фактору гемостаза (твердая фаза). После добавления плазмы происходит осаждение специфического антигена (белка системы гемостаза) на фиксированных антителах. Плашка промывается и заполняется вторичными антителами, взаимодействующими с этим же белком, но по другим эпитопам (антигенным структурам). Вторичные антитела конъюгированы с ферментом. После отмычки несвязавшихся антител добавляется субстрат ферментативной реакции и хромоген. Изменение светопропускания раствора пропорционально

количеству антигена (фактора свертывания), осажденного на фиксированных антителах.

Использование методов ИФА предполагает оснащение лаборатории иммуноферментным фотометром, инкубатором, промывающим устройством и пипеточными дозаторами.

Все многообразие методов для оценки свертывающей системы крови можно разделить на две группы: ориентировочные (интегральные, общие) и «локальные» (специфические).

К числу ориентировочных (интегральных) относят методы, характеризующие процесс коагуляции в целом (время свертывания крови), его отдельные фазы, внешний (ПВ) и внутренний (АЧТВ) механизмы образования протромбиназы и группы факторов свертывания крови. Специфические тесты позволяют определять активность или концентрацию отдельных факторов свертывания крови, антикоагулянтной и плазминовой системы, продуктов тромбообразования. Они незаменимы для возможного уточнения локализации патологии с точностью до фактора свертывания.

Коагулологические методы исследования плохо поддаются стандартизации. Показатели тестов зависят от качества и состава реактивов и используемого оборудования.

Все клоттинговые тесты проводят в силиконированной или пластиковой посуде. Тесты проводят ручными методами на водяной бане с прозрачными стенками или в полуавтоматических и автоматических анализаторах гемостаза — коагулометрах. Ручные методы допускаются, но воспроизводимость и точность определения у них самая низкая. Это связано с невозможностью стандартизации процесса проведения анализа, осуществляемого разными операторами, а также со сложностью визуальной регистрации времени появления сгустка. Клоттинговые тесты ставят в дублях. Расхождение времени образования сгустка в одновременных исследованиях должно быть менее 0,5 с. Именно поэтому исследование параметров гемостаза предпочтительнее осуществлять с помощью коагулометров.

### 13.5.2. КОАГУЛОМЕТРЫ

Коагулометры или анализаторы гемостаза представляют собой приборы, предназначенные для проведения исследований свертывающей системы крови в КДЛ. Функция коагулометров состоит в регистрации начала коагуляции после добавления в анализируемую пробу (плазму) реагентов, активирующих свертывание крови.

### 13.5.2.1. КЛАССИФИКАЦИЯ КОАГУЛОМЕТРОВ ПО ПРИНЦИПУ ДЕЙСТВИЯ

Основным различием в принципе действия коагулометров считают способ регистрации образования сгустка в исследуемой пробе. Момент образования сгустка в коагулометрах может регистрироваться механическим способом (по остановке вращающегося в пробе стального шарика), оптическим (по резкому изменению оптической плотности реакционной смеси) или оптико-механическим (комбинация оптического и механического способов). На основе этого различия выделяют механические, оптические и оптико-механические типы коагулометров.

**Механические коагулометры.** Принцип работы таких коагулометров основан на механическом действии образующегося сгустка плазмы (крови) на шарик, помещенный в кювету с пробой. Шарик находится в кювете в наклонном положении. Пока в кювете с исследуемой плазмой не добавлен реагент, запускающий коагуляцию, шарик остается на одном месте. После добавления реагента начинается коагуляция, шарик, подхваченный сгустками плазмы, начинает вращаться, уходит от магнитного датчика, который регистрирует изменение магнитного поля как момент начала тромбообразования. Момент образования сгустка регистрируется по остановке вращающегося в пробе стального шарика. При других вариантах устройства коагулометра регистрируется прекращение вращения внутри кюветы магнитной мешалки, захват сгустка опускающимся в кювету крючком или иные схемы, основанные на переходе жидкой плазмы в сгусток. Большинство механических коагулометров шариковые. Неоспоримым преимуществом механических коагулометров считают возможность регистрации коагуляции цельной крови, что остается актуальным в педиатрической практике и при скрининговом обследовании.

Принцип работы измерительной кюветы механического коагулометра приведен на рис. 13.5. Кювета с плазмой расположена под наклоном и вращается, шарик стоит на месте, не вращается. В кювету вносят плазму и добавляют активатор свертывания. Проба прогревается при 37 °С. Затем в кювету добавляют раствор кальция, который запускает свертывание крови. В момент свертывания шарик захватывается сгустком и начинает вращаться; как только шарик уходит от датчика, меняется магнитное поле, прибор регистрирует момент начала свертывания плазмы. При образовании нитей фибрина шарик останавливается, анализатор фиксирует время его остановки.

**Оптические коагулометры** улавливают момент образования фибринового сгустка по изменению способности плазмы пропускать

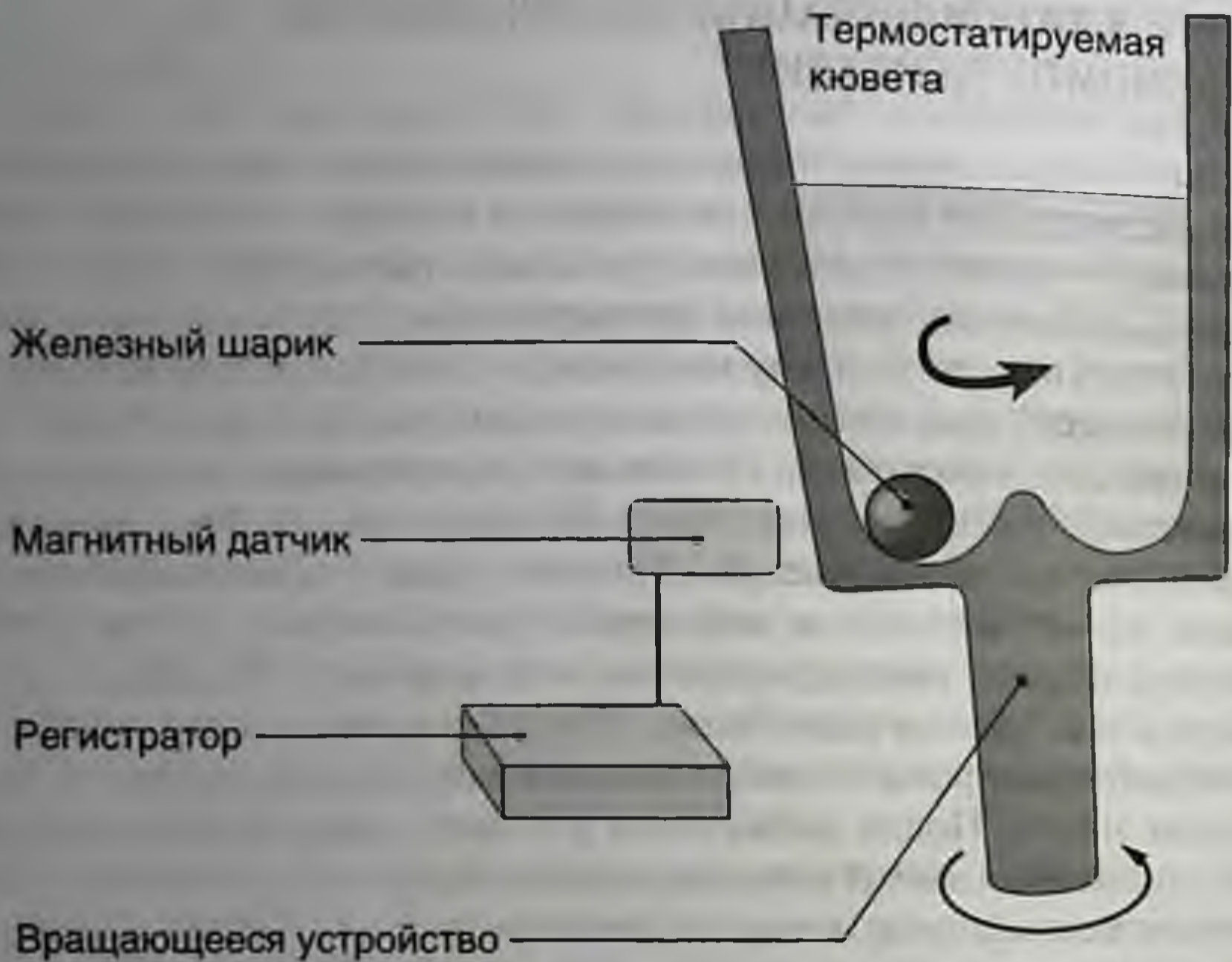


Рис. 13.5. Принцип работы механического коагулометра

свет (рис. 13.6). Источник излучения (светодиоды) направляет свет на прозрачную кювету с плазмой. Анализы с цельной (непрозрачной) кровью на таком типе коагулометров не производят. В момент добавления в кювету реагентов начинается образование нитей фибрина, которые изменяют плотность исследуемой плазмы. Выпавшие в кювете нити фибрина меняют световой поток, падающий на фотодиод. Фотоприемник фиксирует изменение оптической абсорбции, передает это изменение на процессор, который начинает отсчет времени коагуляции и анализирует данные. После проведения необходимых расчетов анализатор выдает результат анализа.

Существует несколько типов оптических коагулометров.

**Турбидиметрические коагулометры** регистрируют момент свертывания крови по приросту оптической абсорбции. При свертывании плазмы происходит резкое изменение светопропускания или рассеивания. В коагулометре программируют, при каком приросте оптической плотности по отношению к исходному уровню регистрируется момент свертывания. Время от внесения в оптическую кювету активатора свертывания до момента достижения заданного прироста оптической плотности определяется как время свертывания плазмы в исследуемом

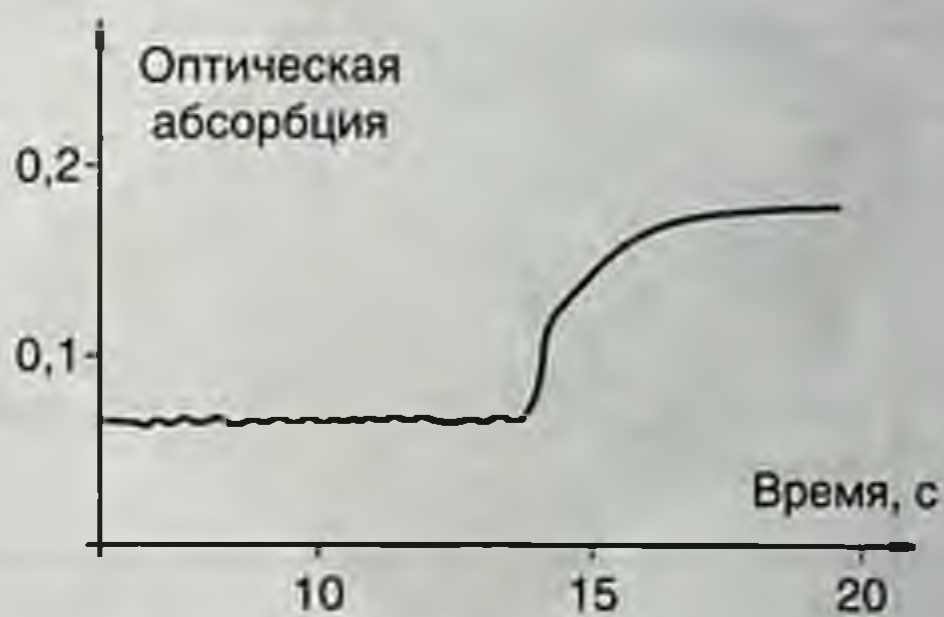
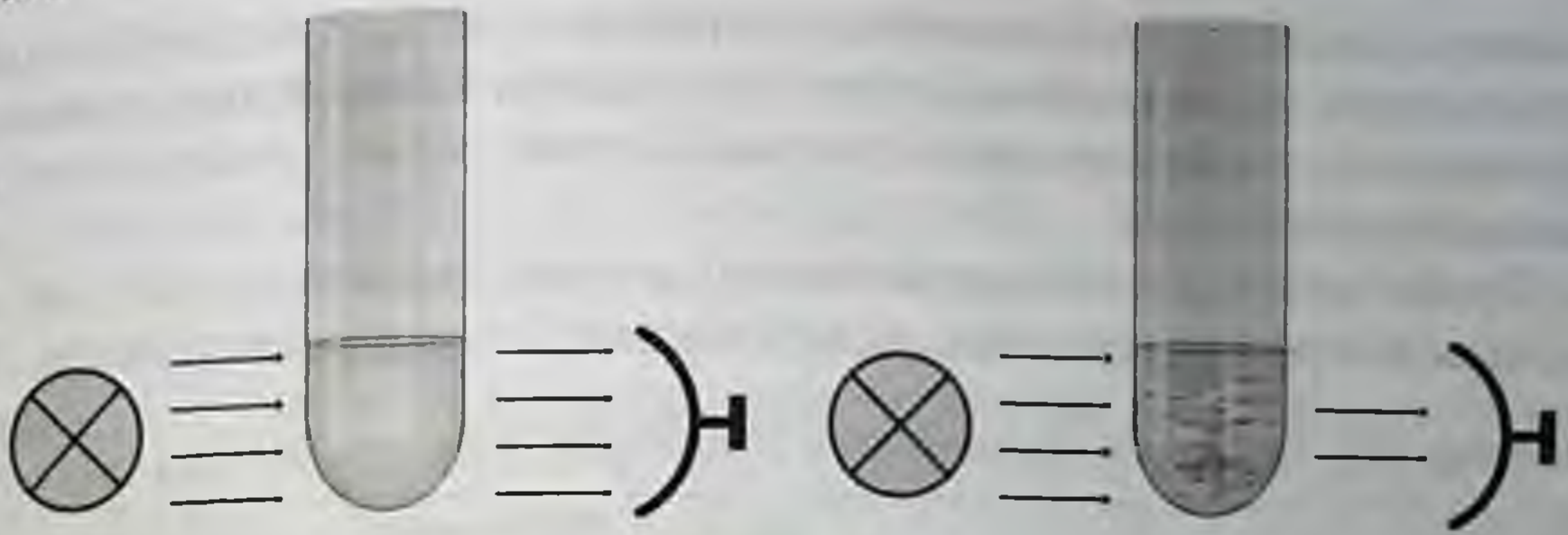


Рис. 13.6. Принцип оптической регистрации сгустка

тесте. Турбидиметрический принцип используют при определении показателей свертывания плазмы на многофункциональных фотометрах и биохимических анализаторах. Фотометрический канал при этом программируется на достижение фиксированной величины абсорбции.

**Нефелометрические коагулометры** определяют момент образования сгустка по изменению рассеяния света. Новейшие разработки в этой области технологий используют принцип определения сгустка по боковому рассеиванию света. Метод рассеивания обеспечивает высокое качество анализов — высокую специфичность и чувствительность метода детекции сгустка даже для липемичной или иктеричной плазмы.

**Оптико-механические коагулометры.** Коагулометры этого класса характеризуются способностью регистрировать выпадающие хлопья фибрина даже без формирования плотного сгустка, что бывает при приеме пациентами антикоагулянтов, а также в случаях коагулопатий. В этих анализаторах предусмотрена возможность выбора оптического или механического метода регистрации (то есть в одном приборе совмещены оба описанных ранее способа). Наличие двух способов регистрации фибринового сгустка делает эти приборы универсаль-

ными — их могут использовать при работе с любым видом биопробы (плазма или цельная кровь, в том числе капиллярная кровь из пальца) в различных разбавлениях и с применением любых реактивов, в том числе непрозрачных.

Различные коагулометров по способам регистрации сгустка и их возможностям выполнять коагуляционные тесты суммированы в табл. 13.4.

Таблица 13.4. Различия коагулометров в способах регистрации сгустка

Виды тестов и проб	Механический	Оптический		Оптико-механический
		Турбидиметрия	Нефелометрия	
Клоттинговые тесты	Да	Да	Да	Да
Хромогенные тесты	Нет	Да	Нет	Нет
Иммунотурбидиметрические тесты (D-димер)	Нет	Да	Нет	Нет
Вид пробы	Плазма, капиллярная кровь	Плазма	Плазма	Плазма, капиллярная кровь
Исследование липемичных, иктеричных, гемолизированных проб	Да	Нет	Нет	Да
Перемешивание реакционной смеси (шарик, стержень)	Да	Да	Нет (отсутствие мешалок)	Да
Адаптация к любым реагентам	Да	Нет	Нет	Да
Автозапуск измерения	Нет (стартовая пипетка или запуск вручную)	Да	Да	Да

### 13.5.2.2. КЛАССИФИКАЦИЯ КОАГУЛОМЕТРОВ ПО УРОВНЮ АВТОМАТИЗАЦИИ

По степени автоматизации процесса подачи исследуемых проб плазмы и реагентов коагулометры делят на две основные группы: полуавтоматические и автоматические.

Полуавтоматические коагулометры представляют собой программируемые механические, оптические или оптико-механические анализаторы, в которых дозирование плазмы и реагентов осуществляет специа-



лист лаборатории, а измерение времени образования сгустка и пересчет времени свертывания в единицы теста выполняется прибором автоматически. Полуавтоматические анализаторы позволяют определить результаты при незначительных объемах пробы — 50–100 мкл, что снижает расход реагентов и сводится к минимуму объем забираемой крови. Общий вид одного из полуавтоматических коагулометров приведен на рис. 13.7. По числу регистрирующих каналов полуавтоматические коагулометры подразделяют на одно-, двух- и четырехканальные.



Рис. 13.7. Двухканальный полуавтоматический коагулометр

С помощью полуавтоматических коагулометров можно осуществлять ВКК по всем определяемым показателям, а у двух- и четырехканальных коагулометров предусмотрена возможность дублирующих определений и вычисления коэффициента вариации (CV, %) между двумя каналами. При проведении измерений в двух каналах одновременно (парное измерение одной и той же биопробы) осуществляется расчет среднего значения. В коагулометрах реализован автоматический алгоритм контроля качества калибровок: при неверной калибровке анализатор выдает соответствующее сообщение-подсказку и не позволяет проводить дальнейшие измерения. Вместе с тем процедуру ВКК осуществляют ручным способом — исследование контрольных образцов плазмы трех уровней.

В автоматических коагулометрах добавление и изменение объемов применяемых реагентов, подача образцов плазмы для исследования происходят автоматически без участия специалиста лаборатории, также имеется алгоритм, позволяющий одновременно выполнять разные тесты для образцов плазмы, автоматическую регистрацию и запоминание результатов исследования с возможностью последующей обработ-

ки этих данных. Другими словами, в автоматических коагулометрах все элементы аналитического процесса выполняются без участия специалиста лаборатории. Автоматические анализаторы гемостаза обладают большим спектром определяемых параметров коагулограммы и имеют высокую производительность. Один из автоматических коагулометров представлен на рис. 13.8.



Рис. 13.8. Четырехканальный автоматический коагулометр

По числу регистрирующих каналов автоматические коагулометры, так же как и полуавтоматические, подразделяют на одно-, двух-, четырех- и многоканальные. Большинство современных автоматических коагулометров являются четырех- или многоканальными, этим достигается высокая производительность данных анализаторов. Число каналов, как правило, не бывает более 10.

Конструкция всех имеющихся на современном рынке моделей автоматических коагулометров позволяет автоматизировать процесс от загрузки проб до получения конечного результата, а также проводить обработку большого количества (до 40) проб за одну загрузку, что позволяет получить производительность до 360 тестов в час. Несколько приборов могут быть объединены в единую сетевую систему с централизованным управлением. Автоматические коагулометры, как правило, являются открытыми системами. Они могут быть адаптированы к реагентам любых производителей. В коагулометрах реализован автоматический контроль качества.

**КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ**

1. Назовите основные звенья свертывания крови.
2. Перечислите основные факторы свертывания крови.
3. Какие тесты характеризуют сосудистый компонент гемостаза?
4. Какие тесты характеризуют сосудисто-тромбоцитарный компонент гемостаза?
5. Какие тесты характеризуют плазменный компонент гемостаза?
6. Какие тесты используют для диагностики тромбозов глубоких вен и ТЭЛА?
7. Какие тесты используют для контроля антикоагулянтной терапии?
8. Что такое МНО и как его определяют?
9. Перечислите методы оценки системы гемостаза.
10. Какова классификация коагулометров по типу действия?

# ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Иммунная система — относительно самостоятельная структурно-функциональная система организма, контролирующая клеточный и гуморальный состав его биологических жидкостей и тканей. Основная функция иммунной системы состоит в защите организма от чужеродных агентов и измененных потенциально опасных собственных компонентов.

Иммунные реакции направлены на поддержание постоянства внутренней среды организма, нарушаемого поступлением в него микроорганизмов, вирусов, а также других чужеродных веществ животного и растительного происхождения. Эти реакции носят приспособительный характер, но в силу некоторых причин могут нарушаться, вызывая повреждение клеток, ее собственных структур и, как следствие этого, аутоиммунные и аллергические заболевания.

## 14.1. ОБЩИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О СТРУКТУРЕ И ФУНКЦИИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

Иммунная система представлена совокупностью органов и тканей, среди которых принято выделять центральные, где происходит созревание лимфоцитов, и периферические, где расположены зрелые лимфоциты.

К центральным органам иммунной системы относят костный мозг и тимус (вилочковая железа).

**Костный мозг.** Все клетки иммунной системы происходят из стволовых клеток костного мозга, которые дифференцируются в лимфо-, грануло-, моно-, эритро- и мегакариоциты. В костном мозге происходят раннее антиген-независимое созревание и дифференцировка части

лимфоцитов. Эти лимфатические клетки, находящиеся или поступившие в кровь и ткани из костного мозга, относятся к В-лимфоцитам (В — начальная буква от английского названия костного мозга *bone marrow*).

Тимус расположен в грудной клетке — между грудиной и трахеей. Его масса у новорожденных составляет 10–15 г, в возрасте 9–12 лет масса вилочковой железы достигает максимума — 30–40 г, после чего рост прекращается, а в 25–27 лет она начинает медленно атрофироваться.

Тимус буквально заполнен лимфоцитами, которые поступают в него из костного мозга. Из стволовых кроветворных клеток костного мозга формируются стволовые лимфоидные клетки — предшественники Т-лимфоцитов. Последние мигрируют в тимус, где под влиянием его гормонов (тимозина) и происходит их окончательная дифференцировка в зрелые Т-лимфоциты. В тимусе клетки на 90–95% представлены Т-лимфоцитами. Клетки, находящиеся в самом тимусе или поступившие в кровь и ткани из тимуса, обозначают как Т-лимфоциты (Т — начальная буква от англ. названия тимуса — *thymus*).

Таким образом, в тимусе происходят превращения лимфоцитов в иммунокомпетентные клетки, которые участвуют в иммунном ответе. Часть лимфоцитов остается в костном мозге, где формируется популяция клеток, которая в дальнейшем поступает в лимфатические узлы и селезенку, пейеровы бляшки кишечника, миндалины и другие лимфоидные органы.

**Периферические органы иммунной системы** — периферические лимфатические узлы, селезенка, лимфатические фолликулы желудочно-кишечного тракта. Эти органы связаны между собой кровеносными и лимфатическими сосудами. Перемещаясь по этим сосудам, лимфоциты получают информацию об антигенах (чужих и собственных) и передают ее во все органы иммунной системы.

**Лимфатические узлы** — периферические органы иммунной системы, расположенные по ходу лимфатических сосудов. Они задерживают антигены (например, бактерии) и предотвращают их распространение. Морфологически лимфатические узлы состоят из стромы (рыхлая соединительная ткань) и паренхимы, в которой различают корковое и мозговое вещество. Корковое вещество содержит лимфатические фолликулы, состоящие в основном из В-лимфоцитов. Т-лимфоциты расположены преимущественно в паракортикальной зоне.

**Селезенка** задерживает и уничтожает антигены, циркулирующие в крови. Лимфоидная ткань селезенки представлена островками белой пульпы, которые подобно лимфатическим узлам имеют фолликулярное строение и разделены на В- и Т-зависимые зоны.

*Лимфатические фолликулы желудочно-кишечного тракта* — нёбные миндалины, собственно лимфатические фолликулы и пейеровы бляшки кишечника. Лимфатические фолликулы также разделены на В- и Т-зависимые зоны.

**Клетки иммунной системы.** *Центральной фигурой иммунной системы служит лимфоцит.* В зависимости от размера различают малые, средние и большие лимфоциты. В периферической крови встречаются преимущественно малые и редко средние лимфоциты. Лимфоциты составляют 30–40% всех лейкоцитов крови. Они поистине вездесущи и перемещаются по всем тканям организма. Большое их количество сосредоточено в слизистой оболочке зева и кишечника. Перемещаясь из тканей в кровотоки и обратно, лимфоциты осуществляют своеобразный «надзор» за клеточным составом периферических органов и тканей. Лимфоциты содержат рецепторы, позволяющие каждой клетке распознавать отдельный антиген и реагировать на него. Они делятся на Т- и В-лимфоциты. Т-лимфоциты составляют 70–80%, а В-лимфоциты — 10–15% лимфоцитов крови. Оставшиеся лимфоциты называют нулевыми клетками.

Способность человека противостоять атаке микроорганизмов (прежде всего бактерий и вирусов) в значительной степени зависит от выработки антител. Из лимфоцитов под действием определенных антигенов могут образовываться плазматические клетки, которые, в свою очередь, служат основным источником синтеза антител. Антитела — белки иммуноглобулины, которые связываются с бактериями и вирусами и нейтрализуют их. Каждое антитело специфично, то есть оно способно связываться только с одним видом бактерий или вирусов и не действует на другие. Эта специфичность обусловлена природой молекул, находящихся на поверхности каждого вида бактерий или вирусов. Такие молекулы называют антигенами. Распознавание лимфоцитами специфических бактериальных или вирусных антигенов запускает продукцию специфических антител. Способность организма вырабатывать антитела к чужеродным молекулам не ограничивается антигенами, находящимися на поверхности бактерий и вирусов. Белки и другие вещества на поверхности любых «не своих» клеток рассматриваются как антигены и вызывают продукцию антител. Такой ответ, например, характерен при отторжении пересаженной почки после трансплантации. Таким образом:

- антиген — любое вещество (чаще белок, но может быть и углевод), вызывающее выработку антител лимфоцитами, они преимущественно (но не обязательно) находятся на поверхности клеток;

- антитело — белок (иммуноглобулин), который циркулирует в плазме крови и связывается с антигеном, вызвавшим его образование.

Когда антитело связывается с антигеном, находящимся на поверхности бактерии, вируса или тканевой клетки, это неизбежно приводит к разрушению такой клетки.

Помимо лимфоцитов к клеткам иммунной системы относят фагоциты.

*Фагоциты* — макрофаги, моноциты, гранулоциты, которые мигрируют в очаг воспаления, проникая в ткани сквозь стенки капилляров. Они обладают способностью поглощать и переваривать чужеродные антигены.

Все макрофаги образуются из стволовой клетки костного мозга. Непосредственными же их предшественниками служат моноциты периферической крови. Образовавшись в костном мозге, моноциты первоначально устремляются в кровеносное русло, откуда обычно через 1–2 сут переходят в органы и ткани, где замещают отслужившие свой срок макрофаги, либо перемещаются в область воспаления у больного человека. Макрофаги способны стимулировать другие клетки, например, фибробласты, способные синтезировать волокнистые структуры соединительной ткани — коллаген, который затягивает раны.

*Макрофаги* представляют собой большие клетки, играющие важную роль в формировании неспецифического иммунитета. Часть макрофагов постоянно находится в кровеносном русле и лимфатической системе, но большинство их ведет оседлый образ жизни, сосредоточившись в селезенке, лимфатических узлах, печени и других тканях.

Основная функция макрофагов — очищение организма от бактерий, вирусных частиц, продуктов распада собственных тканей, токсинов, остатков эритроцитов, отживающих клеток, аллергенов белковой природы и т.д. Основным механизмом, который используют макрофаги для реализации своих функций, — поглощение (фагоцитирование) разнообразного материала — от бактерий до молекул химических красителей. В связи с такой способностью макрофаги называют еще фагоцитами. Для поглощения и переваривания чужеродных веществ в макрофаге существует специальный аппарат, состоящий из вакуолей, лизосом, заполненных высокоактивными ферментами, расщепляющими белки, жиры, углеводы и нуклеиновые кислоты, то есть те компоненты, из которых состоят чужеродные антигены (бактерии, вирусы и другие вещества).

Иммунные функции выполняют и многие другие клетки крови. Так, моноциты и нейтрофилы фагоцитируют и выводят из организма чуже-

родные клетки и вещества, эозинофилы играют важную роль в защите от гельминтов и простейших, базофилы и тучные клетки участвуют в организации очага воспаления. Клетки кожного покрова и слизистых оболочек создают механический и иммунологический барьер на пути проникновения болезнетворных агентов.

В иммунных реакциях участвуют многие гуморальные факторы защиты, такие как система комплемента, ферменты — лизоцим, муцин, белки острой фазы (СРБ) и др.

Иммунные механизмы отражают действие взаимосвязанных между собой клеток, тканей и органов, совокупность которых и называют иммунной системой. Оптимальный иммунный ответ реализуется только при взаимодействии клеточного, гуморального и неспецифических звеньев иммунитета.

### 14.1.1. КЛЕТОЧНЫЕ ФАКТОРЫ ИММУНИТЕТА

Клеточный иммунитет представлен различными популяциями Т- и В-лимфоцитов, соотношение которых играет важную роль для оценки состояния этого звена иммунитета. Их родоначальником являются стволовые лимфоидные клетки, в последующем дифференцирующиеся (превращающиеся) в тимусе в Т-лимфоциты, а в костном мозге — в В-лимфоциты (в этих органах происходит созревание лимфоцитов).

В-клетки называют костномозговыми, так как стволовые клетки костного мозга, взаимодействуя с клеточным микроокружением, трансформируются в В-лимфоциты непосредственно в костном мозге. Согласно современным представлениям, развитие В-лимфоцитов проходит стадийно от стволовой клетки к ранним и поздним предшественникам и, наконец, к зрелой клетке. В-лимфоциты участвуют в выработке антител.

В состав Т-лимфоцитов входят клетки, выполняющие различные функции в иммунном ответе. Одни Т-лимфоциты помогают определенным В-лимфоцитам вырабатывать специфические антитела к антигенам. Они получили название Т-лимфоциты-помощники, или хелперы (от англ. help — помощь). Другие лимфоциты принимают активное участие в развитии аллергических реакций — Т-лимфоциты-эффекторы. Наконец, третья группа лимфоцитов — Т-лимфоциты-супрессоры, участвуют в подавлении иммунных реакций. В настоящее время известны и многие другие популяции Т-лимфоцитов.

Т-лимфоциты несут на своей поверхности маркеры — антигены. Антигены клеточной поверхности лимфоцитов, выявляемые в лабора-



тории с помощью моноклональных антител к ним, принято называть кластерами дифференцировки и обозначать латинскими буквами CD. CD нумеруют по мере их выявления (открытия). Именно поэтому нередко вместо названия клона Т-лимфоцитов лаборатория в бланке результата анализа указывает их условное обозначение. Например, Т-лимфоциты-хелперы обозначают CD4, Т-лимфоциты-супрессоры — CD8. Т-лимфоциты выступают в роли первичных стимуляторов В-лимфоцитов и моноцитов крови, тканей. Это достигается либо посредством выделения ими гуморальных факторов (интерлейкинов и лимфокинов), либо путем прямого контакта с В-клетками.

Таким образом, популяция Т-лимфоцитов подразделяется на три основных подкласса: хелперы (помощники), супрессоры (подавители) и эффекторы, оказывающие цитотоксическое действие на чужеродные клетки. Зрелые Т-лимфоциты «отвечают» за реакции клеточного иммунитета и осуществляют иммунологический надзор за антигенным гомеостазом в организме.

В-лимфоциты (в отличие от Т-лимфоцитов) служат основными клетками, обеспечивающими формирование гуморального иммунитета. В процессе иммунного ответа они дифференцируются в плазматические клетки, способные синтезировать антитела — иммуноглобулины. В-лимфоциты ведут «оседлый образ жизни», в основном в периферических лимфоидных органах.

Зрелые Т-лимфоциты мигрируют с кровотоком во вторичные лимфоидные органы, лимфатические узлы. В лимфатических узлах в ответ на контакт с любым антигенным стимулом (например, бактериями) происходит активация и пролиферация Т-лимфоцитов с преимущественным размножением определенного клона клеток, имеющего рецепторы к внедрившимся антигенам. Резкое увеличение специфического клона Т-лимфоцитов отмечают на 7–9-е сутки при первичном иммунном контакте с чужеродным антигеном или на 4–5-е сутки — при вторичном.

Т-лимфоциты выполняют в организме две важные функции: эффекторную и регуляторную. Эффекторная функция Т-лимфоцитов состоит в уничтожении специфических чужеродных клеток и антигенов. Главными исполнителями этой функции служат цитотоксические Т-лимфоциты (Т-супрессоры). Регуляторная функция (система Т-хелперы–Т-супрессоры) состоит в контроле интенсивности развития специфической реакции иммунной системы на чужеродные антигены. Т-хелперы усиливают, а Т-супрессоры угнетают иммунный ответ. Именно поэтому для оценки выраженности иммунного ответа рассчитывают индекс Т-хелперы/Т-супрессоры.

Зрелые В-лимфоциты мигрируют из костного мозга в периферические лимфоидные органы и ткани, где под влиянием антигена (бактерии, вирусы) и при помощи Т-лимфоцитов и макрофагов превращаются в зрелые плазматические клетки. Каждая из них участвует в синтезе иммуноглобулинов (антител), специфических данному антигену. При первичном контакте с определенным антигеном синтез иммуноглобулинов начинается через 3 сут, при повторном — к концу первых суток. Антитела нейтрализуют токсины, продуцируемые чужеродными клетками.

Часть специфических к данному антигену В-лимфоцитов сохраняет эту специфичность многие годы. Это так называемые клетки памяти. Они могут длительно сохраняться в селезенке, лимфатических узлах, аппендиксе, миндалинах. Однако любой повторный контакт со знакомым ранее антигеном приводит к быстрой активации специфического клона В-лимфоцитов и синтезу необходимых антител (уже к концу первых суток) для уничтожения чужеродного антигена. На этих особенностях формирования иммунного ответа основана вакцинация против наиболее распространенных инфекционных заболеваний.

Таким образом, основной функцией В-лимфоцитов служит продукция антител. Известно 5 классов иммуноглобулинов, которые сокращенно обозначают английскими буквами *Ig* (от англ. immunoglobulin). Это иммуноглобулины М (*IgM*), G (*IgG*), А (*IgA*), D (*IgD*) и E (*IgE*).

### 14.1.2. ГУМОРАЛЬНЫЕ ФАКТОРЫ ИММУНИТЕТА

Стимуляция В-лимфоцитов антигеном, реагирующим с поверхностными рецепторами клеток и Т-лимфоцитами, приводит к их превращению в плазматические клетки, которые продуцируют антитела — иммуноглобулины.

Иммуноглобулины — факторы гуморального иммунитета, которые представляют собой сложные белки, различающиеся между собой по молекулярной массе, электрофоретической подвижности, содержанию углеводов и иммунологической активности.

Все иммуноглобулины построены по общему типу. Их молекулы состоят из двух тяжелых (H-цепи) и двух легких цепей (L-цепи), соединенных между собой. Известно пять разных классов H-цепей (каждый со своими особыми свойствами), соответственно имеется пять классов иммуноглобулинов. *IgM*, *IgG*, *IgA*, *IgD* и *IgE*.

Иммуноглобулины класса G — основной вид иммуноглобулинов в крови человека. Они составляют 75% всех иммуноглобулинов сыворотки крови. С ними связан процесс гуморальной защиты организма

человека от воздействия многих бактерий и вирусов, а также их токсинов. Иммуноглобулины класса G имеют небольшую молекулярную массу — 150 000 Да, что обеспечивает им возможность проникать через плаценту от матери к плоду. Определение таких специфических антител к определенным видам возбудителей инфекционных заболеваний у новорожденного (например, определение антител IgG к цитомегаловирусу) создает значительные трудности для исключения внутриутробного инфицирования.

Усиленная продукция антител IgG плазматическими клетками начинается лишь после повторного взаимодействия с антигеном. У детей значительное увеличение концентрации иммуноглобулинов в крови наступает к 1,5–2 годам их жизни. При контакте с инфекционным агентом специфические антитела класса IgG начинают повышаться в крови к концу 1-й недели, достигают пика ко 2–3-му месяцу и могут сохраняться многие годы.

Иммуноглобулины класса A включают два вида специфических белков: сывороточный и секреторный. Сывороточный IgA входит в фракцию  $\beta$ -глобулинов и составляет до 15% иммуноглобулинов сыворотки крови. Секреторный IgA содержится в секретах (молоко, слюна, слезная жидкость, секреты кишечного и респираторного тракта). Антитела класса IgA синтезируются в основном лимфоцитами слизистых оболочек в ответ на местное воздействие антигена, осуществляют защиту слизистых оболочек от патогенных микроорганизмов, потенциальных аллергенов и аутоантигенов. Связываясь с микроорганизмами, IgA антитела тормозят их прилипание к поверхности клеток эпителия и препятствуют их проникновению во внутреннюю среду организма, предупреждая тем самым развитие хронических местных воспалительных процессов. Локальный синтез IgA обуславливает местный иммунитет. Проникая во внутреннюю среду организма, IgA инактивирует бактерии и вирусы, активирует систему комплемента.

Иммуноглобулины M относят к  $\gamma$ -глобулиновой фракции сыворотки крови и составляют в ней около 5%. Эволюционно это самый старый класс иммуноглобулинов, поэтому они первыми вырабатываются в ответ на острую инфекцию, осуществляя антибактериальный иммунитет. К ним относят изогемагглютинины, антибактериальные, гетерофильные антитела, ревматоидный фактор. Иммуноглобулины M имеют большую молекулярную массу (около 900 000 Да) и не проникают через плаценту в кровь плода. В связи с этим обнаружение специфических антител класса IgM к определенному агенту (например, бледной спирохете) будет свидетельствовать об инфицировании новорожденного.

Иммуноглобулины класса D выявляют в плазме крови здоровых людей в низких концентрациях. Об их функциях известно немного. Они принимают участие в процессах дифференцировки лимфоцитов — способны блокировать активность иммуноглобулинов других классов.

На долю иммуноглобулинов класса E (IgE) приходится около 0,2% всех сывороточных иммуноглобулинов. IgE накапливаются преимущественно в тканях слизистых оболочек и кожного покрова, где сорбируются (оседают) на поверхности тучных клеток, базофилов и эозинофилов. В результате взаимодействия IgE со специфическим антигеном на поверхности этих клеток происходит их дегрануляция (выброс) и попадание в кровь таких биологически активных веществ, как гистамин, серотонин, что и лежит в основе возникновения многих аллергических состояний.

### 14.1.3. ФАГОЦИТОЗ И ДРУГИЕ МЕХАНИЗМЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЗАЩИТЫ

На всякое изменение внутренней среды организма реагирует система фагоцитоза.

Фагоцитоз — поглощение клеткой крупных частиц, видимых в микроскоп (например, микроорганизмов, крупных вирусов, поврежденных тел клеток и др.), с образованием вакуоли — фагосомы. Процесс фагоцитоза можно подразделить на две фазы. В первой фазе частицы, подлежащие удалению, связываются на поверхности мембраны клеток. Во второй фазе происходит собственно поглощение частицы клеткой и ее дальнейшее разрушение внутри клетки. Различают две основные группы клеток-фагоцитов: моно- и полинуклеарные. Полинуклеарные нейтрофилы составляют первую линию защиты от проникновения в организм разнообразных бактерий, грибков и простейших. Они уничтожают поврежденные и погибшие клетки, участвуют в процессе удаления старых эритроцитов и очистке раневой поверхности. Мононуклеарные фагоциты участвуют как в разрушении, так и в инициации (запуске) и стимуляции фибропластических процессов. Они способствуют синтезу биологически активных веществ и формированию иммунного ответа (путем модификации антигенов и представления их лимфоцитам). Таким образом, клетки мононуклеарно-фагоцитарной системы играют важную роль в инициации иммунного ответа: посредством захвата антигена, представления его Т-лимфоцитам и секреции интерлейкина-1 (основного активатора Т-лимфоцитов).

Изучение показателей фагоцитоза имеет значение в комплексном анализе и диагностике иммунодефицитных состояний: часто рецидивирующих гнойно-воспалительных процессах, длительно не заживающих ранах, склонности к послеоперационным осложнениям. Исследование системы фагоцитоза помогает в диагностике вторичных иммунодефицитных состояний, вызванных лекарственной терапией. В связи с тем что фагоциты участвуют в элиминации (удалении) иммунных комплексов, активность фагоцитоза тесно связана с активностью компонентов системы комплемента, концентрацией IgG-антител, наличием других факторов, исследование активности фагоцитоза играет важную роль в диагностике, оценке активности и эффективности лечения при ревматических заболеваниях, коллагенозах.

Система комплемента состоит из 9 последовательно активирующихся компонентов (белков) и 3 ингибиторов (угнетающих компонентов). Она играет важную роль в защите организма от всего чужеродного: разрушает бактериальные и инфицированные вирусами собственные клетки организма. Кроме того, система комплемента имеет большое значение в усилении фагоцитоза, нейтрализации вирусов, а также в иммунной адгезии (прилипанию), за счет которой к некоторым клеткам, включая и В-лимфоциты, прикрепляются комплексы антиген-антитело. Определенные компоненты комплемента участвуют в освобождении гистамина из тучных клеток. Эта система играет важную роль, особенно при воспалении и в развитии устойчивости организма к инфекционным агентам. Дефекты в системе комплемента сопровождаются снижением антиинфекционной резистентности организма.

Проникновение антигена в организм человека обычно вызывает характерные реакции со стороны клеточных и гуморальных факторов иммунной защиты. Далее рассмотрим основные закономерности развития иммунного ответа организма.

## 14.2. АЛГОРИТМ ИММУННОГО ОТВЕТА ОРГАНИЗМА

Каждый человек отличается индивидуальной реактивностью своей иммунной системы в отношении различных возбудителей инфекционных заболеваний. Однако, несмотря на это, формируемый иммунный ответ в отношении инфекционных агентов имеет общие для всех лиц закономерности.

Иммунные факторы защиты разделяют на две категории: антиген-неспецифические (врожденные) и антиген-специфические (приоб-

ретенные, адаптивные). Врожденные факторы защиты неспецифичны, действуют без участия механизмов распознавания и запоминания строения патогена (чужеродного антигена), поэтому представляют одни и те же реакции на любой стимул при инвазии или повреждении. Приобретенные факторы способны распознавать и запоминать особенности молекулярной структуры патогена (чужеродного антигена), в связи с чем при повторных контактах с ними защитный эффект может быть более быстрым и эффективным. В процессе иммунной защиты организма от патогена антиген-неспецифические и антиген-специфические группы факторов тесно взаимосвязаны и взаимодействуют друг с другом.

К антиген-неспецифическим факторам иммунной защиты относят:

- клетки пограничных тканей (кожи, слизистых оболочек дыхательных путей, пищеварительного и мочеполового тракта);
- макрофаги различных органов и тканей;
- клетки крови;
- эндотелиоциты и интиму артерий;
- циркулирующие и выделяемые с секретами водорастворимые молекулы — антиген-неспецифические гуморальные факторы.

Неспецифический иммунитет обеспечивает однотипные и простые реакции на любые чужеродные антигены. Иначе говоря, неспецифический иммунитет — это неспецифические антимикробные системы, наличие которых не зависит от предварительного контакта с антигеном. Главные клеточные компоненты неспецифического иммунитета — фагоциты, а главные неклеточные — система комплемента, цитокины, интерлейкины, СРБ и другие белковые комплексы. Основная задача фагоцитов — захватывать и переваривать микроорганизмы. К фагоцитам относят нейтрофилы и моноциты, которые присутствуют в крови, и макрофаги, которые содержатся в тканях. Система комплемента состоит из группы сывороточных глобулинов, которые, взаимодействуя в строго определенной последовательности (каскадом), разрушают как стенки микроорганизмов, так и стенки клеток собственного организма.

Одним из составляющих компонентов антиген-неспецифического механизма иммунной защиты от возбудителей инфекционных заболеваний служит фагоцитарная система крови, которая представлена в основном гранулоцитами (нейтрофильные, эозинофильные и, в меньшей степени, базофильные лейкоциты) и макрофагами. Нейтрофильные лейкоциты способны захватывать, убивать и переваривать разнообразные внеклеточно размножающиеся инфекционные агенты. Для выполнения этих функций лейкоциты генерируют активные формы кислорода (супероксид-анион-радикал, пероксид водоро-

да, гидроксильный радикал, синглетный кислород и др.) и множество дезинфектантов, образующихся в фагоцитах при низком рН в присутствии хлора и йода с участием миелопероксидазы (хлорноватистая кислота, надйодная кислота, хлорамин и др.). Выброс активных форм кислорода убивает бактериальные клетки. В целом, образование активных форм кислорода — эволюционно древний защитный механизм, лежащий в основе неспецифического иммунитета. Базофильные лейкоциты продуцируют гистамин и несут на своей поверхности рецепторы к IgE, поэтому вместе с тучными клетками играют важнейшую роль в развитии аллергического воспаления.

Среди антиген-неспецифических гуморальных факторов иммунной защиты большее значение имеет система комплемента, состоящая из 25–30 сывороточных и мембранных белков, которые участвуют в каскадной реакции (аналогичной механизму коагуляционного каскада), приводящей к различным биологическим результатам. В обычном состоянии участвующие в каскаде протеины неактивны. Для их активации необходим какой-либо стимул, после воздействия которого в реакциях каскада продукт одной реакции выполняет роль катализатора для осуществления следующей. Активация системы комплемента происходит при взаимодействии с продуктами инфекционных агентов, СРБ и иммунными комплексами. Конечные белки активированной системы комплемента образуют мультимолекулярные комплексы, которые выполняют три основных функции:

- стимуляция острых воспалительных реакций;
- видоизменение поверхностей антигена для увеличения эффективности процесса фагоцитоза;
- модификация (изменение) клеточных мембран инфекционного агента, ведущая к лизису (разрушению) микроорганизма (формируют в мембране клеток, содержащих инфекционные агенты, водные каналы, благодаря этому в клетку поступает вода, и они подвергаются лизису).

Эти реакции предназначены для борьбы с проникшими извне бактериями, обеспечивают защиту от вирусных инфекций, удаляют белковые комплексы и активируют развитие иммунных процессов.

Функциональное состояние нейтрофильных лейкоцитов играет решающую роль в уничтожении внеклеточно размножающихся микроорганизмов, в особенности при остром воспалительном процессе.

Антиген-специфическими компонентами иммунной системы являются Т- и В-лимфоциты и антитела. Из всех клеток иммунной системы только лимфоциты способны распознавать антиген, взаимодействовать с ним и обеспечивать формирование иммунологической памяти. Для

обеспечения своих специфических функций Т- и В-лимфоциты содержат антиген-распознающие рецепторы, которые имеют внеклеточный, трансмембранный и цитоплазматический участок. Каждый лимфоцит имеет множество антиген-распознающих рецепторов. Взаимодействие антиген-распознающих рецепторов Т- и В-лимфоцитов с инфекционными агентами служит первым сигналом для активации лимфоцитов и последующей их пролиферации и/или дифференцировки. В дальнейшем сигналы для реализации иммунного ответа на антиген подаются посредством цитокинов и прямым взаимодействием антигенов с рецепторами. В результате антигенной активации в организме человека накапливаются лимфоциты антиген-реактивного клона (сообщества), которые и обеспечивают защиту от данного вида инфекционных агентов.

Популяция Т-лимфоцитов представлена различными типами клеток. Наибольшее значение в формировании алгоритма иммунного ответа организма на инфекционные агенты имеют Т-хелперы (CD4) и Т-супрессоры (цитотоксические лимфоциты — CD8). Т-супрессоры имеют рецепторы к антигенам и способны взаимодействовать с ними. Такое взаимодействие стимулирует Т-супрессоры, обеспечивая их пролиферацию и дифференцировку. Активированные Т-супрессоры выделяют в сторону клетки, содержащей антиген, перфорины и гранзимы, что приводит к ее гибели. В основном Т-супрессоры уничтожают собственные клетки, несущие чужие антигены (например, содержащие внутриклеточные микроорганизмы, вирус гриппа, гепатита, токсоплазмы, листерии), но могут непосредственно убивать клетки паразитов и грибов. Для образования достаточного количества Т-супрессоров в ответ на инфицирование требуется некоторое время, поэтому этот компонент иммунной защиты включается позднее антиген-неспецифических факторов.

#### **Этапы развития иммунного ответа**

- Причиной развития иммунного ответа служит проникновение чужеродного антигена (например, бактерий, вирусов) во внутреннюю среду организма. Наиболее часто это происходит при травмировании кожи или слизистых оболочек пациента. В ответ на повреждение окружающие клетки начинают выделять биологические активные вещества (цитокины, белки теплового шока) — медиаторы (посредники) доиммунного воспаления. Действие медиаторов направлено на то, чтобы не пропустить антиген глубже покровных тканей. Они вызывают местное расширение сосудов, способствуют выпоту из сосудов в ткани плазмы и попаданию в очаг лейкоцитов (фагоцитов). Локальный отек



препятствует всасыванию антигена в системную циркуляцию (попаданию в кровоток).

- Проникший через поврежденные покровы в ткани антиген захватывается и поглощается местными дендритными (отростчатыми) клетками и макрофагами. И те, и другие служат антиген-представляющими клетками (АПК), то есть обладают особой способностью вступать во взаимодействие с Т-лимфоцитами. Однако только дендритные клетки могут мигрировать из локального очага в региональные лимфатические узлы, где в Т-зависимых зонах и представляют антиген Т-лимфоцитам. Не «перехваченный» клетками пограничных тканей антиген попадает в системный кровоток, где, если он опасен для организма, сразу начнет приносить вред. Тем не менее иммунный ответ на него может развиваться, так как дендритные клетки и макрофаги присутствуют в синусоидах селезенки, через которую во время циркуляции проходит весь объем крови.
- В Т-зависимых зонах лимфатических узлов дендритные клетки представляют антиген для «рассмотрения» интенсивно мигрирующим Т-лимфоцитам. Среди Т-лимфоцитов (Т-лимфоциты хелперы типа 0 — Th-0) рано или поздно найдутся те, которые имеют рецепторы к данному антигену. Если при этом состоится правильное и адекватное взаимодействие с антиген-представляющей клеткой, то Т-лимфоцит получит активный сигнал, и с этого момента начнется собственно иммунный — лимфоцитарный — ответ.
- Распознавший антиген Т-лимфоцит начинает пролиферировать и дифференцироваться. В результате образуется клон антиген-специфичных дифференцированных Т-лимфоцитов-хелперов.
- В Т-зависимых зонах периферических лимфатических узлов происходит взаимодействие активированных антигеном Т-лимфоцитов-хелперов с В-лимфоцитами.
- Провзаимодействовавший с Т-лимфоцитами В-лимфоцит мигрирует в зону фолликула лимфатических узлов, где пролиферирует и дифференцируется в плазматическую клетку. Первые плазматические клетки остаются в лимфатическом узле рядом с очагом повреждения. Секретируемые ими антитела активно связывают антиген и в таком виде на протяжении длительного времени способны удерживать его в лимфатическом узле. Остальные плазматические клетки мигрируют из лимфатического узла преимущественно в костный мозг или слизистые оболочки, где осуществляют массовую продукцию иммуноглобулинов (антител). Эти антитела попадают в кровоток и осуществляют гуморальную

защиту организма от антигена, попавшего в кровь, или доставляются в очаг повреждения.

- Другая часть Т-лимфоцитов-хелперов (проваимодействовавших с антигеном Т-лимфоцитов) выходит из региональных лимфатических узлов, попадает в кровоток, а оттуда — в очаг воспаления.
- Если Т-лимфоциты-хелперы в очаге воспаления находят и связывают свои антигены, то они начинают усиленно синтезировать и секретировать клеточные токсины, которые убивают клетку носителя чужеродного антигена (бактерии, вирусы, паразиты). Т-лимфоциты-хелперы могут выполнить свою задачу и другим путем. Для этого они «нанимают» те или иные лейкоциты (макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, тучные клетки).
- В результате всех этих суммарных воздействий антиген подвергается фагоцитозу и разрушению гидролитическими ферментами, кислородными радикалами до мелких метаболитов, которые выводятся через почки с мочой.
- Организм санирован от патогена/антигена — результат достигнут. После этого в норме происходит остановка (супрессия) иммунного ответа. В некоторых случаях в силу нарушения взаимодействия клеточных и гуморальных механизмов супрессии иммунного ответа не происходит, и это служит одной из причин развития аутоиммунной патологии. При отсутствии первоначального патогена иммунные механизмы продолжают активно функционировать, что приводит к повреждению собственных клеток и тканей и синтезу антител к ним.

### 14.3. ПРОТОЧНАЯ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИЯ

Для исследования субпопуляционного состава клеток периферической крови в практике КДЛ применяют метод проточной цитометрии с использованием флуоресцентно-меченных моноклональных антител. Метод позволяет проводить иммунофенотипическую оценку различных клеточных линий и соотношения популяций лимфоцитов крови.

В основе метода проточной цитометрии лежит измерение параметров каждой отдельно взятой клетки в проходящем свете лазера. Для количественного определения популяционного состава лейкоцитов используют способность их рецепторов (CD) взаимодействовать со специфическими моноклональными антителами с образованием стабильных комплексов на поверхностной мембране клетки. В качестве метки моноклональных антител применяют флуорохром — флуо-

ресцеинизотиоцианат, фикоэритрин, перидинин-хлорофилл протеин и др. Суспензию предварительно окрашенных флуоресцирующими красителями (моноклональные антитела, конъюгированные с флуоресцентной меткой) клеток под давлением пропускают через капилляр цитометра. Клетки образуют поток, состоящий фактически из одного ряда клеток. Когда такой поток пересекает сфокусированный лазерный луч, в точке пересечения потока и луча одновременно оказывается, как правило, только одна клетка. Быстродействующие датчики, расположенные вблизи измерительной ячейки, фиксируют рассеивание под углом от  $2$  до  $19^\circ$ , которое называют прямым рассеиванием (характеризует размеры клеток), и  $90^\circ$  — боковое рассеивание, характеризующее особенности внутриклеточных структур. Измерение этих двух параметров позволяет определять разные типы клеток. Одновременно с этим регистрируется излучение флуоресцентных меток, имеющее строго определенную для каждого флуорохрома длину волны. Свет определенной длины возбуждает молекулы флуоресцирующих красителей, связанных с различными клеточными компонентами. При этом может происходить одновременное возбуждение нескольких разных красителей, что позволяет оценить сразу несколько клеточных параметров. Свет, испускаемый красителями, собирают с помощью системы линз и зеркал и разлагают на компоненты. Прибор снабжен фотодетекторами, позволяющими измерять флуоресценцию различных флуорофоров. Световые сигналы детектируют, преобразуют в электрические импульсы. Клетка, которая обладает необходимой характеристикой, на выходе из капилляра получает либо положительный, либо отрицательный заряд. При прохождении потока между заряженными пластинами исследуемые клетки отклоняются в сторону противоположно заряженной пластины и попадают в соответствующий приемник. В дальнейшем проводится анализ больших массивов данных с помощью программного обеспечения. Принцип проточной цитометрии схематически изображен на рис. 14.1.

Использование нескольких флуоресцентных меток позволяет проводить одновременный двух-, трехцветный и более анализ, так как каждый флуорохром при прохождении через луч лазера испускает свет различной длины волны. Эта методика позволяет не только охарактеризовать каждую субпопуляцию иммунокомпетентных клеток, но и более точно выявить какой-либо их дефект.

Иммуноцитофлуориметрический анализ клеток проводят по следующим основным параметрам:

- FSC (forward side scatter) — показатель прямого светорассеяния, который характеризует размеры клеток;



Рис. 14.1. Принцип работы проточного цитометра

- SSC (side scatter) — показатель бокового светорассеяния, который отражает оптическую неоднородность цитоплазмы клеток, характер клеточных включений и гранулярность клетки (позволяет судить о соотношении размеров ядра и цитоплазмы);
- FL1, FL2 — каналы детекции специфического флуоресцентного сигнала красителя на разной длине волны.

Современные модели приборов могут быть оснащены тремя или более лазерами и четырьмя и более фотоумножителями, что позволяет регистрировать различные флуорохромы на разных длинах волн.

Методом проточной цитометрии можно получать самые разные данные. В клинической практике ее можно использовать для:

- иммунофенотипирования лимфоцитов, включая определение количества CD4, CD8 клеток;
- иммунофенотипирования лейкозов и лимфом;
- анализа клеточного цикла с определением распределения клеточной популяции по фазам цикла ДНК (ДНК-цитометрия);
- определения фагоцитарной активности лейкоцитов;
- анализа процессов клеточной активации на основе определения маркеров ранней активации — CD25 (рецептор интерлейкин-2), CD38, CD69, CD71 (трансферриновый рецептор), CD95 (антиген апоптоза);
- определения маркеров пролиферативной активности клеток иммунной системы (Ki-67, Cyclin D3);
- оценки внутриклеточной продукции цитокинов различными клеточными популяциями;
- анализа маркеров апоптоза;
- мониторинга минимальной активности лейкозов и лимфом.

## 14.4. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Основные задачи иммунологических исследований состоят в диагностике, определении прогноза и оценке эффективности лечения заболеваний человека, в том числе сопровождающихся различными дефектами иммунной системы. Оценка состояния различных звеньев иммунной системы должна учитывать как количественные, так и качественные изменения показателей иммунитета. Иммунологические исследования позволяют:

- выявлять врожденные и приобретенные иммунодефициты;
- диагностировать аутоагрессию против нормальных компонентов организма (аутоиммунные заболевания) и избыточное накопление иммунных комплексов (болезни иммунных комплексов);
- определять дисфункции, при которых в том или ином звене иммунитета развиваются признаки гиперфункции в ущерб функционированию других звеньев (гипергаммаглобулинемия, болезнь тяжелых цепей, миелома и др.);
- осуществлять контроль эффективности иммуносупрессивной или иммуностимулирующей терапии;
- проводить типирование и подбор доноров при пересадке органов и контроль проведения иммуносупрессивной терапии при трансплантациях органов;
- проводить фенотипирование гемобластозов;
- диагностировать генетическую предрасположенность к соматическим заболеваниям.

### 14.4.1. ЛАБОРАТОРНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ОЦЕНКИ ИММУННОГО СТАТУСА

В настоящее время наиболее часто применяют двухэтапный принцип оценки иммунного статуса. На I этапе определяют обобщенные характеристики или «грубые» дефекты в системе гуморального и клеточного иммунитета и в системе фагоцитоза с помощью наиболее простых, так называемых ориентировочных методов. Этим требованиям отвечают следующие иммунологические тесты.

**Основные тесты, используемые для оценки иммунного статуса**

- Количество лейкоцитов (абсолютное число).
- Количество лимфоцитов (абсолютное и относительное число).

- Количество Т-лимфоцитов (CD3) — абсолютное и относительное число.
- Количество Т-хелперов (CD4) — абсолютное и относительное число.
- Количество Т-супрессоров (CD8) — абсолютное и относительное число.
- Индекс соотношения CD4/CD8.
- Количество В-лимфоцитов (CD20) — абсолютное и относительное число.
- Количество иммуноглобулинов А.
- Количество иммуноглобулинов М.
- Количество иммуноглобулинов G.
- Уровень С3 компонента комплемента.
- Уровень С4 компонента комплемента.
- Фагоцитарная активность нейтрофилов в крови (фагоцитарное число, фагоцитарный показатель, индекс завершенности фагоцитоза, фагоцитарная емкость крови, количество активных фагоцитов).
- ЦИК в сыворотке.

Более детальный анализ иммунологического статуса целесообразно проводить на II этапе, если имеются отклонения в ориентирующих тестах или при наличии специальных показаний.

#### 14.4.1.1. ЛАБОРАТОРНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА

Для оценки Т-клеточного звена иммунитета наиболее часто определяют следующие показатели: общее количество лимфоцитов, количество Т-лимфоцитов, Т-хелперов, Т-супрессоров.

Определение общего количества лимфоцитов в крови служит обязательной составной частью общего анализа крови (см. главу 2).

Общее количество Т-лимфоцитов в крови у взрослых в норме составляет 58–76%, а абсолютное количество —  $1,1-1,7 \times 10^9/\text{л}$ .

В основе многих заболеваний лежит патология в Т-зависимом звене иммунной системы, которая в одних случаях непосредственно связана с поражением Т-лимфоцитов, а в других — опосредована нарушением иммунорегуляции. Снижение абсолютного количества Т-лимфоцитов в крови свидетельствует о недостаточности клеточного иммунитета, повышение — о гиперактивности иммунитета и/или наличии иммунопролиферативных заболеваний.

Развитие любого воспалительного процесса сопровождается практически на всем его протяжении снижением содержания Т-лимфоцитов. Это наблюдают при воспалениях самой разнообразной этиологии: различных инфекциях, неспецифических воспалительных процессах, при разрушении поврежденных тканей и клеток после операции, травмах, ожогах, инфарктах, разрушении клеток злокачественных опухолей, трофических разрушениях и т.д. Снижение количества Т-лимфоцитов определяется интенсивностью идущего воспалительного процесса, но такую закономерность наблюдают не всегда. Т-лимфоциты наиболее быстро из всех иммунокомпетентных клеток реагируют на начало воспалительного процесса. Эта реакция проявляется еще до развития клинической картины заболевания. Повышение количества Т-лимфоцитов в течение воспалительного процесса служит благоприятным признаком, а высокий уровень Т-лимфоцитов при резко выраженных клинических проявлениях такого процесса, напротив, неблагоприятный признак, указывающий на вялое течение воспалительного процесса с тенденцией к хронизации. Полное завершение воспалительного процесса сопровождается нормализацией количества Т-лимфоцитов.

**Количество Т-лимфоцитов-хелперов** в крови у взрослых в норме составляет 36–55%, а абсолютное количество —  $0,4-1,1 \times 10^9/\text{л}$ .

Т-лимфоциты-помощники — индукторы иммунного ответа, клетки, регулирующие силу иммунного ответа организма на чужеродный антиген, контролирующие постоянство внутренней среды организма (антигенный гомеостаз) и обуславливающие повышенную выработку антител. Увеличение количества Т-лимфоцитов-хелперов свидетельствует о гиперактивности иммунитета, снижение — об иммунологической недостаточности.

**Количество Т-лимфоцитов-супрессоров** в крови у взрослых в норме составляет 17–37%, а абсолютное число —  $0,3-0,7 \times 10^9/\text{л}$ .

Т-лимфоциты-супрессоры (CD8) — клетки-индукторы, тормозящие иммунный ответ организма. Т-супрессоры тормозят выработку антител (различных классов) вследствие задержки пролиферации и дифференцировки В-лимфоцитов. При нормальном иммунном ответе на попадание в организм чужеродного антигена максимальную активацию Т-супрессоров отмечают спустя 3–4 нед. Т-супрессоры оказывают супрессирующий эффект при воспалительных процессах, вирусной инфекции и онкологических заболеваниях. Увеличение количества CD8 в крови свидетельствует о недостаточности иммунитета, снижение — о гиперактивности иммунной системы.

Ведущее значение в оценке состояния иммунной системы имеет соотношение Т-хелперов и Т-супрессоров в периферической крови, так как от этого зависит интенсивность иммунного ответа. В норме цитотоксических клеток и антител должно вырабатываться столько, сколько их необходимо для выведения того или иного антигена. Недостаточная активность Т-супрессоров ведет к преобладанию влияния Т-хелперов, что способствует более сильному иммунному ответу (выраженной антителопродукции и/или длительной активации Т-эффекторов). Избыточная активность Т-супрессоров, напротив, приводит к быстрому подавлению и обрыву течения иммунного ответа и даже явлениям иммунологической толерантности (иммунологический ответ на антиген не развивается). При сильном иммунном ответе возможно развитие аутоиммунных и аллергических процессов. Высокая функциональная активность Т-супрессоров при таком ответе не позволяет развиваться адекватному иммунному ответу, в связи с чем в клинической картине иммунодефицитов преобладают инфекции и предрасположенность к злокачественному росту. Индекс CD4/CD8 1,5–2,5 соответствует иммунному ответу нормальному, более 2,5 — избыточному, менее 1,0 — иммунодефициту. При тяжелом течении воспалительного процесса соотношение CD4/CD8 может быть меньше 1. Принципиальное значение это отношение имеет в оценке иммунной системы у больных СПИДом. При данном заболевании ВИЧ избирательно поражает и разрушает лимфоциты CD4, в результате чего соотношение CD4/CD8 понижается до значений значительно меньше 1.

Повышение соотношения CD4/CD8 (до 3) нередко отмечают в острой фазе различных воспалительных заболеваний за счет повышения уровня Т-хелперов и снижения Т-супрессоров. В середине воспалительного заболевания отмечают медленное снижение Т-хелперов и повышение Т-супрессоров. При стихании воспалительного процесса эти показатели и их соотношения нормализуются. Повышение соотношения CD4/CD8 характерно практически для всех аутоиммунных заболеваний: гемолитической анемии, иммунной тромбоцитопении, тиреоидита Хасимото, пернициозной анемии, системной красной волчанки, ревматоидного артрита. Увеличение соотношения CD4/CD8 за счет снижения уровня CD8 при перечисленных заболеваниях выявляют обычно в разгаре обострения при большой активности процесса. Снижение соотношения CD4/CD8 из-за роста уровня CD8 характерно для ряда злокачественных опухолей.

**Общее количество В-лимфоцитов (CD20) в крови у взрослых в норме составляет 8–19%, а абсолютные значения —  $0,19–0,38 \times 10^9/\text{л}$ .**



CD20 — клетки гуморального иммунитета, ответственные за синтез антител. Количество В-лимфоцитов в периферической крови — достаточно стойкий показатель гомеостаза, мало изменяющийся при различных воздействиях, поэтому отклонение его величины от нормальной может служить одним из важных критериев иммунопатологии.

Недостаточность В-клеток ведет к тяжелым иммунодефицитным состояниям, их избыточная активность — к развитию аутоиммунной патологии.

Ряд острых и хронических лейкозов характеризуется именно патологическим увеличением содержания в крови В-лимфоцитов. Инфицирование В-лимфоцитов вирусом Эпштейна—Барр ведет к инфекционному мононуклеозу.

#### 14.4.1.2. ЛАБОРАТОРНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА

Для оценки гуморального иммунитета используют исследования, которые характеризуют функциональную активность В-лимфоцитов и включают определение концентраций иммуноглобулинов, уровня антител после профилактической иммунизации, выявление ЦИК.

Иммуноглобулины представляют собой специфический продукт секреции В-лимфоцитов на конечной стадии их дифференцировки, то есть плазматических клеток. Концентрация иммуноглобулинов в сыворотке служит результатом установившегося равновесия между их синтезом и распадом. Дефекты, связанные с нарушением метаболизма иммуноглобулинов, наблюдают при многих заболеваниях. Уменьшение содержания иммуноглобулинов в сыворотке крови возможно в результате:

- нарушения синтеза одного, нескольких или всех классов иммуноглобулинов;
- повышенного разрушения иммуноглобулинов;
- значительных потерь иммуноглобулинов (например, при нефротическом синдроме).

Общим следствием этих процессов служит дефицит иммуноглобулинов, а тем самым и антител.

Увеличение количества иммуноглобулинов может быть обусловлено усилением их синтеза или уменьшением интенсивности их распада. Повышенная выработка иммуноглобулинов служит причиной гипергаммаглобулинемии.

Референтные величины содержания иммуноглобулина А, М и G в сыворотке представлены в табл. 14.1 (Тиц Н., 1997).

Таблица 14.1. Референтные величины содержания иммуноглобулинов в сыворотке

Возраст	Иммуноглобулин А, г/л	Иммуноглобулин М, г/л	Иммуноглобулин G, г/л
Дети 1–3 мес	0,06–0,58	0,12–0,87	2,7–7,8
4–6 мес	0,1–0,96	0,25–1,2	1,9–8,6
7–12 мес	0,36–1,65	–	3,5–11,8
2–3 года	0,45–1,35	0,46–1,90	5,2–13,6
4–5 лет	0,52–2,2	0,40–2,00	5,4–14,2
6–7 лет	0,65–2,4	0,55–2,1	5,7–14,1
10–11 лет	0,91–2,55	0,66–1,55	7,3–13,5
12–13 лет	1,08–3,25	0,70–1,50	7,7–15,1
Взрослые: мужчины женщины	0,9–4,5	0,50–3,20 0,60–3,70	8,0–17,0

Иммуноглобулин Е ответствен за аллергические реакции немедленного типа, которые служат наиболее распространенным типом. Помимо участия в аллергических реакциях, IgE также участвует в защитном противогельминтном иммунитете. Референтные величины содержания общего иммуноглобулина Е в сыворотке приведены в табл. 14.2.

Таблица 14.2. Референтные величины содержания общего иммуноглобулина Е в сыворотке

Возраст	Содержание IgE, кЕ/л
1–3 мес	0–2
3–6 мес	3–10
1 год	8–20
5 лет	10–50
15 лет	15–60
Взрослые	20–100

Определение содержания общего IgE в сыворотке применяют для диагностики аллергических заболеваний. В табл. 14.3 приведены примерные диапазоны содержания общего IgE в сыворотке крови (у взрослых) при некоторых патологических состояниях.

Таблица 14.3. Содержание общего иммуноглобулина Е в сыворотке крови при некоторых патологических состояниях

Патологическое состояние	Содержание IgE, кЕ/л
Аллергический ринит	120–1000
Атопическая бронхиальная астма	120–1200
Атопический дерматит	80–14 000
Аллергический бронхопульмональный аспергиллез:	
ремиссия	80–1000
обострение	1000–8000
IgE миелома	≥15 000

**Моноклональная иммуноглобулинопатия (парапротеинемия)** представляет собой синдром, выражающийся в накоплении в сыворотке крови и/или моче больных однородных по всем физико-химическим и биологическим параметрам иммуноглобулинов либо их фрагментов. Моноклональные иммуноглобулины (парапротеины, М-протеины) служат продуктом секреции одного клона В-лимфоцитов или плазматических клеток, поэтому представляют собой пул (собрание) структурно гомогенных молекул, имеющих тяжелые цепи одного класса (субкласса), легкие цепи одного типа и вариабельные области одинакового строения. Моноклональные иммуноглобулинопатии принято разделять на доброкачественные и злокачественные. При доброкачественных формах моноклональных  $\gamma$ -глобулинопатиях пролиферация плазматических клеток контролируется таким образом, что клинические симптомы отсутствуют. При злокачественных формах происходит бесконтрольная пролиферация лимфоидных или плазматических клеток, которая и обуславливает клиническую картину заболевания — миеломную болезнь. Класс и тип секретируемых миеломой патологических иммуноглобулинов (PIg) определяет иммунохимический вариант заболевания (если синтезируются IgG — G-миелома, IgA — A-миелома и др.). В сыворотке крови таких больных определяют повышенные концентрации патологических иммуноглобулинов более 35 г/л для IgG или более 20 г/л для IgA. Содержание общего белка резко повышено — до 100 г/л, а на электрофореграмме белков сыворотки крови определяют дополнительную узкую и резко ограниченную фракцию белков (М-компонент).

**Циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК)** — комплексы, состоящие из антигена, антител и связанных с ними компонентов комплемента C3, C4, C1q. В норме иммунные комплексы, образовавшиеся в кровотоке, фагоцитируются и разрушаются как фагоцитами, так и клетками печени. Однако при увеличении их размера комплексы могут отклады-

ваться в периваскулярном (вокруг сосудов) пространстве и корковом слое почек, вызывая активацию комплемента и воспалительные процессы. Патологические реакции на иммунные комплексы могут быть обусловлены повышением скорости их образования над скоростью элиминации (удаления), дефицитом одного или нескольких компонентов комплемента или функциональными дефектами фагоцитарной системы. Определение уровня иммунных комплексов в сыворотке крови имеет большое значение в диагностике острых воспалительных процессов и аллергических реакций III типа, при которых уровень ЦИК повышается, а также в оценке эффективности проводимого лечения. Содержание ЦИК в сыворотке крови в норме составляет 30–90 МЕ/мл.

При различных аутоиммунных заболеваниях реагирующие с тканями аутоантитела оказывают цитотоксическое действие, но несравненно больший повреждающий эффект оказывают ЦИК. Вследствие этого заболевания, в патогенезе которых аутоиммунные процессы играют важную роль, нередко называют болезнями иммунных комплексов. Описано более сотни болезней, первопричиной которых служит депонирование в различных органах, тканях или системах ЦИК.

Повышение уровня ЦИК в крови характерно для:

- острых бактериальных, грибковых, паразитарных и вирусных инфекций;
- аутоиммунных заболеваний, коллагенозов, ревматизма, гломерулонефрита, аллергических альвеолитов, васкулитов, феномена Артюса;
- иммунокомплексных заболеваний, сывороточной болезни;
- аллергических реакций III типа.

### 14.4.1.3. ЛАБОРАТОРНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ДЛЯ ОЦЕНКИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЗАЩИТЫ

Наиболее часто в клинической практике для оценки антиген-неспецифического звена иммунной системы исследуют показатели фагоцитоза.

**Показатели, характеризующие состояние фагоцитоза**

*Фагоцитарное число* — среднее количество микроорганизмов, поглощенных одним нейтрофилом крови. Этот показатель характеризует поглотительную способность нейтрофилов. В норме фагоцитарное число составляет 5–10 поглощенных микробных частиц одним нейтрофилом крови.

*Фагоцитарная емкость крови* — количество микроорганизмов, которое могут поглотить нейтрофилы 1 л крови. В норме фагоцитарная

емкость крови составляет  $12,5-25 \times 10^9$  поглощенных микроорганизмов на 1 л крови.

*Фагоцитарный показатель* — процент нейтрофилов, участвующих в фагоцитозе. В норме фагоцитарный показатель составляет 65–95% нейтрофилов.

*Индекс завершенности фагоцитоза* характеризует внутриклеточное переваривание микроорганизмов фагоцитами. В норме он должен быть более 1,0.

Фагоцитарная активность нейтрофилов обычно повышается в начале развития воспалительного процесса. Ее снижение ведет к хронизации воспалительного и поддержанию аутоиммунного процесса, так как при этом нарушается функция разрушения и выведения иммунных комплексов из организма.

Снижение показателей фагоцитоза определяют при врожденных дефектах фагоцитарной системы.

#### **Параметры, характеризующие состояние системы комплемента**

Одновременное определение трех показателей — С3, С4 компонентов комплемента и титра комплементной активности сыворотки крови — позволяет оценить состояние системы комплемента.

Любой воспалительный процесс при адекватном иммунном ответе сопровождается повышением титра комплемента. Снижение титра свидетельствует о недостаточности комплемента и приводит к ослаблению его цитотоксичности, что способствует накоплению иммунных комплексов и ведет к хронизации воспалительного процесса. Увеличение активности комплемента характерно для аллергических и аутоаллергических процессов.

Снижение уровня С3 и С4 компонентов комплемента в крови приводит к ослаблению опсонизирующей функции (процесс, в ходе которого бактерии становятся более восприимчивыми к действию фагоцитов) крови, фагоцитоза, цитолиза и может быть связано с нарушением его синтеза или усилением катаболизма (распада), а также адсорбцией его на иммунных комплексах при аутоиммунных заболеваниях. Увеличение уровня С3 и С4 в сыворотке характерно для острого периода инфекции (белки «острой фазы»). В период выздоровления уровень С3 и С4 в крови нормализуется.

### **14.4.2. ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ ИММУННОГО СТАТУСА**

Основным принципом оценки результатов комплексного исследования иммунного статуса у больного служит количественная и функ-

циональная оценка всех его звеньев — антигеннеспецифических и антигенспецифических факторов — и их сравнение с нормальными величинами. Под нормальным состоянием иммунного статуса подразумевают показатели иммунной системы, определяемые у практически здоровых лиц различных возрастных групп. Определение параметров иммунной системы при различных патологических состояниях позволяет разделить последние на 3 главные группы:

- без существенных изменений в иммунном статусе;
- с недостаточностью иммунной системы (иммунодефициты);
- с гиперактивацией иммунокомпетентных клеток (аутоиммунитет, аллергия).

Используя методы клинической иммунологии, необходимо выявить у больного характер и уровень нарушений, а затем осуществлять контроль восстановления иммунного статуса организма в процессе лечения. Наиболее часто встречаемым нарушением состояния иммунной системы у человека служат иммунодефициты. Термином «иммунодефициты» обозначают нарушения нормального иммунологического статуса, обусловленные дефектом одного или нескольких механизмов иммунного ответа. Различают первичные и вторичные иммунодефициты. В качестве первичных выделены такие состояния, при которых нарушение иммунных механизмов (продукция иммуноглобулинов и/или Т-лимфоцитов) часто связано с генетическим наследованием определенных дефектов в различных звеньях иммунной системы. В зависимости от локализации дефекта различают преимущественно следующие иммунодефициты:

- с преобладанием дефектов в системе гуморального иммунитета (дефект синтеза иммуноглобулинов);
- обусловленные дефектами неспецифической системы резистентности (в частности, системы фагоцитоза, комплемента);
- обусловленные дефектами клеточного звена иммунитета;
- комбинированные иммунодефицитные состояния.

Недостаточность гуморального иммунитета может проявляться в форме общей гипогаммаглобулинемии как дефекта синтеза иммуноглобулинов, недостаточности антител вследствие общей потери белка (при нефротическом синдроме, экссудативных процессах) и усиления процессов распада иммуноглобулинов. Редко возможен избирательный (селективный) дефицит различных иммуноглобулинов. Например, при селективных дефицитах IgG отмечают рецидивирующие инфекции верхних дыхательных путей. Среди первичных иммунодефицитов наиболее часто встречаются комбинированные формы. При нарушении Т-клеточного звена иммунной системы больные подвергаются особой

опасности поражения вирусными и грибковыми инфекциями. Часто первыми признаками иммунодефицита служат кандидоз, осложнения после вакцинации вакциной для профилактики туберкулеза [Вакцина туберкулезная (БЦЖ)\*], тяжелые формы инфекций, обусловленных вирусом герпеса и ветряной оспы. При клеточных формах иммунодефицита часто определяют снижение количества и функциональной активности лимфоцитов периферической крови. Содержание В-лимфоцитов может быть несколько увеличено, а Т-лимфоцитов — снижено.

Вторичные иммунодефициты характеризуются приобретенным дефектом иммунной системы, выражающимся в неспособности организма осуществлять реакции клеточного и/или гуморального иммунитета. Дефекты иммунной системы при вторичных иммунодефицитах могут возникать в различных звеньях: Т- и В-лимфоцитарном, макрофагальном, гранулоцитарном, комплементном. Общий механизм возникновения вторичных иммунодефицитов заключается в нарушении естественно существующих взаимодействий между рецепторами клеток и циркулирующими иммуноглобулинами под влиянием различных стрессовых и патогенных агентов и воздействий.

Многие заболевания, химиотерапевтические, физические и другие методы лечения, иные воздействия вызывают изменения иммунореактивности. Вторичные иммунодефициты наиболее часто выявляют при инфекциях, СПИДе, тяжелых ожогах, уремии, злокачественных новообразованиях, проведении иммуносупрессивной и лучевой терапии.

## 14.5. ОСНОВНЫЕ ЛАБОРАТОРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ РЕВМАТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

В настоящее время к ревматическим относят большое число заболеваний, в основе которых лежит системное или локальное поражение соединительной ткани, а наиболее ярким клиническим проявлением служит поражение суставов. К ревматическим относят следующие группы заболеваний:

- ревматизм (ревматическая лихорадка);
- диффузные болезни соединительной ткани (основные формы — системная красная волчанка, системная склеродермия, диффузный фасциит, дерматомиозит/полимиозит, болезнь Шегрена, смешанные заболевания соединительной ткани и др.);

- системные васкулиты (узелковый полиартериит, гранулематозные артерииты, гиперергические ангииты, облитерирующий тромбангиит, синдром Бехчета);
- ревматоидный артрит;
- ювенильный артрит;
- анкилозирующий спондилоартрит (болезнь Бехтерева);
- артриты, сочетающиеся со спондилитом;
- артриты, связанные с инфекцией;
- микрокристаллические артриты;
- остеоартроз;
- другие болезни суставов;
- артропатии при неревматических заболеваниях;
- болезни внесуставных мягких тканей;
- болезни костей, хряща и остеохондропатии.

Для лабораторной диагностики ревматических заболеваний применяют целый комплекс показателей (общий анализ крови и мочи, СОЭ, исследование суставной жидкости, биохимические показатели, исследование иммуноглобулинов, ЦИК, показателей системы комплемента и др.). В данном разделе приведено диагностическое значение показателей, характеризующих аутоиммунный компонент ревматических заболеваний. Аутоиммунные механизмы играют важную роль в развитии многих ревматических заболеваний. Основная сущность этих механизмов в том, что в результате предшествующих повреждений клеток органов и тканей вирусами или бактериями многие структурные компоненты клеток изменяют свои антигенные свойства, и иммунная система начинает воспринимать их как чужие. В ответ на эти изменения В-лимфоциты синтезируют антитела к антигенам собственных клеточных структур (аутоантитела). Выявление этих аутоантител имеет большое практическое значение, так как при различных ревматических заболеваниях образуются разные виды аутоантител. Лабораторные исследования позволяют выявлять эти различные виды аутоантител, характерные для определенного заболевания, и тем самым помогают правильно поставить диагноз пациенту. Часть из этих аутоантител неспецифична и присутствует при многих ревматических болезнях. Именно поэтому их определение в крови используют для скрининга на ревматические заболевания или оценки активности аутоиммунного процесса. К лабораторным показателям, которые наиболее часто назначают больным с ревматическими заболеваниями, относят клетки красной волчанки, ревматоидный фактор, антистрептолизин-О, СРБ и анти-нуклеарный фактор.



Результаты приведенных анализов необходимы:

- для подтверждения диагноза;
- характеристики активности процесса;
- оценки эффективности лечения;
- прогнозирования исходов.

### 14.5.1. КЛЕТКИ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКИ (LE-КЛЕТКИ) КРОВИ

Волчаночные клетки служат морфологическим (клеточным) проявлением иммунологического феномена, характерного для системной красной волчанки (*lupus erythematosus* — LE), отсюда и сокращенное название — LE-клетки. Они образуются в результате фагоцитоза нейтрофильными лейкоцитами (реже моноцитами) остатков ядер собственных погибших клеток тканей (в том числе и самих лейкоцитов). Этот ядерный материал, поглощенный другими лейкоцитами, можно выявить после окраски под микроскопом. Соответственно лейкоциты, которые содержат остатки ядерного материала, являются LE-клетками. При системной красной волчанке клетки тканей гибнут в результате их повреждения аутоантителами. Из погибших клеток ядра попадают в кровоток, где фагоцитируются лейкоцитами. Обнаружение LE-клеток — специфический симптом системной красной волчанки. В норме LE-клетки в крови отсутствуют.

Системная красная волчанка — аутоиммунное заболевание, при котором наблюдают развитие иммунной реакции в отношении неизменных компонентов собственных клеток (ядерных и цитоплазматических). Свое название болезнь получила по характерному покраснению кожи, напоминающему, как говорили когда-то, полосы красноты на коже после волчьих укусов или красноватые волчьи щеки (латинское название заболевания — *lupus erythematosus* происходит от *lupus* — волк, *erythema* — покраснение). Для заболевания характерно поражение суставов, серозных оболочек, кожи, внутренних органов и ЦНС. Болезнь чаще начинается с рецидивирующего артрита, недомогания, повышения температуры тела, кожных высыпаний, быстрого похудения, реже — с лихорадки, острого артрита и выраженного характерного кожного синдрома. В последующем развивается прогрессирующая патология со стороны различных органов.

Обнаружение в крови LE-клеток служит важным диагностическим признаком системной красной волчанки. Исследование на наличие LE-клеток у пациента необходимо проводить до начала глюкокортикоидной терапии. Для анализа берут пробу венозной крови (2–3 мл)

в пробирку или вакутейнер с антикоагулянтом (ЭДТА). LE-клетки обнаруживают в раннем периоде болезни, а также при выраженном нефротическом синдроме и потере с мочой большого количества белка. Чаще волчаночные клетки обнаруживают в крови при обострении заболевания. Появление их в большом количестве — прогностически неблагоприятный признак. При улучшении состояния больного в процессе его лечения количество LE-клеток уменьшается, а иногда они и совсем исчезают. Частота обнаружения LE-клеток у больных острой системной красной волчанкой колеблется от 40 до 95%.

Отрицательный результат исследования не исключает возможности наличия системной красной волчанки у пациента.

## 14.5.2. РЕВМАТОИДНЫЙ ФАКТОР

Ревматоидный фактор — антитела (аутоантитела) к собственным иммуноглобулинам, которые часто присутствуют в крови больных ревматоидным артритом.

Аутоантитела (ревматоидный фактор) могут образовывать иммунные комплексы, соединяясь как с белками системы комплемента, так и с другими белками. Иммунные комплексы, попадая в синовиальную жидкость, фагоцитируются нейтрофилами и в процессе фагоцитоза разрушаются. В результате выделяются различные медиаторы воспаления, которые оказывают повреждающее действие на ткани сустава и способствуют формированию у них ревматоидных узелков. Кроме того, в результате взаимодействия иммуноглобулинов и ревматоидного фактора (аутоантител) образуются крупные белковые комплексы, которые не фагоцитируются, а откладываются в межклеточном пространстве вокруг сосудов, что приводит к возникновению воспаления (васкулита). Большинство внесуставных (системных) проявлений ревматоидного артрита связано с развитием васкулита, а также с непосредственным повреждением различных тканей аутоантителами.

Ревматоидный артрит — системное аутоиммунное воспалительное заболевание соединительной ткани с преимущественным поражением суставов по типу хронического прогрессирующего полиартрита. По статистике, от этого заболевания страдает каждый сотый житель Земли — преимущественно женщины среднего и пожилого возраста.

Обнаружение в крови ревматоидного фактора имеет большое диагностическое значение, особенно в распознавании ранних форм ревматоидного артрита. У здоровых людей уровень ревматоидного фактора в сыворотке крови составляет менее 14 МЕ/мл. Повышение уровня ревматоидного фактора в сыворотке крови характерно для ревматоид-

ного артрита, могут определять почти у 90% больных. Его выявляют не ранее чем через 6–8 нед после начала клинических проявлений заболевания. Наличие ревматоидного фактора в крови больных указывает на тяжелую форму заболевания (протекает с выраженным воспалительным процессом в суставах, зачастую с их деструкцией).

Отрицательный результат исследования не всегда позволяет отвергнуть диагноз. Ревматоидный фактор может быть обнаружен в низких значениях при инфекционном мононуклеозе, острых воспалительных процессах, системной красной волчанке с поражением суставов, аутоиммунном гепатите.

### 14.5.3. АНТИСТРЕПТОЛИЗИН-О

Инфекции, обусловленные стрептококком группы А, всегда вызывают специфический иммунный ответ — значительное повышение титра антител к одному из внеклеточных стрептококковых антигенов — стрептолизину О. Именно поэтому антитела против стрептококкового гемолизина-О (АСЛО) — маркер острой стрептококковой инфекции. У здоровых людей в норме референтные величины антистрептолизина-О в сыворотке крови составляют для взрослых менее 200 МЕ/мл, для детей — до 150 МЕ/мл.

В клинической практике исследование АСЛО назначают пациентам с подозрением на стрептококковую инфекцию, которая служит основной причиной таких заболеваний, как ревматизм и гломерулонефрит. Стрептококки при ревматизме вызывают повреждения тканей сердца, а при гломерулонефрите — клеток почечных клубочков (гломерул). В результате повреждения клетки изменяют свои антигенные свойства, и В-лимфоциты начинают вырабатывать к ним антитела (аутоантитела), так как принимают их за «чужих». Образующиеся аутоантитела усугубляют повреждение тканей и поддерживают воспалительный процесс.

Исследование АСЛО назначают пациенту для подтверждения или исключения участия стрептококковой инфекции в развитии заболеваний, в основном ревматизма и гломерулонефрита.

Уровень АСЛО в крови повышается в острый период инфекции (7–14-й день) и снижается в период стихания инфекции и выздоровления. В клинической практике определение АСЛО используют для наблюдения за динамикой ревматического процесса. Титр АСЛО повышается у 80–85% больных с ревматической лихорадкой. К 3-й неделе заболевания ревматизмом уровень АСЛО значительно повышается, достигая максимума к 6–7-й неделе. При благоприятном течении процесса к 4–8-му месяцу активность АСЛО снижается до нормы.

Под влиянием проводимого лечения эти сроки могут сократиться. Отсутствие снижения активности АСЛО к 6-му месяцу заболевания позволяет предположить возможность рецидива. Стойкое и длительное повышение активности после ангины может быть предвестником ревматического процесса. В 10–15% случаев ревматизма повышения активности АСЛО не определяют.

Увеличение уровня АСЛО обнаруживают у половины больных острым гломерулонефритом, развивающимся после стрептококковой инфекции.

#### 14.5.4. АНТИНУКЛЕАРНЫЙ ФАКТОР

Антинуклеарный фактор — группа аутоантител, реагирующих с нуклеиновыми кислотами и связанными с ними белками — компонентами ядра клеток органов и тканей. Особенностью этих аутоантител считают их способность повреждать клетки соединительной ткани. Именно поэтому определение антинуклеарного фактора — тест на системные заболевания соединительной ткани. Одним из наиболее распространенных системных заболеваний соединительной ткани служит системная красная волчанка. При этом заболевании антинуклеарный фактор появляется в сыворотке крови у 95% больных в течение 3 мес после его начала. В связи с этим основная цель исследования антинуклеарного фактора — исключить наличие у больного системной красной волчанки.

У здоровых людей титр антинуклеарного фактора в сыворотке крови составляет 1:40–1:80. Клинически значимым обычно считают титр  $\geq 1:160$ .

Антитела к нуклеарным антигенам высокоспецифичны для системной красной волчанки. Их титр увеличивается при активной форме заболевания до значений 1:1000 и выше. Сохранение высокого уровня антител в течение длительного времени считают неблагоприятным признаком. Снижение уровня предвещает ремиссию.

Определение антинуклеарного фактора имеет большое значение для диагностики других форм системных заболеваний соединительной ткани. При узелковом периартериите титр может увеличиваться до 1:100, при дерматомиозите — 1:500. При склеродермии частота выявления антител к нуклеарным антигенам составляет 60–80%, но титр их ниже, чем при системной красной волчанке. При ревматоидном артрите довольно часто определяют антитела к нуклеарным антигенам.

Кроме ревматических заболеваний, антитела к ядерным антигенам в крови обнаруживают при хроническом активном гепатите (в 30–50%

случаев), их титр иногда достигает 1:1000. Аутоантитела к нуклеарным антигенам могут определять в крови при инфекционном мононуклеозе, острых и хронических лейкозах, приобретенной гемолитической анемии, болезни Вальденстрема, циррозе и билиарном циррозе печени, гепатитах, малярии, лепре, хронической почечной недостаточности, тромбоцитопениях, лимфопролиферативных заболеваниях.

Почти в 10% случаев антинуклеарный фактор обнаруживают у здоровых людей, но титр у них не превышает 1:50.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ

1. Назовите структурные органы и ткани иммунной системы.
2. Перечислите клетки иммунной системы.
3. Чем Т-лимфоциты отличаются от В-лимфоцитов?
4. Перечислите гуморальные факторы иммунитета.
5. Что такое фагоцитоз и какие клетки ответственны за него?
6. Что лежит в основе метода проточной цитометрии?
7. Для решения каких клинических задач применяют иммунологические анализы?
8. Определение каких лабораторных показателей используют для оценки клеточного иммунитета?
9. Определение каких лабораторных показателей используют для оценки гуморального иммунитета?
10. Что такое иммуноглобулинопатия?
11. Какие лабораторные тесты используют для диагностики ревматических заболеваний?
12. Что собой представляют клетки красной волчанки?
13. Что такое ревматоидный фактор?

## 14.6. ИССЛЕДОВАНИЕ ОПУХОЛЕВЫХ МАРКЕРОВ

Онкологические заболевания занимают по распространенности 2-е место среди всех заболеваний населения. Однако рассчитывать на успех лечения заболеваний раком можно лишь при выявлении злокачественных опухолей на раннем этапе их развития. За последние годы значительно расширились возможности медицины по раннему обнаружению опухолей в связи с использованием в клинической практике современных инструментальных методов диагностики. К таким методам относят компьютерную и рентгеновскую томографию, ультразвуковое исследование, радиоизотопную диагностику и др. Существенно увеличились и возможности лабораторной диагностики. Это связано

с внедрением в клиническую практику определения опухолевых маркеров, которые стали широко использоваться для выявления первичной опухоли и ее метастазов.

Опухолевые маркеры (онкомаркеры) — вещества, наличие которых в организме пациента связано с присутствием или прогрессированием злокачественной опухоли. К маркерам злокачественного роста относят вещества разной природы: гормоны, ферменты, гликопротеины, липиды, белки, метаболиты. Синтез маркеров обусловлен особенностями метаболизма раковых клеток. Основным механизмом продукции маркеров опухолевыми клетками служат патологические изменения в генах (участках молекулы ДНК) такой клетки. В результате этого опухолевые клетки начинают синтезировать эмбриональные и плацентарные белки, ферменты, метаболиты, липиды и гормоны, которые в норме не продуцируются или продуцируются в крайне малых количествах. Именно поэтому появление таких веществ в крови пациента или резкое увеличение их концентрации может свидетельствовать о наличии в организме больного злокачественного новообразования. Известен широкий спектр маркеров для различных форм и локализаций рака. Однако почти все они имеют недостатки в отношении выявления ранних форм рака. Сложности обусловлены многообразием требований, предъявляемых к идеальному маркеру. Идеальный опухолевый маркер должен продуцироваться опухолевыми клетками в достаточном количестве, чтобы его можно было бы определить с помощью современных лабораторных анализов, он не должен присутствовать в крови у здоровых людей и при доброкачественных опухолях. Маркер должен выявляться в крови на ранних стадиях опухолевого процесса, концентрация его в крови должна соответствовать объему опухоли. Этот маркер должен определяться в крови еще до клинических проявлений опухоли, уровень его в крови должен отражать результаты противоопухолевого лечения.

В клинической практике используют ряд достаточно полезных опухолевых маркеров, которые, однако, не всегда соответствуют всем приведенным выше требованиям в полной мере. Именно поэтому большинство опухолевых маркеров непригодно для скринингового обследования населения при отсутствии клинических симптомов заболевания. Исключение составляет простатический специфический антиген (ПСА), который широко используют для раннего выявления рака предстательной железы у мужчин в возрасте старше 40 лет. В большинстве других ситуаций определение уровня опухолевых маркеров считают дополнительным методом диагностики онкологических заболеваний в комбинации с другими методами исследований. Однако

в целом ряде клинических ситуаций без определения опухолевых маркеров трудно обойтись.

В первую очередь определение уровня онкомаркеров в крови пациента используют для оценки эффективности противоопухолевого лечения. Снижение концентрации их в крови уже на ранних этапах лечения будет свидетельствовать об его эффективности и, наоборот, повышение их уровня — о необходимости коррекции химиотерапии.

Во-вторых, исследование онкомаркеров имеет большое значение для наблюдения за течением онкологического заболевания. Повышение уровня опухолевого маркера в крови по сравнению с его исходными значениями нередко позволяет заподозрить и обнаружить метастазы и/или рецидив опухоли на 3–5 мес и более раньше клинических проявлений болезни. У некоторых пациентов определение уровня онкомаркеров после хирургического удаления первичного очага опухоли служит более чувствительным методом мониторинга, чем эндоскопия или компьютерная томография.

В-третьих, определение уровня онкомаркеров в крови пациента весьма эффективно для обнаружения остатков опухолевой ткани в организме больного после ее хирургического удаления, а также ранней диагностики рецидивов опухоли. Незначительное снижение уровня онкомаркеров в крови или отсутствие снижения вообще свидетельствует о неполном удалении опухоли или наличии множественных опухолей (метастазов).

В-четвертых, определение концентрации онкомаркеров в крови позволяет прогнозировать (предсказывать) течение опухолевого процесса. Установление прогноза имеет большое значение для выбора методов лечения больного.

Не менее важно для правильного использования результатов исследования опухолевых маркеров придерживаться следующей последовательности назначения анализов больному (рекомендации ВОЗ):

- определить уровень онкомаркеров перед лечением и в дальнейшем исследовать только те из них, уровни которых были повышены;
- после курса лечения (операции) исследовать онкомаркеры через 2–10 сут с целью установления исходного уровня для дальнейшего мониторинга;
- для оценки эффективности проведенного лечения (операции) провести исследование онкомаркеров спустя 1 мес;
- дальнейшее исследование уровня онкомаркеров в крови проводить 1 раз/мес в течение 1 года после лечения, 1 раз в 2 мес в течение 2 лет после лечения, 1 раз в 3 мес в течение 3–5 лет;

- проводить исследование онкомаркеров перед любым изменением лечения;
- определять уровень онкомаркеров при подозрении на рецидив и метастазирование;
- определять уровень онкомаркеров через 3–4 нед после первого обнаружения повышенной концентрации.

Для исследования крови на онкомаркеры берут кровь в пробирку или вакутейнер без всяких добавок. К полученным пробам крови предъявляют следующие требования:

- если кровь после ее взятия и образования сгустка в пробирке нельзя отцентрифугировать на месте, то пробы должны быть доставлены в лабораторию в течение 30–40 мин;
- гемолизированные пробы крови не подлежат исследованию (гемолиз повышает уровень ряда онкомаркеров);
- контаминация (инфицирование) проб крови недопустима (повышает уровень ряда онкомаркеров);
- прием лекарственных препаратов, вызывающих повышение уровня онкомаркеров в крови, должен быть по возможности ограничен (эстрадиол, ионы 2- и 3-валентных металлов, аналоги гуанидина, нитраты, митомицин).

Наиболее часто в клинической практике назначают исследование  $\alpha$ -фетопротейна (АФП), раково-эмбрионального антигена (РЭА), ракового антигена СА-125 и простатического специфического антигена (ПСА).

### 14.6.1. $\alpha$ -ФЕТОПРОТЕИН

$\alpha$ -Фетопротейн (АФП) представляет собой белок, связанный с углеводом. Он синтезируется в желточном мешке, а также в печени и кишечнике плода. У плода он служит основным белком плазмы крови. После рождения основным белком плазмы крови становится альбумин, а продукция АФП подавляется. Именно поэтому у взрослых нормальная концентрация АФП в сыворотке крови не превышает 10 МЕ/мл (в небольших количествах он синтезируется печенью). Повышение концентрации АФП в крови в норме наблюдают при беременности.

В клинической практике АФП как опухолевый маркер используют:

- во-первых, для выявления и мониторинга гепатоцеллюлярной карциномы (рака печени), которая возникает, как правило, в цирротической печени;
- во-вторых, для обнаружения тератобластомы яичка (рака яичка);
- в-третьих, для оценки эффективности лечения этих заболеваний.



АФП считают основным онкомаркером в диагностике рака печени, уровень которого может повышаться при опухоли небольшого размера, что способствует увеличению послеоперационной выживаемости у этих больных. Первичный рак печени встречается редко, поэтому исследование АФП не используют для скрининга населения. Однако некоторые группы пациентов (больные циррозом печени, хроническим вирусным гепатитом В и С, гемохроматозом) имеют высокий риск развития этой формы рака, и проведение скрининга с определением уровня АФП у них имеет большое практическое значение. Уровень АФП при первичном раке печени более 15,0 МЕ/мл диагностируют в 95% случаев заболевания.

Содержание АФП в сыворотке крови хорошо отражает эффект химиотерапевтического лечения рака печени. Значительное снижение уровня АФП свидетельствует об эффективности лечения. Хирургическое удаление опухоли сопровождается резким уменьшением содержания АФП в крови, его увеличение свидетельствует о нерадикальности хирургического лечения.

У пациентов с раком яичка определение концентрации АФП в сыворотке крови используют для оценки прогноза, определения стадии заболевания и мониторинга лечения.

Исследование уровня АФП в сыворотке крови у беременных применяют для ранней диагностики врожденных пороков развития нервного канала и синдрома Дауна у плода.

## 14.6.2. РАКОВО-ЭМБРИОНАЛЬНЫЙ АНТИГЕН

Раково-эмбриональный антиген (РЭА) — гликопротеин, синтезируемый в желудочно-кишечном тракте плода. У взрослых в норме РЭА в сыворотке крови практически отсутствует, где его концентрации составляют 0–5 нг/мл. На уровень РЭА влияет курение и в меньшей степени прием алкоголя (повышают уровень маркера).

Этот опухолевый маркер определяют в повышенных концентрациях в сыворотке крови у 60% больных раком толстой кишки. Однако повышение концентрации РЭА наблюдают и у пациентов с незлокачественными заболеваниями, такими как заболевания печени (гепатит), панкреатит, воспалительные заболевания кишечника (язвенный колит, болезнь Крона), хронические заболевания легких, аутоиммунные заболевания. Именно поэтому РЭА не считают достаточно чувствительным для использования при скрининге на наличие рака толстой кишки. Уровень РЭА в сыворотке крови больных раком толстой кишки коррелирует со стадией заболевания и служит показателем эффективности

оперативного лечения, химио- и лучевой терапии. Его могут использовать в качестве раннего маркера рецидивов и метастазов опухолей толстой кишки. При нелеченых злокачественных опухолях уровень РЭА постоянно увеличивается, причем в начальной стадии его рост имеет выраженный характер.

Уровень РЭА может повышаться при других формах злокачественных заболеваний, таких как рак печени, молочной железы, желудка, легких, поджелудочной железы. Именно поэтому совместно с другими опухолевыми маркерами его используют для мониторинга течения этих заболеваний.

### 14.6.3. РАКОВЫЙ АНТИГЕН СА-125

Злокачественные новообразования органов репродуктивной системы у женщин составляют 15% всех опухолей. Среди злокачественных опухолей рак яичников занимает 2-е место по распространенности после рака матки и 1-е место в структуре смертности. Наилучшим маркером наличия рака яичников у пациента считают раковый антиген СА-125.

Раковый антиген СА-125 — гликопротеин, синтезируемый серозными оболочками внутренних полостей организма и некоторыми тканями. У женщин детородного возраста основным источником СА-125 служит эндометрий, с чем связано циклическое изменение его уровня в крови в зависимости от фазы менструального цикла. В период менструации концентрация СА-125 в крови повышается. При беременности его выявляют в сыворотке крови беременной (I триместр) и амниотической жидкости (16–20 нед). У здоровых женщин на уровень СА-125 в крови оказывает влияние синтез этого маркера в мезотелии брюшной и плевральной полости, перикарде, эпителии бронхов, маточных труб, яичников, а у мужчин (в дополнение к серозным полостям) — в эпителии семенников. Нормальные величины СА-125 у женщин в сыворотке крови составляют значения до 35 МЕ/мл; при беременности сроком 1–2 нед — до 100 МЕ/мл; у мужчин — до 10 МЕ/мл.

Исследование СА-125 в крови применяют главным образом для мониторинга серозного рака яичников и диагностики его рецидивов. Установлено, что для серозного рака яичников уровень повышения СА-125 в сыворотке крови тесно связан со стадией процесса, то есть уровни маркера тем выше, чем выше стадия заболевания. У 83% больных раком яичника уровень СА-125 в сыворотке крови составляет в среднем 124–164 МЕ/мл.

Регрессия опухоли (при эффективном химиотерапевтическом или химиолучевом лечении либо удалении ее хирургическим путем)

сопровождается уменьшением содержания СА-125 в крови. Повышение его уровня в крови связано с прогрессированием опухолевого процесса. Для оценки эффективности химиотерапии необходимо исследовать уровень СА-125 в крови перед началом каждого курса лечения, а после его завершения — с периодичностью 1–2 мес. В большинстве случаев начало повышения уровня СА-125 в крови опережает клинические проявления рецидива заболевания на 4–6 мес (в отдельных случаях — на 9–10 мес).

В отличие от серозного рака яичников, когда повышенный уровень СА-125 в сыворотке крови выявляют у 60–81% пациенток, при других гистологических типах рака яичников его содержание повышается в 25–30% случаев.

СА-125 считают полезным маркером для оценки эффективности лечения и раннего обнаружения рецидивов эндометриоза, который занимает 2-е место после рака яичников по числу больных с повышенным содержанием СА-125 в крови. Повышение его уровня в крови коррелирует со стадией эндометриоза.

Концентрация СА-125 в крови повышается при различных неопухолевых заболеваниях при вовлечении в процесс серозных оболочек — перитоните, перикардите, плеврите разной этиологии. Более значительное увеличение уровня СА-125 в крови наблюдают иногда при различных доброкачественных опухолях органов женской репродуктивной системы (кисты яичников), а также при воспалительных процессах, вовлекающих придатки матки, и доброкачественной гиперплазии эндометрия. Однако в большинстве таких случаев концентрация СА-125 в сыворотке крови не превышает 100 МЕ/мл.

#### 14.6.4. ПРОСТАТИЧЕСКИЙ СПЕЦИФИЧЕСКИЙ АНТИГЕН

Простатический специфический антиген (ПСА) — гликопротеин, синтезируемый клетками эпителия канальцев предстательной железы. В связи с тем что ПСА синтезируется в парауретральных железах, у женщин его малые количества могут обнаруживать в крови. Нормальные значения ПСА в сыворотке крови у мужчин в возрасте до 40 лет составляют до 2,5 нг/мл, после 40 лет — до 4,0 нг/мл.

Исследование ПСА применяют для диагностики и мониторинга лечения рака предстательной железы, при котором его концентрация увеличивается, а также для мониторинга состояния пациентов с гипертрофией предстательной железы в целях как можно более раннего выявления рака этого органа. Уровень ПСА выше 4,0 нг/мл обнаруживают примерно у 80–90% больных раком и 20% больных аденомой предстательной железы.

Пальцевое ректальное исследование, цисто-, колоноскопия, трансуретральная биопсия, лазерная терапия, задержка мочи также могут вызвать подъем уровня ПСА. Влияние этих процедур на уровень ПСА максимально выражено на следующий день после их проведения, причем наиболее значительно — у больных с гипертрофией предстательной железы. Исследование ПСА в сыворотке крови в таких случаях следует проводить не ранее чем через 7 дней после проведения перечисленных процедур.

Значительное повышение уровня ПСА в сыворотке иногда обнаруживают при гипертрофии предстательной железы, а также при воспалительных ее заболеваниях.

При оценке уровня ПСА в крови необходимо ориентироваться на следующие показатели:

- 0–4 нг/мл — норма;
- 4–10 нг/мл — подозрение на рак предстательной железы;
- 10–20 нг/мл — высокий риск рака предстательной железы;
- 20–50 нг/мл — риск диссеминированного рака предстательной железы;
- 50–100 нг/мл — высокий риск метастазов в лимфатические узлы и отдаленные органы;
- более 100 нг/мл — всегда метастатический рак предстательной железы.

Мониторинг концентрации ПСА обеспечивает более раннее обнаружение рецидива и метастазирования рака предстательной железы, чем прочие методы. При этом изменения даже в пределах границ нормы считают информативными. После тотального удаления предстательной железы ПСА не должен выявляться, его обнаружение свидетельствует об остаточной опухолевой ткани, региональных или отдаленных метастазах. После операции уровень ПСА определяют не ранее чем через 60–90 дней в связи с возможными ложноположительными результатами.

При эффективной лучевой и гормональной терапии уровень ПСА снижается. Контроль уровня ПСА у больных с леченым раком предстательной железы следует проводить каждые 3 мес, что позволяет своевременно выявить отсутствие эффекта от проводимой терапии.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ

1. Какие соединения относят к опухолевым маркерам?
2. Для чего в клинической практике используют исследование опухолевых маркеров?
3. Перечислите опухолевые маркеры, которые наиболее часто назначают пациентам.

## ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ОПЕРАЦИИ ПЕРЕЛИВАНИЯ КРОВИ

Переливание донорской крови — довольно обычная процедура в клинической практике. В большинстве случаев ее выполняют для спасения жизни больному. Вместе с тем переливание донорской крови связано со значительным потенциальным риском для пациента (реципиента). Имеется два наиболее серьезных осложнения этой процедуры: заражение пациента инфекционной болезнью и опасная для его жизни гемолитическая трансфузионная реакция, которая возникает при переливании несовместимой крови.

Для исключения заражения пациента инфекционной болезнью все доноры крови подвергаются тщательному отбору, а всю донорскую кровь строго проверяют на наличие инфекции. Все стандартные единицы донорской крови проверяют на наличие:

- антител к возбудителю сифилиса (*Treponema pallidum*);
- поверхностного антигена вируса гепатита В (Hbs-антиген);
- суммарных антител к вирусу гепатита С (ВГС);
- антител к ВИЧ 1/2 и антигена ВИЧ p24.

Ответственность за мероприятия, которые гарантируют поступление безопасной донорской крови в отделения переливания крови местных больниц, несут станции переливания крови.

Для предупреждения второй большой опасности — переливания пациенту несовместимой крови — выполняют целый комплекс анализов в лечебном отделении больницы, а также КДЛ. Первостепенное значение имеют три анализа: определение группы крови; определение антител; тест на совместимость крови донора и реципиента. Для понимания возможных последствий переливания несовместимой крови и роли перечисленных анализов необходимо вспомнить некоторые знания основ иммунологии (см. главу 7).

Антитела — белки, иммуноглобулины, которые связываются с чужеродными белками и нейтрализуют их. Каждое антитело специфично,

то есть оно способно связываться только с одним видом антигена. Эта специфичность обусловлена природой молекул, находящихся на поверхности каждой клетки. Такие молекулы называют антигенами. Распознавание лимфоцитами специфических антигенов запускает продукцию специфических антител. Способность организма вырабатывать антитела к чужеродным молекулам лежит в основе иммунных реакций. Белки и другие вещества на поверхности любых «не своих» клеток рассматриваются как антигены и вызывают продукцию антител. Таким образом, под антигеном следует понимать любое вещество (чаще белок), вызывающее выработку антител лимфоцитами, а антитело — белок (иммуноглобулин), который циркулирует в плазме крови и связывается с антигеном, вызвавшим его образование.

Понимание этих основ иммунологии имеет большое практическое значение при определении группы крови, резус-фактора и антител к эритроцитам при переливании донорской крови.

## 15.1. АНТИГЕНЫ ЭРИТРОЦИТОВ И ГРУППЫ КРОВИ

Эритроциты, как и другие клетки крови и тканей, несут на своей поверхности антигены (белки, гликопротеины, гликолипиды). Антигены эритроцитов наследуются от родителей. Эти антигены эритроцитов или их отсутствие определяют группу крови у каждого человека. Антигены эритроцитов обладают способностью взаимодействовать с соответствующими антителами и образовывать комплексы антиген—антитело. При попадании в организм антигена, отсутствующего у данного человека, создаются предпосылки для выработки антител к нему. Выявлено около 236 эритроцитарных антигенов (большинство из них встречаются редко), которые распределены по 29 системам групп крови. Однако только небольшое число из них имеет практическое значение. К ним относят антигены системы АВ0 и резус-фактора.

### 15.1.1. ГРУППЫ КРОВИ АВ0

Одной из основных систем антигенов эритроцитов служит система АВ0. У людей известны 4 группы крови (рис. 15.1), которые определяются наследованием или ненаследованием двух эритроцитарных антигенов — А и В. Если индивидуум не унаследовал ни А-, ни В-антигенов, то у него имеется 0 группа крови. У лиц с наследованием А- или В-антигенов имеется А или В группа крови соответственно. Те, кто унаследовал оба антигена, имеют АВ группу крови.

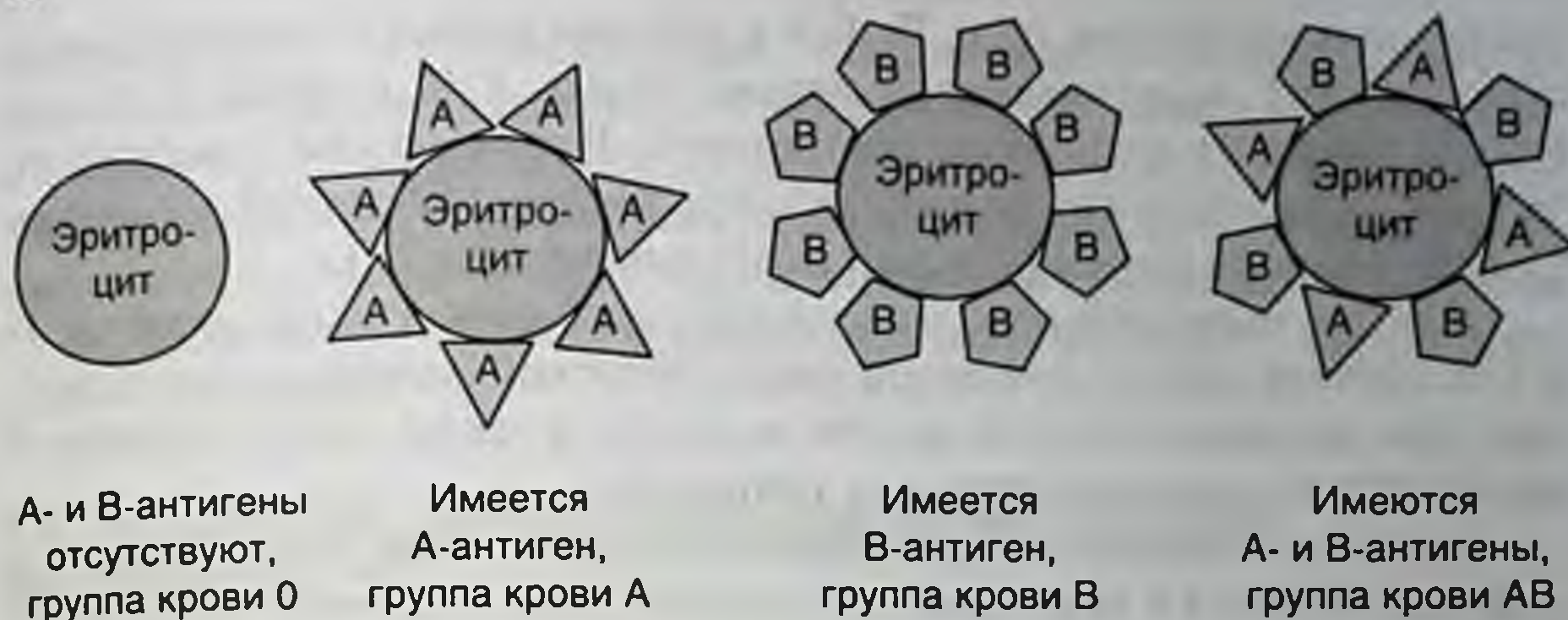


Рис. 15.1. Группы крови по системе АВ0

Антигены системы АВ0 формируются на эритроцитах еще до рождения ребенка. Однако окончательное созревание антигенов происходит только через несколько месяцев после рождения.

Характерной особенностью, отличающей систему антигенов эритроцитов АВ0 от других систем антигенов, считают врожденное постоянное присутствие в сыворотке крови людей (кроме лиц с группой крови АВ) антител, направленных к антигенам А и В. Антитела к антигенам эритроцитов других систем не являются врожденными и вырабатываются в ответ на попадание этих антигенов в организм при переливании крови или во время беременности. По наличию на эритроцитах антигенов А и В, а также присутствию в сыворотках крови анти-А- и анти-В-антител различают 4 группы крови, характеристика которых приведена в табл. 15.1.

Таблица 15.1. Группы крови по системе АВ0

Характеристика	Группа крови			
	0	А	В	АВ
Антигены на эритроцитах	Нет	А	В	А+В
Антитела в сыворотке	Анти-А, анти-В	Анти-В	Анти-А	Нет

### 15.1.2. АНТИГЕНЫ ЭРИТРОЦИТОВ СИСТЕМЫ РЕЗУС (РЕЗУС-ФАКТОРА)

Система резус-фактора названа так, потому что впервые была выявлена у обезьян резус (Rh). Ее определение также имеет большое значение для успешного переливания крови. В системе резус выделяют

5 основных антигенов: С, с, D, E и e. Однако только D-антиген имеет существенное практическое значение. Около 85% населения нашей страны имеют D-антиген на эритроцитах. В этих случаях говорят, что человек резус-положительный (RhD+). Около 15% людей не имеют D-антигена и являются резус-отрицательными (RhD-).

Обладая выраженными иммуногенными свойствами, антиген D в 95% случаев служит причиной гемолитической болезни новорожденных при несовместимости матери и плода, а также частой причиной тяжелых посттрансфузионных осложнений.

Антитела к антигенам эритроцитов системы Резус могут появиться в крови человека в результате переливания ему эритроцитов доноров, содержащих антигены, которые отсутствуют у реципиента (лимфоциты в ответ на попадание чужеродного антигена синтезируют антитела), а также у матери в ответ на ее иммунизацию эритроцитами плода.

### 15.1.3. АНТИГЕНЫ СИСТЕМЫ КЕЛЛ

Система антигенов эритроцитов Келл (KELL) была открыта в 1946 г. Р. Кумбсом при исследовании причин гемолитической болезни новорожденных. В настоящее время насчитывают 24 антигена эритроцитов системы Келл. Наибольшее клиническое значение при трансфузиях имеет антиген К из-за его высокой иммуногенности. Частота встречаемости антигена составляет у нас в стране 7–10%. Именно поэтому почти каждая 10-я гемотрансфузия — гемотрансфузия Келл-положительной крови Келл-отрицательному реципиенту, а каждая 10-я беременность — беременность Келл-отрицательной женщины Келл-положительным плодом.

В сыворотке крови присутствуют антитела к антигену К (анти-К). Эти антитела могут вырабатываться после гемотрансфузий или при гемолитической болезни новорожденных. Однако встречаются анти-К-антитела, которые выработались у индивидов без наличия в анамнезе этих состояний. Появление этих антител связывают с широким распространением в природе микроорганизмов, в клеточной стенке которых содержатся белковые молекулы, близкие по своей структуре с антигеном К человека.

Трансфузионные реакции, вызванные анти-К-антителами, могут привести к смертельному исходу. Антигены системы Келл выявляют на эритроцитах плода в ранние сроки беременности. При наличии в крови матери анти-К-антител они могут проникать в кровь плода и вызвать гемолитическую болезнь новорожденных. При этом анти-К-антитела вызывают наиболее тяжелые формы болезни с внутриутроб-



ной смертью и мертворождением. Частота встречаемости гемолитической болезни новорожденных, обусловленной анти-К-антителами, составляет 1 случай на 10 000–20 000 родов. Учитывая тяжелые последствия заболевания, у нас в стране проводят обязательное обследование доноров и беременных на наличие антигенов эритроцитов системы Келл (К-антигена). При его выявлении дополнительно определяют анти-К-антитела.

#### 15.1.4. ДРУГИЕ, МЕНЕЕ ЗНАЧИМЫЕ АНТИГЕНЫ ЭРИТРОЦИТОВ

При проведении переливания крови обычно исследуют наличие антигенов системы АВ0 и Резус. Из остальных 236 антигенов, которые могут находиться, а могут и отсутствовать на поверхности эритроцитов, некоторые имеют практическое значение при переливании крови. Среди антигенов эритроцитов — это антигены системы Даффи (Duffy — антиген Fy), Кидд (Kidd — антиген Jk), MNS (антиген MNS) и Льюис (Lewis — антиген Le). Эти антигены редко вызывают трансфузионные реакции, так как встречаются их у людей нечасто, они относительно слабо иммуногенны. В системе резус, помимо антигена D, могут встречаться антигены C, c, E и e.

Безусловно, в идеальном варианте при решении вопроса о переливании пациенту крови было бы целесообразно определение максимально возможного числа антигенов эритроцитов. Это позволило бы осуществлять индивидуальный подбор крови для каждого реципиента. Однако на практике реализовать это очень трудно, да в целом и не нужно, так как не все антигены эритроцитов обладают выраженной иммуногенностью, а ряд из них встречается очень редко.

### 15.2. АНТИТЕЛА К АНТИГЕНАМ ЭРИТРОЦИТОВ

Наличие различных систем антигенов на эритроцитах имеет большое практическое значение при переливании крови. Это обусловлено тем, что в плазме крови реципиента могут присутствовать антитела к ним. Реакция на переливание несовместимой крови происходит в том случае, если антитела реципиента связываются с соответствующими антигенами эритроцитов донора. Это связывание антигенов с антителами приводит к разрушению эритроцитов донора и называют гемолизом. Гораздо реже гемолиз наступает в результате разрушения эритроцитов реципиента антителами донора. Этот процесс возможен

при трансфузиях донорской плазмы, содержащей антитела к антигенам эритроцитов реципиента. Для описания такого осложнения переливания крови или плазмы используют термины «гемолитическая трансфузионная реакция» или «посттрансфузионное гемолитическое осложнение».

Если плазма реципиента не содержит антител к антигенам эритроцитов донора, их кровь называют совместимой, и донорскую кровь можно безопасно переливать.

Для понимания основ развития гемолитической трансфузионной реакции важнейшим считают механизм образования антител к антигенам эритроцитов в организме реципиента. Откуда появляются эти антитела и при каких ситуациях?

Из основ иммунологии хорошо известно, что антитела образуются только после контакта лимфоцитов с соответствующим чужеродным антигеном. Для клинической практики важно понимать, что существует два случая, когда лимфоциты реципиента могут вступать в контакт с чужеродными антигенами эритроцитов. Первый из них — переливание донорской крови, а второй — беременность. В первом случае антиген непосредственно поступает в организм с эритроцитами донора, и иммунная система реципиента отвечает на них синтезом специфических антител. Во время беременности эритроциты плода могут проникать в кровотоки матери. Если они содержат на своей поверхности антигены, унаследованные от отца, а эритроциты матери не имеют этих антигенов, то иммунная система матери рассматривает такие клетки как «чужие» и начинает синтезировать антитела к ним.

Напомним, что при первичном контакте с чужеродным антигеном, иммунная система продуцирует небольшое количество антител. Именно поэтому при первом переливании крови или беременности они не оказывают выраженного повреждающего действия. Однако в результате первичного контакта с чужеродным антигеном формируются В-лимфоциты памяти, которые хранят информацию об антигене. При повторном контакте с чужими эритроцитарными антигенами они синтезируют большое количество антител, способных разрушать эритроциты донора. Такие антитела называют антиэритроцитарными.

Наибольшее практическое значение такой механизм появления антител имеет в отношении антител к эритроцитам, несущим RhD-антиген (антиген системы резус-фактора). Безусловно, что только те люди, которые не имеют RhD-антигена (15% населения, резус-отрицательные), могут быть иммунизированы и вырабатывать анти-D-антитела. Примерно 1% населения имеют такие антитела в результате предыдущего переливания крови или беременности. Если таким

лицам переливают резус-положительную кровь, антитела, имеющиеся в их плазме, связываются с антигенами на поверхности донорских эритроцитов, что вызывает их гемолиз.

Однако проблема гемолитических трансфузионных реакций в том, что иммунные антиэритроцитарные антитела не единственные, представленные в плазме реципиента. Именно поэтому не только лица, имеющие в анамнезе переливание крови и беременность, подвержены риску переливания несовместимой крови.

Напомним, что клиническое значение групп крови системы АВ0 в том, что антитела к антигенам эритроцитов присутствуют в плазме крови изначально (являются врожденными), а не возникают в результате предшествующей иммунизации чужеродными эритроцитами. Лица с группой крови 0 (на эритроцитах нет антигенов А и В) имеют в сыворотке крови антитела к обоим антигенам (анти-А и анти-В). Люди с группой крови А (А-антиген на эритроцитах) имеют антитела к В-антигену (анти-В). Лица с группой крови В имеют анти-А-антитела. Примерно 3–4% населения имеют группу крови АВ (на эритроцитах присутствуют А- и В-антигены) и, следовательно, не содержат антител в сыворотке крови.

Широкая распространенность и потенциальная опасность наличия анти-А- и анти-В-антител обуславливает первостепенное клиническое значение определения группы крови по системе АВ0 у донора и реципиента.

Все остальные антитела, имеющие значение для клинической практики, появляются подобно анти-Д-антителам, в результате иммунизации и отсутствуют в сыворотке крови, если в анамнезе пациента не было переливания крови или беременности.

Таким образом, важнейшее клиническое значение имеют только изначально существующие в организме человека антитела — анти-А и анти-В. Именно поэтому, если обеспечена совместимость донора и реципиента по системе АВ0, переливание крови на 97% иммунологически безопасно.

### **15.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГРУППЫ КРОВИ, РЕЗУС-ФАКТОРА, ТИТРА АНТИТЕЛ И СОВМЕСТИМОСТИ КРОВИ ДОНОРА И РЕЦИПИЕНТА**

Предупреждение переливания пациенту несовместимой крови предусматривает выполнение целого комплекса мероприятий и ана-

лизов в отношении крови реципиента и донора. Частично эти анализы выполняют в лечебном отделении ЛПУ, но в основной части — в КДЛ.

Для определения группы крови, резус-фактора и титра антител достаточно взять у пациента 6–8 мл крови в обычную пробирку (вакутейнер) без каких-либо добавок. Допускают хранение проб крови до 1 сут при температуре 4–8 °С.

Переливание донорской крови представляет потенциальную опасность для пациента. В первую очередь необходимо исключить возможность переливания донорской крови «не тому» пациенту. Для этого чрезвычайное значение имеет точная идентификация пациента и скрупулезность при оформлении сопроводительной документации, когда производят взятие крови для определения группы крови и резус-фактора. Перед взятием крови необходимо убедиться, что перед вами именно тот пациент, которому назначены анализы, спросив его фамилию, имя и отчество и проверив, совпадают ли они с данными бланка-заявки.

На этикетке пробирки и бланке-заявке должна быть отражена следующая информация:

- фамилия, имя и отчество пациента;
- пол и дата рождения;
- номер истории болезни (амбулаторной карты);
- отделение и палата;
- данные врача, назначившего анализы;
- дата и время взятия крови;
- фамилия и инициалы лица, берущего кровь.

Прежде чем приступить к переливанию крови, необходимо провести ряд исследований по предупреждению несовместимости при переливании крови. Согласно существующим у нас в стране руководящим документам, перед отправкой крови пациента для исследования в лабораторию необходимо определить группу крови в процедурном кабинете. Это исследование должен выполнить врач-клиницист. Однако в практической жизни определение группы крови проводит медицинская сестра, а врач оценивает результаты теста. Именно поэтому медицинская сестра должна знать методику проведения исследования, которая аналогична той, что выполняют в лаборатории с моноклональными антителами (целиклонами) и приведена ниже. Результат определения группы крови в процедурном кабинете вносят в направление, его подписывает врач-клиницист, и вместе с пробой крови доставляют в лабораторию.

Первый анализ, который проводят в лаборатории, — определение группы крови пациента. Одновременно определяют резус-фактор.

### 15.3.1. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В ИММУНОГЕМАТОЛОГИИ

Для определения группы крови используют различные методы. В нашей стране определение группы крови АВ0 проводят по антигенам, содержащимся на исследуемых эритроцитах, либо по антигенам эритроцитов и антителам, содержащимся в исследуемой сыворотке. В первом случае для исследования используют стандартные изогемагглютинирующие сыворотки или моноклональные антитела (целиклоны), во втором — стандартные изогемагглютинирующие сыворотки или моноклональные антитела, а также стандартные эритроциты групп крови А, В и 0 (перекрестный метод). Наибольшее распространение у нас в стране получил метод с использованием моноклональных антител (целиклонов) и стандартных эритроцитов (перекрестный метод).

**Определение группы крови.** Группу крови по системе АВ0 определяют простым смешиванием на плоскости планшета эритроцитов пациента с тремя сыворотками: одна из них содержит анти-А-, другая анти-В-, а третья анти-А+В-антитела (целиклоны). Связывание антител с соответствующими антигенами проявляется агглютинацией эритроцитов. Этот феномен отражает другое название для эритроцитарных антигенов и антител. Антитела к эритроцитам называют агглютинидами, а антигены — агглютиногенами. При добавлении сывороток к антигенам эритроцитов эритроциты либо агглютинируют, либо остаются во взвешенном состоянии. Оценку результатов проводят в соответствии с данными табл. 15.2. Медицинская сестра в процедурном кабинете при определении группы крови выполняет только эту часть методики.

**Таблица 15.2.** Оценка результатов реакции агглютинации эритроцитов с моноклональными антителами

Результат реакции исследуемых эритроцитов с антителами			Исследуемая кровь принадлежит к группе
Анти-А	Анти-В	Анти-АВ	
—	—	—	0
+	—	+	А
—	+	+	В
+	+	+	АВ

В лаборатории же выполняют еще и дополнительный проверочный тест, при котором сыворотку крови пациента добавляют к стандартным эритроцитам группы крови 0, А и В.

Учет реакции производят путем сопоставления результатов, полученных при помощи стандартных сывороток и стандартных эритроцитов. Результаты обеих реакций должны совпадать, то есть указывать на содержание агглютиногенов и агглютининов, соответствующих одной и той же группе крови.

**Определение резус-фактора.** Резус-фактор определяют смешиванием эритроцитов пациента с раствором моноклональных антител анти-D. Агглютинация указывает на присутствие D-антигена на эритроцитах. Такая кровь является резус-положительной. Отсутствие агглютинации указывает, что кровь пациента резус-отрицательна.

**Определение антител.** Определение группы крови пациента по системе АВ0 позволяет установить, какие антитела (агглютинины) к эритроцитам имеются в крови у пациента. Плазма крови может содержать либо анти-A-, либо анти-B-антитела, или те и другие, либо ни те, ни другие. Примерно в 97% случаев другие антитела в сыворотке крови у пациента отсутствуют. В подавляющем большинстве случаев все остальные антитела к эритроцитам, включая антитела к резус-фактору (анти-D-антитела), появляются в сыворотке крови пациента только в результате предшествующей иммунизации при гемотрансфузии или беременности. Вместе с тем необходимо понимать, что в случае присутствия таких нетипичных антиэритроцитарных антител в крови пациента они потенциально способны вызвать гемолитическую реакцию, если переливаемые эритроциты несут соответствующий антиген. Именно поэтому в сыворотке крови всех пациентов, которым назначено переливание крови, проводят поиск нетипичных антиэритроцитарных антител.

Тест проводят путем добавления капли сыворотки крови пациента к набору образцов разных эритроцитов группы 0, каждый из которых несет известную комбинацию антигенов, способных вызвать иммунную реакцию.

В основе теста лежит иммунологическая особенность эритроцитов группы 0 — они не несут на себе ни A-, ни B-антигенов. Именно поэтому любая агглютинация при добавлении к ним сыворотки пациента будет обусловлена присутствием в ней нетипичных антител. Отсутствие агглютинации указывает на их отсутствие.

При положительной реакции на наличие антител их идентификацию проводят таким же методом с использованием панели эритроцитов, содержащих 12–15 образцов с различными антигенами.

В практической медицине антитела к эритроцитам определяют в следующих случаях:

- у доноров перед сдачей крови, чтобы быть уверенным, что заготовленная кровь (или гемотрансфузионная среда — тромбовзвесь,

плазма, эритроконцентрат) не содержит антител, способных вызвать гемолиз эритроцитов реципиентов;

- у реципиентов перед переливанием крови, чтобы предотвратить гемотрансфузию, несовместимую по антигенам эритроцитов донора с антителами реципиента;
- у беременных для выявления возможного иммунологического конфликта с плодом по антигенам эритроцитов (для предупреждения гемолитической болезни новорожденных).

**Исследование донорской крови.** После определения группы крови, резус-фактора и антител к эритроцитам у пациента необходимо провести подбор подходящей донорской крови. Подбирают кровь, эритроциты которой не несут антигенов, реагирующих с антителами в сыворотке реципиента. Пациентам, у которых не обнаружено дополнительных антител, достаточно подобрать кровь, совместимую по АВ0 и резус-фактору. В большинстве случаев это означает подбор крови той же АВ0-группы и резус-принадлежности, что и у пациента.

Пациентам, у которых обнаружены нетипичные антитела, необходимы дальнейшие шаги по подбору донорской крови. Первоначально отбирают кровь, соответствующую по системе АВ0 и резус-фактору, как описано выше. В дальнейшем эритроциты этой донорской крови проверяют на присутствие антигенов, антитела к которым обнаружены в сыворотке крови пациента. Если такие антигены отсутствуют — эту кровь можно переливать, если нет — подбирают другую донорскую кровь.

**Определение совместимости крови донора и реципиента.** Проведя подбор донорской крови, эритроциты которой не несут антигенов, реагирующих с антителами в плазме реципиента, осуществляют последнюю проверку, чтобы гарантировать совместимость. Для этого выполняют анализ, который моделирует переливание крови, но проводят его в пробирке. Сущность анализа в том, что донорские эритроциты смешивают с образцом сыворотки крови пациента (реципиента) и наблюдают за появлением агглютинации. Если агглютинации не происходит, то это указывает на отсутствие реакции антиген—антитело, а значит, и на совместимость эритроцитов донора с плазмой пациента и безопасность предстоящего переливания крови.

### 15.3.2. СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ИММУНОГЕМАТОЛОГИИ

Среди современных технологий определения антигенных систем эритроцитов и антител к эритроцитам наиболее широко используют метод с гелевыми картами и твердофазную микроплащечную технологию.

Обнаружение антигенов эритроцитов в гелевых картах осуществляют методом агглютинации в геле. Гелевые карты представляют собой пластиковые карточки, в которые встроено от 5 до 8 пробирок. На рис. 15.2 приведена гелевая карточка с 6 пробирками. В 5 пробирках содержится смесь геля и антисывороток, 6-я пробирка содержит нейтральный гель и служит в качестве контроля.

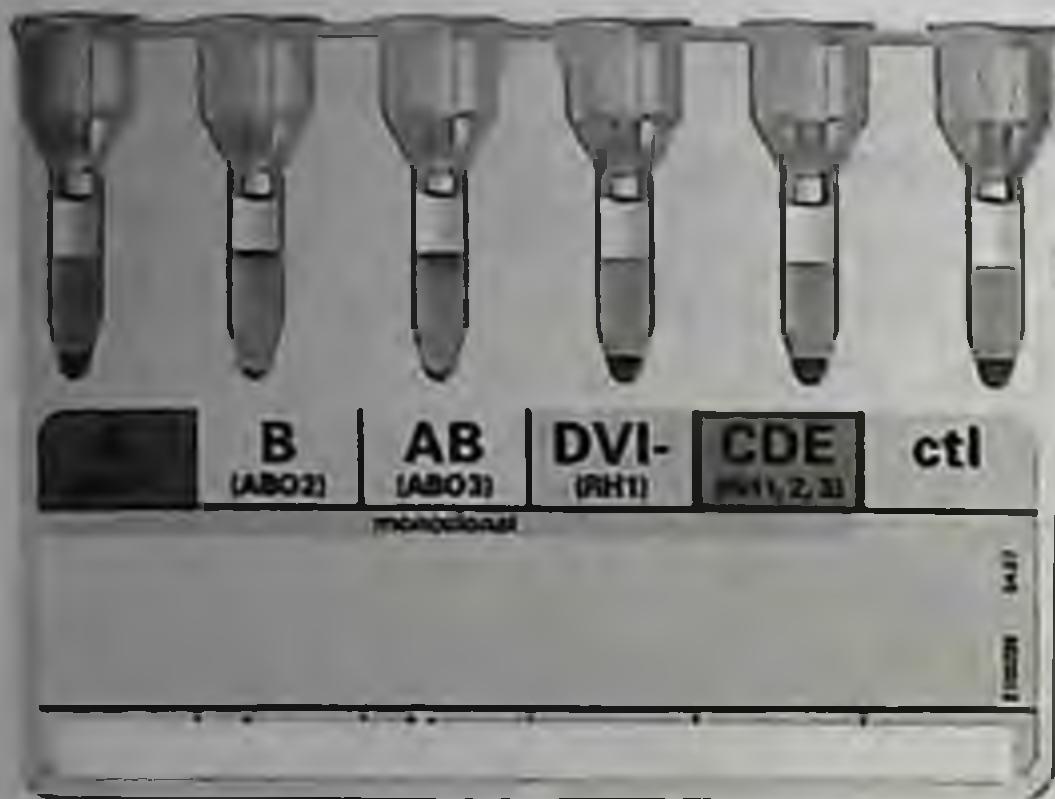


Рис. 15.2. Гелевая карточка для определения антигенов эритроцитов по системе ABO

При добавлении исследуемых эритроцитов в пробирку с гелем, содержащую, например, анти-А-антитела, при наличии антигена А на эритроцитах происходит реакция агглютинации, которая усиливается при центрифугировании гелевой карты. Образующиеся агглютинины после центрифугирования остаются в верхней части пробирки, так как не проходят через гель из-за большого размера (положительный результат). При отсутствии антигена в исследуемой пробе крови эритроциты не образуют агглютинатов с антисывороткой, при центрифугировании легко проходят через гель и оседают на дне пробирки (отрицательный результат).

В зависимости от силы реакции агглютинации в гелевой среде принята следующая оценка полученных результатов (рис. 15.3):

- сильноположительный (++++) — образовавшиеся агглютинаты эритроцитов задержались на поверхности геля;
- положительный (+++) — агглютинаты располагаются в верхней трети столбика геля;
- слабоположительный (++) — агглютинаты фиксированы в верхних 2/3 геля;
- очень слабоположительный (+) — агглютинаты располагаются в нижней трети геля;



- отрицательный (—) — эритроциты формируют на дне микропробирки компактный осадок.

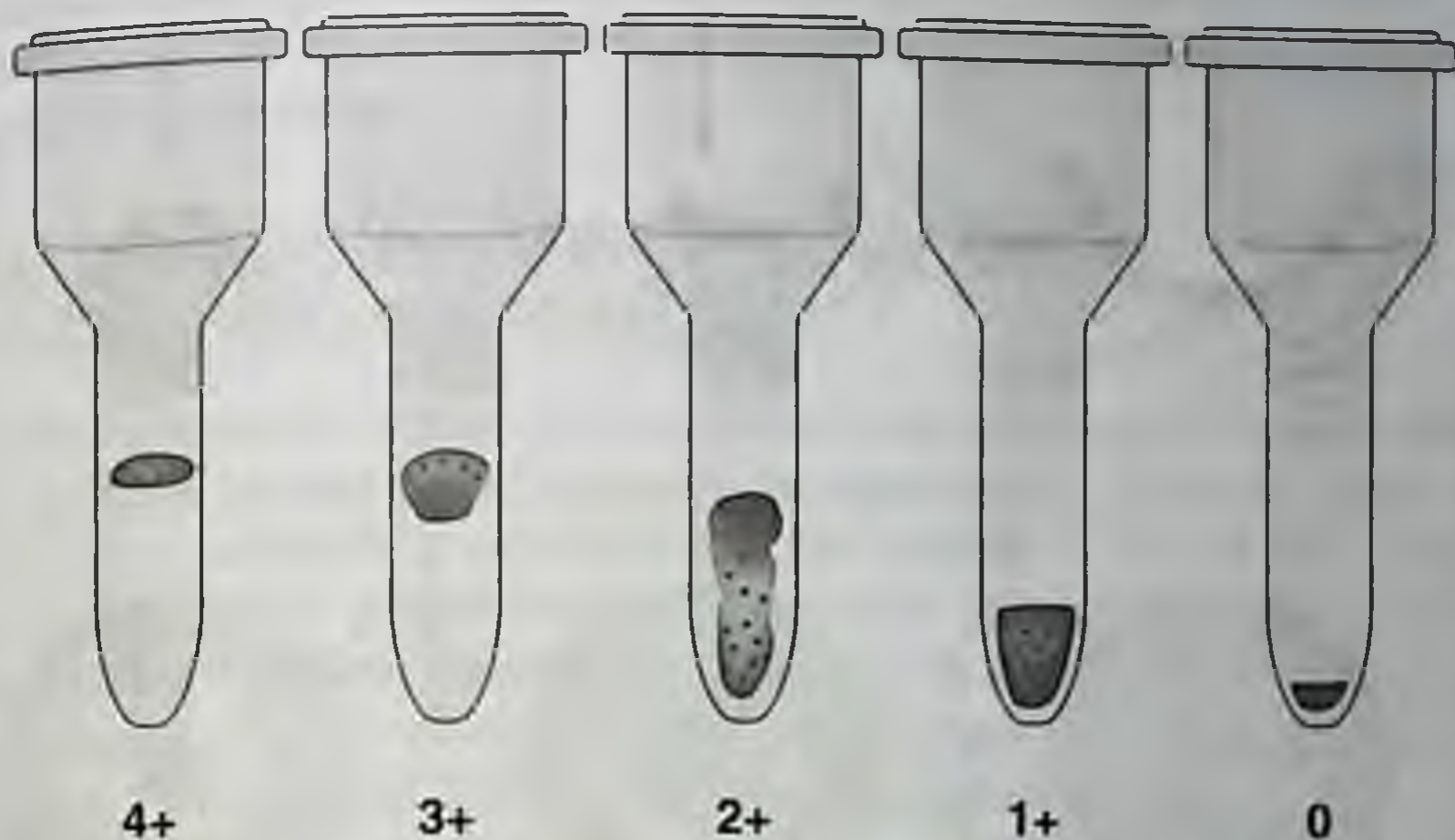


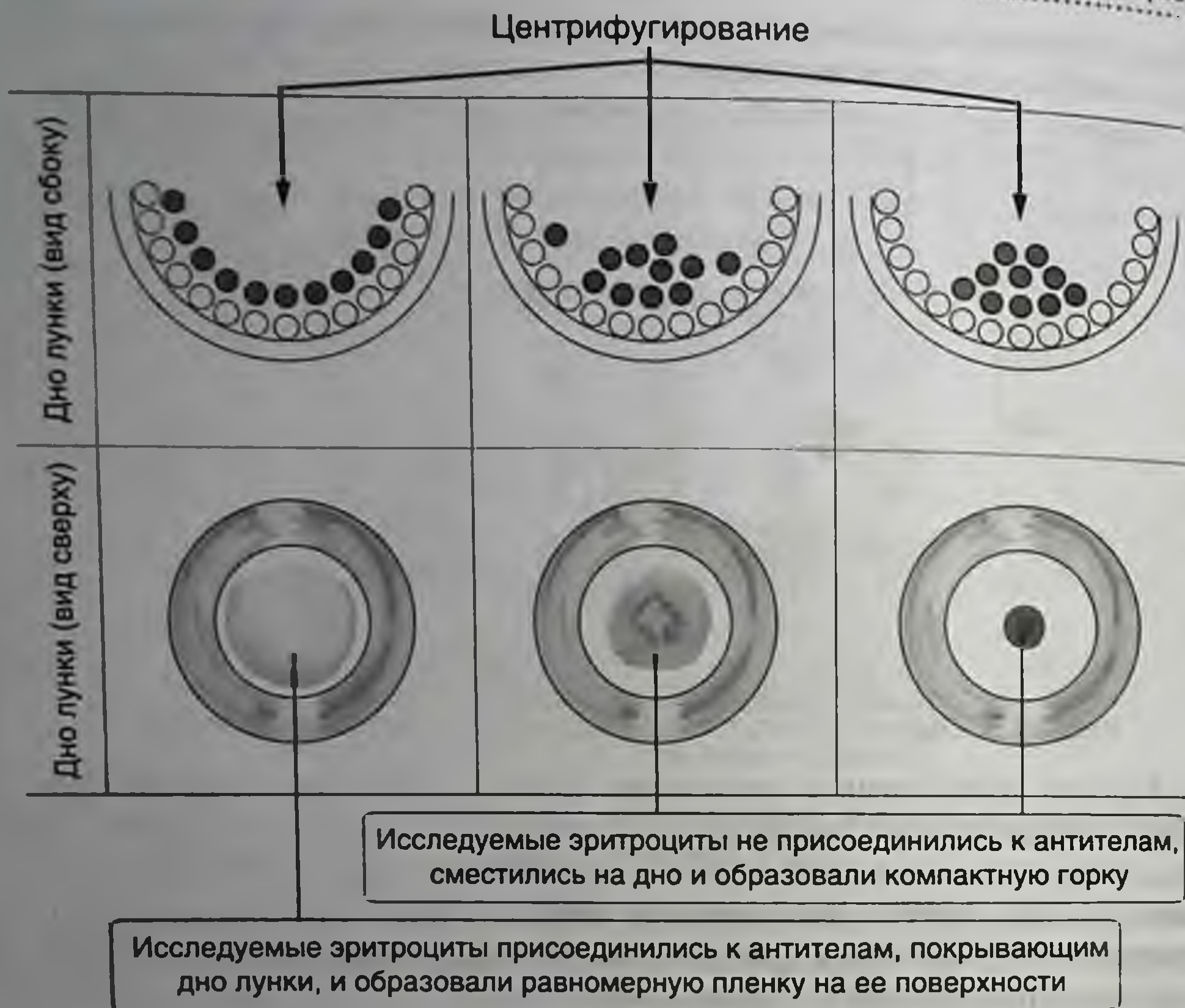
Рис. 15.3. Оценка результатов агглютинации в гелевых карточках

Гелевая технология в настоящее время полностью автоматизирована, а современные иммуногематологические анализаторы осуществляют раскапывание проб крови, инкубирование, центрифугирование гелевых карт, проведение анализа всего спектра антигенных систем эритроцитов и антител к эритроцитам, а также интерпретацию и архивирование результатов исследований.

В твердофазной микроплащечной технологии антитела к эритроцитам предварительно иммобилизованы (прикреплены) ко дну лунок полистереновых микропланшет. После внесения в лунки микропланшета исследуемых эритроцитов при наличии на них соответствующих антигенов при центрифугировании происходит реакция агглютинации. Таким образом, в случае положительной реакции образуются комплексы антитело—антиген, посредством которых исследуемые эритроциты фиксируются к подложке (дну лунок). Вследствие этого исследуемые эритроциты покрывают поверхность лунок клеточным слоем.

При отрицательной реакции — отсутствии антигенов — исследуемые эритроциты не фиксируются к подложке. В этом случае при центрифугировании исследуемые эритроциты образуют компактный осадок в виде «пуговицы» на дне лунки (рис. 15.4).

Для определения антител к антигенам эритроцитов в исследуемой пробе крови используют микропланшеты, в которых на поверхности полистироловых микропланшетов иммобилизованы мембранные антигены эритроцитов.



**Рис. 15.4.** Твердофазная микроплашечная технология

Твердофазная микроплашечная технология полностью автоматизирована. Иммуногематологические анализаторы, использующие данную технологию, обладают высокой производительностью и точностью.

## 15.4. ОСЛОЖНЕНИЯ ПОСЛЕ ГЕМОТРАНСФУЗИЙ

Термин «посттрансфузионные реакции и осложнения» используют для обозначения всех нежелательных последствий, возникающих у реципиента после переливания крови. При проведении гемотрансфузий у реципиентов возможны реакции и осложнения иммунологического и неиммунологического типа. Осложнения иммунологического типа обусловлены иммунологическим конфликтом между компонентами крови донора и реципиента, в основе которых лежит реакция антиген–антитело. Осложнения неиммунологического типа обусловлены

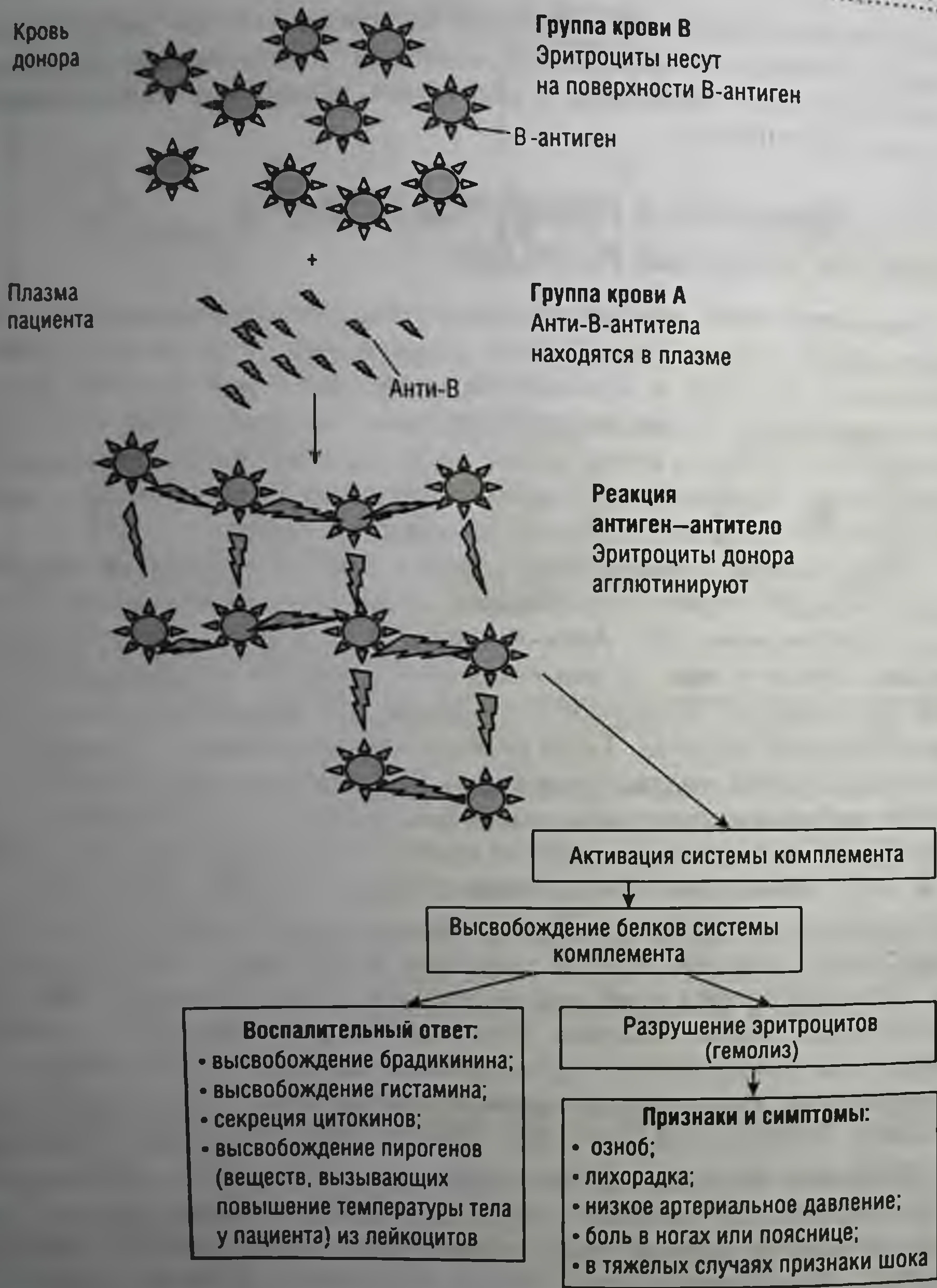
многими причинами: трансфузиями гемолизированных эритроцитов, переливаниями инфицированной вирусами и бактериями крови, метаболическими нарушениями в результате трансфузии, нарушениями техники переливания.

### 15.4.1. ИММУННЫЕ ГЕМОЛИТИЧЕСКИЕ ТРАНСФУЗИОННЫЕ РЕАКЦИИ

Гемолитические реакции и осложнения обусловлены разрушением эритроцитов доноров антителами реципиентов. Гораздо реже гемолитические реакции и осложнения наступают в результате разрушения эритроцитов реципиента антителами доноров (наблюдаются при трансфузиях плазмы, содержащих антитела к антигенам эритроцитов реципиента). Частота осложнений иммунного гемолитического типа составляет от 0,002 до 0,2% числа всех гемотрансфузий.

Самой частой причиной иммунных гемолитических трансфузионных реакций служат переливания крови, несовместимые по антигенам эритроцитов АВ0. Анти-А-, анти-В-антитела, присутствующие в плазме крови у лиц, не имеющих соответственного антигена А или В на эритроцитах, реагируют с эритроцитами донора, несущими этот несовместимый антиген. Такая реакция может начаться уже после введения нескольких миллилитров крови. Закономерности развития гемолитической реакции на примере донора с группой крови В, кровь которого перелили пациенту с группой крови А, представлены на рис. 15.5.

В этом случае анти-В-антитела в плазме пациента (реципиента) связываются с антигеном В на поверхности эритроцитов донора. Происходит реакция антиген-антитело и агглютинация эритроцитов. Образовавшийся комплекс антиген-антитело активирует систему комплемента. Белки системы комплемента ответственны за многие проявления гемолитической трансфузионной реакции. Они участвуют в разрушении эритроцитов (гемолизе) путем образования в клеточной мембране эритроцитов отверстия, через которые в эритроцит из плазмы крови поступает вода. Эритроциты содержат много белка (гемоглобина), поэтому притягивают воду. В результате эритроциты набухают и их мембраны разрываются, а содержимое (гемоглобин) попадает в плазму. Интенсивность разрушения эритроцитов в основном зависит от уровня антител в плазме пациента. В наиболее тяжелых случаях АВ0-несовместимости могут разрушиться все донорские эритроциты. Кроме того, белки системы комплемента запускают воспалительный ответ, который включает высвобождение биологически высокоактивных веществ из активированных тучных клеток (гистамин, брадикинин),



**Рис. 15.5.** Реакция на переливание несовместимой крови

что приводит к появлению озноба, лихорадки и резкому падению АД. Последнее вызывает развитие шока и снижает кровоснабжение почек, а следовательно, СКФ. В наиболее тяжелых случаях развивается ОПН.

Другие осложнения тяжелой гемолитической трансфузионной реакции включают ДВС-синдром и желтуху, так как гемоглобин, вышедший из разрушенных эритроцитов, превращается в билирубин.

Если донорская кровь совместима с кровью реципиента по системе АВ0, то остается риск гемолитической трансфузионной реакции при наличии в плазме пациента других антиэритроцитарных антител. В большинстве случаев эти антитела приобретаются на протяжении жизни в результате перенесенных переливаний крови или беременности. Наиболее значимы из них анти-D-антитела (антитела к резус-фактору). Гемолитические реакции и осложнения, обусловленные анти-D-антителами, занимают 2-е место среди всех таких осложнений после несовместимости по антигенам эритроцитов АВ0. Значительно реже гемолитические трансфузионные реакции связаны с наличием антител к другим антигенам системы Резус, такими как анти-C-, анти-c-, анти-E- и анти-e-антитела. Еще реже гемолитические реакции связаны с наличием антител к другим антигенам эритроцитов: анти-K- (к группе антигенов Келл), анти-Fy (к группе антигенов Даффи) и др. Клинические проявления гемолитической трансфузионной реакции, которая развивается из-за присутствия этих антител, менее тяжелые, чем при несовместимости по группе АВ0. Довольно часто они могут носить отсроченный характер (на срок до 10 дней). В результате разрушения эритроцитов развивается гемолитическая анемия и умеренная желтуха.

В случае развития тяжелой гемолитической реакции необходимо повторно направить в лабораторию пробу донорской крови и свежий образец крови пациента для выяснения причины реакции. В обеих пробах крови лаборатория повторно определяет группу крови, резус-фактор, нетипичные антитела в плазме крови пациента и совместимость крови донора и реципиента.

### 15.4.2. ДРУГИЕ ТРАНСФУЗИОННЫЕ РЕАКЦИИ

Помимо гемолитических, существуют и другие реакции, которые могут происходить во время переливания крови. Среди них чаще встречаются негемолитические иммунные реакции. Они происходят при участии иммунной системы реципиента, но не сопровождаются гемолизом. Антитела, вызывающие негемолитические реакции, направлены к антигенам лейкоцитов и тромбоцитов донора. Чаще всего клиническое течение негемолитических осложнений менее тяжелое, смертельные исходы наблюдают редко.

Фебрильные негемолитические реакции клинически проявляются повышением температуры тела реципиента в течение 8–24 ч после

переливания. Сопровождаются ознобом, иногда болью головной и в спине. Негемолитические реакции обусловлены взаимодействием между антителами, присутствующими в плазме реципиента, и антигенами, находящимися на перелитых реципиенту лимфоцитах, гранулоцитах и тромбоцитах донора. Они не опасны для жизни пациента, их встречают в 1 случае на 130–140 трансфузий крови или в 20% при переливаниях тромбоцитарной массы. Такие реакции чаще наблюдаются у реципиентов, имеющих в анамнезе множественные трансфузии или многократные беременности.

**Аллергические реакции — крапивница** — обусловлены аллергией к одному или нескольким белкам плазмы переливаемой крови. Реакция характеризуется сыпью, кожным зудом, обычно без повышения температуры тела. Она проявляется через 15–20 мин после трансфузии. Очень редко аллергия может проявляться тяжелым анафилактическим шоком — неотложным состоянием, характеризующимся падением АД, болью в груди и одышкой.

**Бактериальная инфекция.** Очень редко в клинической практике могут встречаться случаи переливания крови, загрязненной бактериями. В таких ситуациях клинические симптомы у пациента в связи с бактериемией могут варьировать и зависят от вида и количества бактерий, попавших в кровь реципиента. В наиболее тяжелых случаях возможно развитие сепсиса.

## 15.5. ГЕМОЛИТИЧЕСКАЯ БОЛЕЗНЬ НОВОРОЖДЕННЫХ

Гемолитическая болезнь новорожденного и плода развивается при наличии в крови у матери антител к антигенам эритроцитов плода, способных проходить через плаценту в кровотоки ребенка и взаимодействовать с его эритроцитами, вызывая их гемолиз.

Наиболее частой причиной гемолитической болезни новорожденных служат антитела к антигенам резус-системы. Если ребенок унаследовал от отца эритроцитарные антигены, с которыми реагируют материнские антитела, происходит гемолитическая реакция, и эритроциты плода разрушаются.

В наибольшей степени риск развития гемолитической болезни выражен при беременности, когда мать принадлежит к группе 0RhD(–), а отец 0RhD(+). Согласно законам наследования, имеется один шанс из четырех, что ребенок будет резус-положительным. Если это происходит, то эритроциты плода, несущие D-антиген, проходя через

плаценту в кровь матери, распознаются лимфоцитами матери как чужеродные антигены. В ответ на поступление чужеродных антигенов В-лимфоциты продуцируют анти-D-антитела. При первой беременности количество синтезированных антител недостаточно для того, чтобы вызвать иммунную реакцию и массовый гемолиз эритроцитов плода. Однако в крови матери образуются В-лимфоциты памяти, которые хранят информацию о чужеродном D-антигене и могут ответить массивной продукцией антител при повторном поступлении антигена. Именно поэтому при последующих беременностях резус-положительным плодом в организме женщины образуется большое количество анти-D-антител. Они поступают из крови матери в кровь плода и связываются с антигеном на его эритроцитах, вызывая их массивный гемолиз.

Гемолиз эритроцитов влечет повышенное образование билирубина и гипербилирубинемия, так как печень плода еще функционально незрела и не может осуществлять его связывание с глюкуроновой кислотой (в печени отсутствует фермент, обеспечивающий связывание свободного билирубина с глюкуроновой кислотой). Именно поэтому во время внутриутробного развития билирубин в крови плода находится в несвязанном (свободном) состоянии. Он может проходить через плаценту в кровь матери и подвергаться связыванию и удалению ее печенью. Этот процесс приводит к снижению уровня гипербилирубинемии плода. Однако в наиболее тяжелых случаях развивающаяся гемолитическая анемия может привести к внутриутробной гибели плода.

После рождения в связи с функциональной недостаточностью печени новорожденного превращение свободного билирубина в связанный (конъюгированный) в печеночных клетках идет замедленно. Именно поэтому концентрация свободного билирубина в крови, который не может выделяться почками, начинает быстро возрастать. В результате развивается гипербилирубинемия, что клинически выражается в желтушном окрашивании кожного покрова и слизистых оболочек новорожденного. Повышение концентрации свободного билирубина в крови плода оказывает токсическое действие на все ткани новорожденного. Поскольку свободный билирубин хорошо растворим в жирах, то при высокой концентрации происходит его накопление в богатых липидами нервных клетках. Под действием гипербилирубинемии поражаются преимущественно подкорковые и ствольные ядра головного мозга, в результате развивается билирубиновая энцефалопатия.

Ребенок с гемолитической желтухой может нуждаться в обменном переливании крови, при котором резус-положительная кровь (новорожденного), содержащая повреждающие антитела, замещается

резус-отрицательной (донора), эритроциты которой из-за отсутствия антигенов не могут быть разрушены.

В целях предотвращения развития гемолитической болезни новорожденных, вызванной резус-несовместимостью, всем резус-отрицательным женщинам, впервые беременным резус-положительным плодом, показано введение (в виде инъекции) иммуноглобулин человека антирезус Rho[D] (анти-D-антитела). Иммуноглобулин человека антирезус Rho[D] должен быть введен до того, как началась иммунизация, или при любом сроке беременности, если имеются подозрения, что эритроциты плода проникли в кровь матери. Введенные анти-D-антитела разрушают эритроциты плода в крови матери прежде, чем они вызовут иммунный ответ, и тем самым предупреждают продукцию собственных антител, которые могут осложнить последующие беременности.

Другие антитела, которые принадлежат к системе резус-фактора (анти-C, анти-E и анти-e), также могут вызвать гемолитическую болезнь. Однако такие варианты заболевания встречаются редко.

Как причину гемолитической болезни новорожденных несовместимость по системе группы крови АВ0 встречаются крайне редко. Это обусловлено тем, что анти-A- и анти-B-антитела не могут проникать через плаценту и вступать в контакт с эритроцитами плода. В редких случаях при осложненном течении беременности возможно развитие гемолитической болезни новорожденных, обусловленной АВ0-несовместимостью. Однако клинически она протекает легко.

Учитывая серьезные последствия, которые могут оказывать нетипичные антиэритроцитарные антитела на плод, необходимо обследовать женщин на наличие таких антител в ранние сроки беременности.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ

1. Что собой представляют антигены эритроцитов?
2. Перечислите основные антигенные системы эритроцитов.
3. Почему в организме человека могут образовываться антитела к антигенам эритроцитов?
4. Перечислите основные методы определения группы крови.
5. Как проводят определение совместимости крови донора и реципиента?
6. Назовите возможные осложнения при переливании крови.
7. Опишите клинические проявления реакции на переливание несовместимой крови.
8. Почему развивается гемолитическая болезнь новорожденного?
9. Какие меры направлены на предупреждение развития гемолитической болезни новорожденного?



## ТЕОРИЯ И ПРАКТИКА ЛАБОРАТОРНЫХ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Организм человека защищается от возбудителей инфекционных заболеваний с помощью механизмов иммунитета. В основе иммунитета лежат антиген-неспецифические (врожденные) и антиген-специфические (приобретенные, адаптивные) факторы защиты. Реализация антиген-специфических механизмов иммунитета — функция высокоспециализированных клеток иммунной системы — лимфоцитов. Антиген-специфические механизмы иммунного ответа формируются только после контакта с конкретным микроорганизмом, возбудителем инфекционного заболевания. Белки, входящие в состав структур микроорганизмов, служат чужеродными веществами для организма человека, их называют антигенами. Основная защитная функция лимфоцитов состоит в распознавании и удалении чужеродных антигенов (бактерий). Одним из механизмов практической реализации защитной функции считают синтез и секрецию специфических антител к конкретному антигену (возбудителю), которые способны связывать чужеродные антигены бактерий и удалять их из организма. Эти закономерности практической реализации антиген-специфических механизмов иммунной защиты позволили разработать и использовать в клинической практике серологические методы исследования для диагностики инфекционных заболеваний. Серологические методы позволяют обнаружить в крови больных или антитела, специфичные для определенного возбудителя инфекционного заболевания, или антигены (в большинстве случаев белки) самих микроорганизмов. В любом случае в основе всех серологических реакций лежит взаимодействие антигена и антитела. Таким образом, серологические реакции используют в двух направлениях.

- Обнаружение с диагностической целью антител, специфичных к определенному возбудителю инфекционного заболева-

ния в сыворотке крови обследуемого. В этом случае из двух компонентов реакции (антитело—антиген) неизвестным служит сыворотка (антитела) крови, так как постановку реакции проводят с заведомо известными антигенами, то есть к сыворотке крови больного добавляют антиген определенного микроорганизма. Положительный результат реакции свидетельствует о наличии в крови антител, специфичных к применяемому антигену; отрицательный результат указывает на отсутствие таковых. Диагностическое значение имеет или высокий уровень (титр) антител уже в первом исследовании, или нарастание уровня (титра) антител в 4 раза и более при исследовании «парных» сывороток крови больного, взятой в начале заболевания (3—7-й день) и через 10—12 дней.

В качестве антигенов при диагностике бактериальных инфекций применяют взвеси живых или убитых микроорганизмов, их экстракты или отдельные фракции экстрактов.

При диагностике вирусных инфекций в качестве антигенов используют аллантоисную, амниотическую жидкость, суспензии аллантоисных оболочек и желточных мешков куриных эмбрионов, жидкую фракцию и экстракт клеток тканевых культур или гомогенаты органов животных, зараженных определенными вирусами.

С внедрением в практику лабораторий метода ИФА стало возможным определять в крови больных антитела, относящиеся к различным классам иммуноглобулинов (М и G), что существенным образом повысило информативность серологических методов диагностики. При первичном иммунном ответе, когда иммунная система человека взаимодействует с инфекционным агентом в первый раз, синтезируются преимущественно антитела, относящиеся к иммуноглобулинам класса М. Лишь позднее, на 8—12-й день после попадания антигена в организм в крови начинают накапливаться антитела иммуноглобулинов класса G. При повторном контакте с антигеном уже с первых часов развития иммунного ответа количество сывороточных антител IgG против данного возбудителя инфекционного заболевания превышает количество антител класса IgM. Именно поэтому количественное определение в крови пациента антител класса IgG и IgM к соответствующему антигену позволяет не только судить о наличии заболевания, но и оценить первичное это инфицирование или вторичное. При иммунном ответе на инфекционные агенты вырабатываются также и антитела класса А (IgA), которые играют важную роль в защите от инфекционных агентов кожи и слизистых оболочек.

В последние годы прогресс в области серологических исследований связан с разработкой тест-систем для определения авидности спе-

цифических антител к возбудителям различных инфекционных заболеваний.

**Авидность** — характеристика прочности связи специфических антител с соответствующими антигенами. В ходе иммунного ответа организма на проникновение инфекционного агента стимулированный клон лимфоцитов начинает вырабатывать сначала специфические IgM-антитела, а несколько позже — и специфические IgG-антитела, которые обладают поначалу низкой авидностью, то есть достаточно слабо связывают антиген. Затем развитие иммунного процесса постепенно (это могут быть недели или месяцы) идет в сторону синтеза лимфоцитами высокоспецифичных (высокоавидных) IgG-антител, более прочно связывающихся с соответствующими антигенами. На основании этих закономерностей иммунного ответа организма в настоящее время разработаны тест-системы для определения авидности специфических IgG-антител при различных инфекционных заболеваниях. Высокая авидность специфических IgG-антител позволяет исключить недавнее первичное инфицирование и тем самым с помощью серологических методов установить период инфицирования пациента. В клинической практике наиболее широкое распространение нашло определение авидности антител класса IgG при токсоплазмозе и цитомегаловирусной инфекции, что дает дополнительную информацию, полезную в диагностическом и прогностическом плане при подозрении на эти инфекции, в особенности при беременности или ее планировании.

- Определение с диагностической целью родовой и видовой принадлежности микроорганизма или вируса, которые могут присутствовать в сыворотке крови больного. В этом случае неизвестным компонентом реакции служит антиген (микроорганизм или вирус), к которому добавляют иммунную сыворотку с антителами к заведомо известному возбудителю инфекционного заболевания.

Серологические исследования, выполняемые для обнаружения специфических антител и антигена возбудителя при инфекционных заболеваниях, — более доступные методы лабораторной диагностики, чем бактериологическое выявление возбудителя. В ряде случаев серологические исследования служат единственным методом диагностики инфекционных заболеваний.

Вместе с тем для диагностики инфекционных заболеваний почти всегда используют комплекс лабораторных методов. Чтобы практический врач лучше понимал место и значения каждого из методов, приводим основные подходы к диагностике инфекционных заболеваний, которые представлены на рис. 16.1.

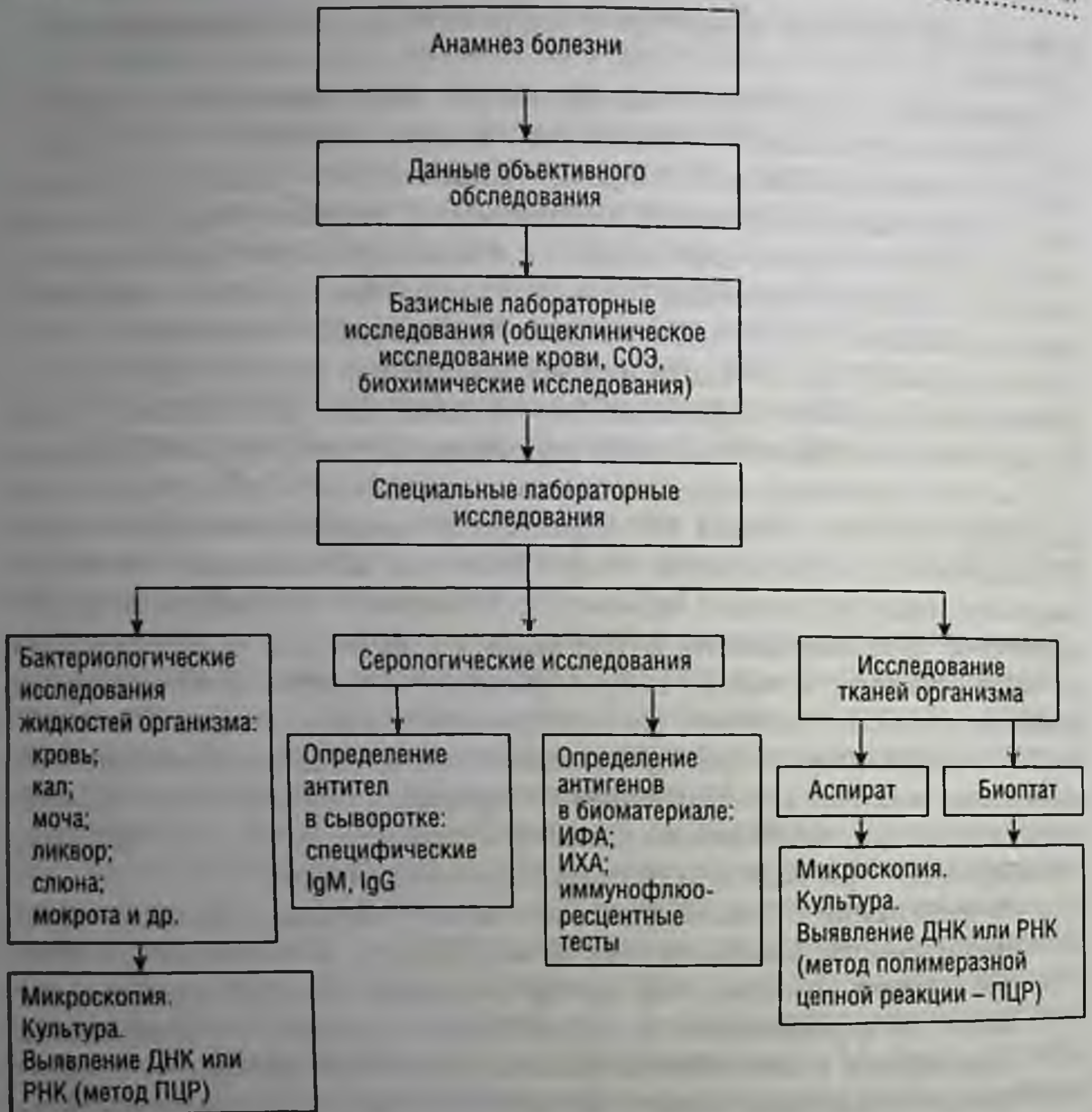


Рис. 16.1. Основные подходы к лабораторной диагностике инфекционных заболеваний

Наиболее часто серологические методы исследования применяют в клинической практике для диагностики сифилиса, вирусных гепатитов и ВИЧ-инфекции.

Серологические исследования не обладают 100% чувствительностью и специфичностью в отношении диагностики инфекционных заболеваний, могут давать перекрестные реакции с антителами, направленными к антигенам других возбудителей. В связи с этим оценивать результаты серологических исследований необходимо с большой осторожностью и учетом клинической картины заболевания. Именно этим обусловле-

но использование для диагностики одной инфекции множества тестов, а также применение дополнительных методов для подтверждения результатов скрининговых исследований.

## 16.1. СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

Условно серологические методы, используемые для диагностики инфекционных заболеваний, можно разделить на четыре большие группы.

К группе 1 относят прямые (непосредственные) методы определения реакции антиген–антитело. Образующийся при этом комплекс антиген–антитело идентифицируют визуально либо с помощью простых оптических устройств. К таким методам относят реакцию преципитации в растворе, геле, на полимерной пленке, агглютинацию бактериальных клеток, простейших, прямую реакцию агглютинации эритроцитов антителами, вирусами.

К группе 2 относят реакции пассивной агглютинации, то есть агглютинации частиц, с поверхностью которых связаны антигены или антитела. К этим методам относят реакции непрямой геммагглютинации (РНГА), связывания комплемента, латекс-агглютинации, коагглютинации, агглютинации частиц бентонита, желатиновых капсул, частиц сефарозы и др.

К группе 3 относят индикаторные методы, основанные на использовании различного рода меток для обнаружения реакции антиген–антитело. Наиболее широкое распространение получили ИФА, иммунофлуоресцентный и радиоиммунологический анализ.

К группе 4 относят молекулярно-генетические методы, которые включают метод ПЦР и гибридизации (генного зондирования).

Возможности использования различных лабораторных методов для диагностики инфекционных заболеваний приведены в табл. 16.1.

В клинической практике для серологической диагностики инфекционных заболеваний используют комплекс методов, сущность которых должен понимать каждый специалист лаборатории.

Реакцию агглютинации широко применяют в лабораторной практике для серологической диагностики бактериальных инфекций. Агглютинация представляет собой склеивание клеток или отдельных частичек — носителей антигена с помощью иммунной сыворотки к этому антигену. Она протекает в две фазы: первая — соединение антигена с антителом; вторая — выпадение образовавшегося комплекса антиген+антитело (агглютината) в растворе солей. Наиболее часто

реакцию агглютинации применяют для диагностики брюшного тифа и паратифов (реакция Видаля) и бруцеллеза (реакция Райта).

Таблица 16.1. Возможности использования различных лабораторных методов для диагностики инфекционных заболеваний

Метод	Определяемый компонент	Инфекционная патология (возбудитель)
Прямая агглютинация	Антигены, антитела	Кишечные инфекции ( <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Proteus</i> , <i>Brucella</i> ), респираторные инфекции ( <i>B. pertussis</i> , <i>Legionella</i> , <i>N. meningitidis</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> ), <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Toxoplasma gondii</i>
Реакция торможения прямой гемагглютинации	Антитела	Вирусы ЕСНО-коксаки, гриппа, парагриппа, паротита, кори, реовирусы
Нейтрализация	Антитела	<i>M. pneumoniae</i> , вирусы ЕСНО-коксаки, аденовирусы, гриппа, парагриппа, полиомиелита, реовирусы
Преципитация	Антигены, антитела	Гистоплазмоз, кокцидиоидомикоз, бластомикоз, аспергиллез, кандидоз, сифилис
Латекс-агглютинация	Антигены, антитела	Менингит ( <i>N. meningitidis</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>H. influenzae</i> ), <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Cl. perfringens</i> , эхинококкоз, мононуклеоз, краснуха, криптококкоз, цитомегаловирус
Реакция пассивной гемагглютинации (РПГА)	Антитела	<i>Yersinia</i> , <i>Staphylococcus</i> , мононуклеоз, краснуха, трипаносомоз, шистомоз, лейшманиоз, эхинококкоз, амёбная дизентерия
Реакция связывания комплемента	Антитела	Большинство патогенных вирусов, бактерий, <i>Chlamydia</i> , <i>M. pneumoniae</i> , риккетсии, <i>P. capsulatum</i> , <i>B. dermatitidis</i> , <i>C. immitis</i> , <i>Aspergillus</i>
Иммунофлуоресценция	Антигены, антитела	Аденовирусы, вирусы ЕСНО-Коксаки, цитомегаловирус, вирус простого герпеса, гриппа, краснухи, гепатита В, <i>M. pneumoniae</i> , большинство патогенных бактерий, <i>E. histolytica</i>
ИФА	Антигены, антитела	Большинство патогенных бактерий, вирусов, грибы, простейшие
Генные зонды	Нуклеиновые кислоты	<i>M. pneumoniae</i> , <i>L. pneumoniae</i> , аденовирусы, вирусы ЕСНО-Коксаки, гепатита А и В, вирус простого герпеса, ВИЧ-1, ВИЧ-2, папилломавирус

**Реакция гемагглютинации** бывает прямой и непрямой. В основе реакции прямой гемагглютинации лежит способность эритроцитов склеиваться при адсорбции на них определенных антигенов. Результат реакции регистрируют визуально (есть агглютинация эритроцитов или нет). Поскольку это происходит без участия антител, реакция не является серологической. Ее используют в лаборатории для выбора рабочего разведения антигена, используемого в реакции торможения гемагглютинации.

**Реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации (РНГА или РПГА)** наступает в том случае, когда к эритроцитам, сенсibilизированным антигеном, то есть несущим на себе адсорбированный антиген, добавляют сыворотку больного, содержащую антитела, соответствующие антигену. В ней используют эритроциты или нейтральные синтетические материалы (например, частицы латекса), на поверхности которых сорбированы антигены (бактериальные, вирусные, тканевые) или антитела. Их агглютинация происходит при добавлении соответствующих сывороток или антигенов. Эритроциты, сенсibilизированные антигенами, называют антигенным эритроцитарным диагностикумом и используют для выявления и титрования антител. Эритроциты, сенсibilизированные антителами называют иммуноглобулиновыми эритроцитарными диагностикумами и применяют для выявления антигенов. Эта реакция часто превосходит по своей чувствительности и специфичности другие серологические методы. РПГА используют для диагностики заболеваний, вызванных бактериями (брюшной тиф и паратифы, дизентерия, бруцеллез, чума, холера и др.), простейшими (малярия) и вирусами (грипп, аденовирусные инфекции, вирусный гепатит В, корь, клещевой энцефалит, крымская геморрагическая лихорадка и др.).

**Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)** основана на феномене предотвращения (торможения) иммунной сыворотки гемагглютинации эритроцитов вирусами, используют для выявления и титрования противовирусных антител. Она служит основным методом серодиагностики гриппа, кори, краснухи, эпидемического паротита, клещевого энцефалита и других вирусных инфекций, возбудители которых обладают гемагглютинирующими свойствами. Если в сыворотке крови больного есть антитела к определяемому вирусу, то антиген нейтрализуется, и агглютинации эритроцитов не происходит (реакция положительная). При несоответствии антител антигену происходит агглютинация эритроцитов (реакция отрицательная).

**Реакцию преципитации** относят к простым и ускоренным методам серологической диагностики бактериальных инфекций. В ней уча-

ствуют сыворотка больного и известный антиген. Постановку реакции преципитации осуществляют путем наслоения на исследуемую сыворотку больного разведенного антигена. Преципитация происходит в результате взаимодействия антител с растворимыми антигенами. Простейшим примером реакции преципитации служит образование в пробирке непрозрачной полосы преципитации на границе наслоения антигена на антитело. Широко применяют различные разновидности реакции преципитации в полужидких гелях агара или агарозы (метод двойной иммунодиффузии по Оухтерлоню, радиальной иммунодиффузии, иммуноэлектрофорез), которые носят одновременно качественный и количественный характер. В результате свободной диффузии в геле антигенов и антител в зоне оптимального их соотношения образуются специфические комплексы — полосы преципитации, которые выявляют визуально или при окрашивании. Особенностью метода считают то, что каждая пара антиген—антитело формирует индивидуальную полосу преципитации, и реакция не зависит от наличия в исследуемой системе других антигенов и антител.

**Реакция нейтрализации** основана на способности антител нейтрализовать некоторые специфические функции макромолекулярных или растворимых антигенов, например, активность ферментов, токсины бактерий, болезнетворность вирусов. В бактериологии эту реакцию используют для обнаружения антистрептолизина, антистрептокиназы и антистафилолизина.

**Реакцию связывания комплемента (РСК)** применяют для обнаружения соответствующих антител у больного при бактериальных и вирусных инфекциях. Эти реакции основаны на способности субкомпонента комплемента  $C1q$  и затем других компонентов комплемента присоединяться к иммунным комплексам. РСК относят к достаточно сложным серологическим реакциям, в которых помимо антигена и антител участвует еще гемолитическая система, позволяющая выявить результат исследования. Именно поэтому РСК протекает в две фазы: первая — взаимодействие антигена и антитела с участием комплемента, вторая — выявление степени связывания комплемента, чего достигают добавлением гемолитической системы (эритроциты+гемолитическая сыворотка).

Если в исследуемой сыворотке содержатся антитела, гомологичные антигену, то образовавшийся комплекс антиген—антитело связывает комплемент; при добавлении гемолитической системы гемолиз эритроцитов в отсутствие комплемента не может произойти, эритроциты остаются неразрушенными (положительная реакция связывания комплемента). При отсутствии в сыворотке антител, соответствующих



антигену, соединения с антигеном не произойдет, комплемент останется свободным и может быть использован для гемолиза эритроцитов (отрицательная реакция связывания комплемента).

Реакции иммунофлуоресценции заключаются в использовании меченных флуорохромом антител, точнее, иммуноглобулиновой фракции антител IgG. Меченное флуорохромом антитело образует с антигеном комплекс антиген-антитело, который становится доступным наблюдению под микроскопом в УФ-лучах, возбуждающих свечение флуорохрома. Реакцию прямой иммунофлуоресценции используют для изучения клеточных антигенов, обнаружения вируса в зараженных клетках и бактерий и риккетсий — в мазках. Так, для диагностики бешенства отпечатки кусочков мозга животных, подозреваемых на вирусносительство, обрабатывают люминесцирующей антирабической сывороткой. При положительном результате в цитоплазме нервных клеток определяют глыбки ярко-зеленого цвета. На обнаружении антигенов вирусов в клетках отпечатков со слизистой оболочки носа основана экспресс-диагностика гриппа, парагриппа и аденовирусной инфекции.

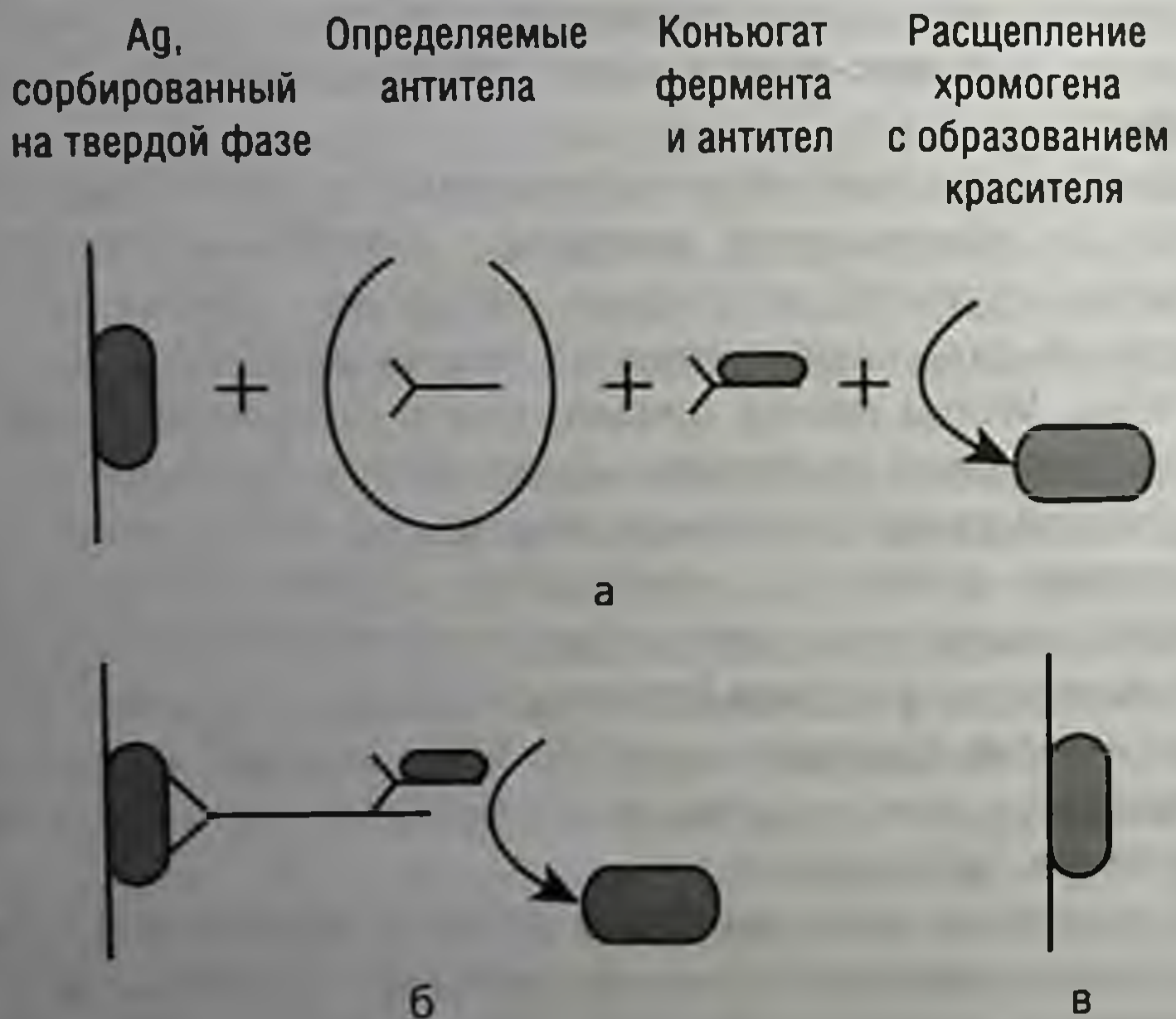
Более широко применяют метод непрямой иммунофлуоресценции, основанный на обнаружении комплекса антиген-антитело с помощью люминесцирующей иммунной сыворотки против IgG-антител и используемой для обнаружения не только антигенов, но и титрования антител. Метод нашел применение в серодиагностике герпеса и цитомегаловирусной инфекции. Препараты с наслоенной исследуемой сывороткой крови помещают в термостат при температуре 37 °С для образования иммунных комплексов, а затем после отмывания несвязавшихся реагентов отмечают эти комплексы меченой люминесцирующей сывороткой против иммуноглобулинов человека. Применяя меченые иммунные сыворотки против IgM- или IgG-антител, можно дифференцировать тип антител и обнаруживать ранний иммунный ответ по наличию IgM-антител.

ИФА в последние годы наиболее широко используют в практике лабораторий для серологической диагностики вирусных, бактериальных, грибковых и других инфекций. Он основан на двух принципиальных научных открытиях. Первое заключается в способности ферментов и антител, ковалентно или нековалентно связанных с твердой основой, сохранять свою функциональную активность, то есть расщеплять субстрат (ферменты) и связывать антигены/антитела. Второе базируется на создании комплекса антитело-фермент (Ab-F) в виде конъюгата, сохраняющего свою биологическую активность в растворе. Комплекс Ab-F-конъюгаты характеризуется высочайшей спе-

цифичностью и чувствительностью, достигающей 97–99%. Существует несколько модификаций ИФА:

- гетерогенный — ELISA (enzyme linked immunoadsorbent assay);
- твердофазный — EIA (enzyme immunoassay);
- гомогенный — EMIT (enzyme multiplied immunoassay technique) — используют в основном для выявления только гормонов, пептидов, лекарственных и наркотических веществ.

Далее рассмотрен принцип определения специфических антител методом твердофазного ИФА. На рис. 16.2 показана общая схема метода, состоящего из трех стадий, соединенных на рисунке знаком плюс. Во время каждой стадии в систему добавляется очередной компонент, инкубируется некоторое время, необходимое для образования иммунного комплекса. Затем ячейка промывается для удаления не связавшихся компонентов. После этого переходят к следующей стадии реакции, которая обозначена следующим знаком плюс на схеме.



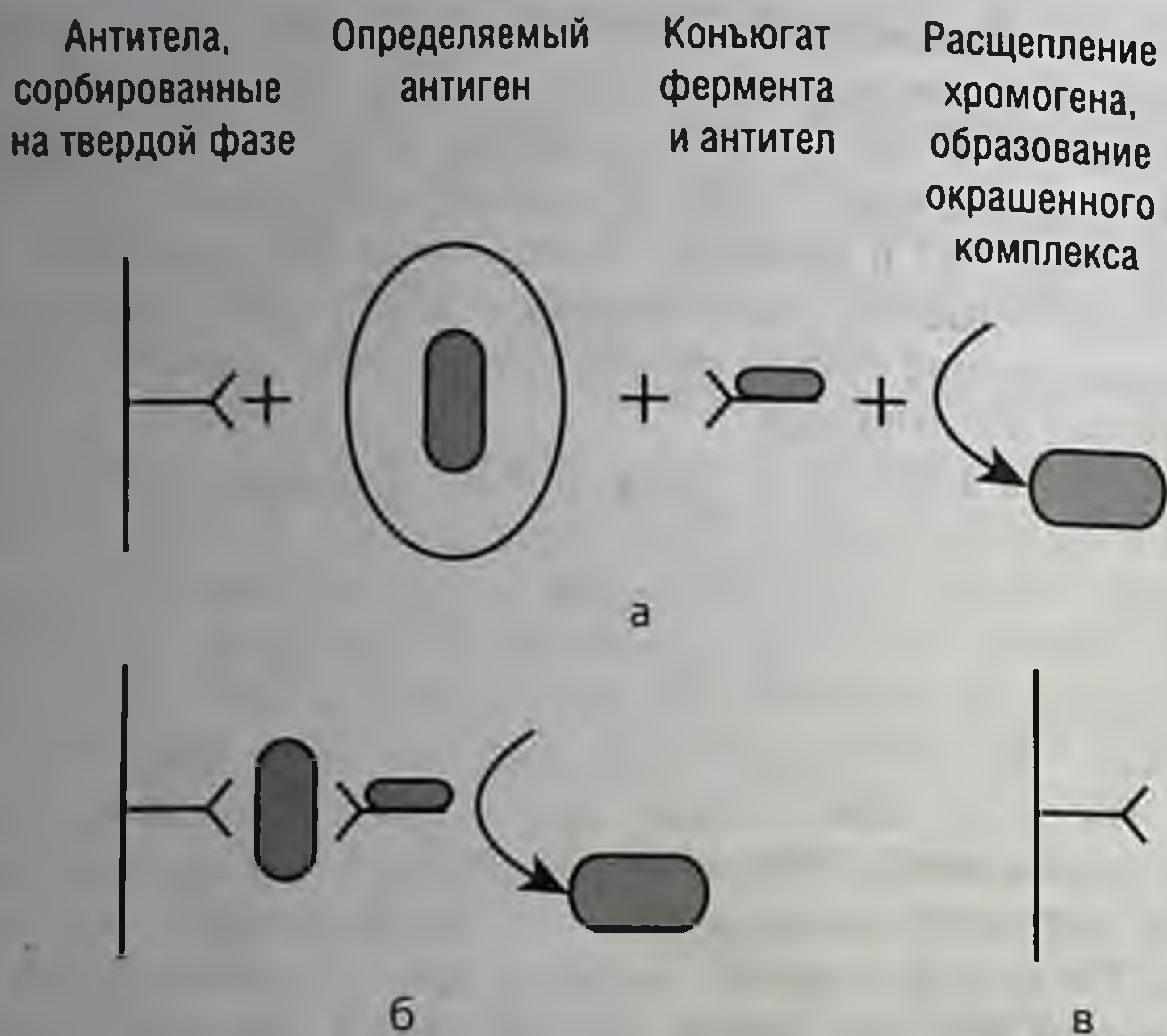
**Рис. 16.2.** Определение антител методом твердофазного иммуноферментного анализа (описание в тексте): а — процесс образования иммунного комплекса; б — определение иммунного комплекса (положительный результат); в — отсутствие иммунного комплекса (отрицательный результат)

Более детальный процесс образования иммунного комплекса (см. рис. 16.2, а). На твердой поверхности пластиковой лунки, изображенной на рисунке слева, сорбирован антиген (Ag) любого инфекци-

онного агента (фрагмент вируса, бактерии, простейшего и др.). В эту лунку вносят исследуемый биологический материал — сыворотку крови больного. Если в ней содержатся антитела к инфекционному агенту (на рисунке обведены), то они закрепляются на соответствующих антигенах (Ag) и остаются связанными при промывке. На этом стадия I заканчивается. Это основная — «специфическая» стадия процесса. Последующие стадии нужны лишь для выявления образовавшегося иммунного комплекса.

На II стадии анализа в лунку вносят антитела с заранее прикрепленным к ним ферментом, способные связаться с антителами сыворотки крови обследуемого пациента, которые закрепились на инфекционном агенте. Это так называемый конъюгат. Если в ячейке имеются образовавшиеся на I стадии процесса иммунные комплексы, то возникает «молекулярная цепочка», на конце которой находится фермент. На следующей стадии в лунку добавляют раствор бесцветного вещества (хромогена). Это вещество приобретает окраску после расщепления его присутствующим в ячейке ферментом. Методы ИФА основаны на использовании антител, конъюгированных с ферментами, главным образом пероксидазой хрена (дает желто-коричневую окраску раствора) или щелочной фосфатазой (дает желто-зеленую окраску раствора). Если все антитела сыворотки крови больного взаимодействуют с заведомо известным антигеном, в лунке образуется окрашенный комплекс (см. рис. 16.2, б). Если на I стадии анализа иммунных комплексов не образовалось (см. рис. 16.2, в), то отсутствует и вся последующая часть реакции, вследствие чего хромоген не окрашивает раствор.

Для обнаружения самих инфекционных агентов, а точнее, их антигенов (Ag), применяют другую модификацию метода твердофазного ИФА, которая представлена на рис. 16.3. В этом случае на поверхности планшета (твердой фазе) сорбируются заведомо известные специфические антитела. К ним добавляют сыворотку крови или другой биологический материал, содержащий неизвестный антиген (см. рис. 16.3, а). В случае соответствия антител антигену образуется комплекс антитело—антиген, к которому, как и в предыдущем случае, добавляется комплекс антитело—фермент. Если в исследуемой сыворотке присутствует искомый антиген, то образуется иммунный комплекс. В ячейке присутствует фермент, который способен расщеплять хромоген с образованием окрашенного продукта (см. рис. 16.3, б) — реакция положительная. Если в исследуемом образце искомый антиген отсутствует, то окрашивания не происходит (см. рис. 16.3, в) — реакция отрицательная.



**Рис. 16.3.** Определение антигенов методом твердофазного иммуноферментного анализа: а — последовательность анализа; б — определение иммунного комплекса (положительный результат); в — отсутствие иммунного комплекса (отрицательный результат)

Используют также ферменты, разлагающие не только хромогенный, но и люмогенный субстрат. В этом случае при положительной реакции возникает свечение.

**Молекулярно-генетические методы** все более широко используются в клинической практике для диагностики инфекционных заболеваний. Метод ПЦР будет рассмотрен более детально в специальном разделе этой главы. Метод гибридизации (метод генного зондирования) во многом служит конкурентом метода ПЦР, поэтому требует понимания его основ.

В основе метода генного зондирования лежит способность нуклеиновых кислот к гибридизации — образованию двухцепочных структур за счет взаимодействия комплементарных нуклеотидов (А-Т, Г-Ц). Для определения искомой последовательности ДНК (или РНК) специально создают так называемый зонд полинуклеотид с определенной последовательностью оснований. В его состав вводят специальную метку, позволяющую идентифицировать образование комплекса. Схема реакции представлена на рис. 16.4.

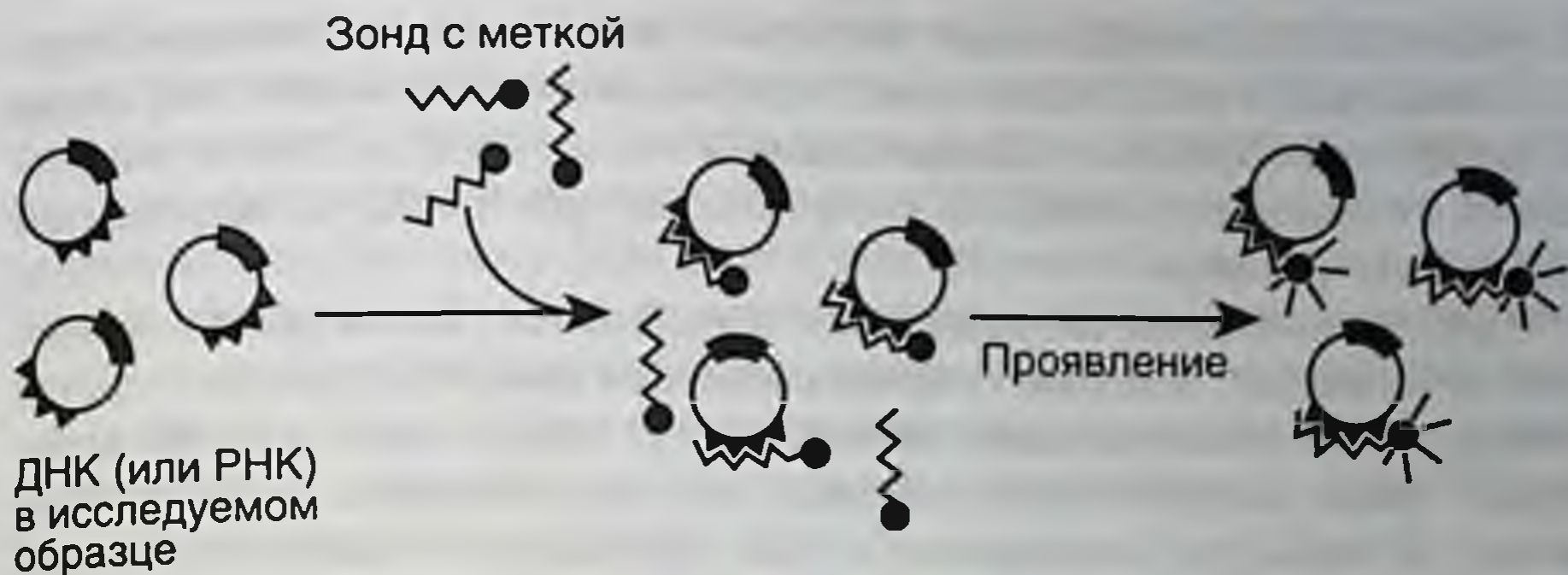


Рис. 16.4. Реакция генного зондирования для обнаружения в образцах дезоксирибонуклеиновой или рибонуклеиновой кислоты микроорганизмов специфическим меченым зондом

Для проведения анализа ДНК пробу подвергают денатурации с целью получения одноцепочных структур, с которыми и реагируют молекулы ДНК- или РНК-зонда. Для приготовления зондов используют либо различные участки ДНК (или РНК), выделенные из естественного источника (например, того или иного микроорганизма), как правило представленные в виде генетических последовательностей в составе векторных плазмид, либо химически синтезированные олигонуклеотиды. В некоторых случаях в качестве зонда применяют препараты геномной ДНК, гидролизованной на фрагменты, иногда — препараты РНК, особенно часто — рибосомальную РНК.

В качестве метки используют различные индикаторы: радиоактивные изотопы, флуоресцеины, биотин (с дальнейшим проявлением комплексом авидин—фермент) и т.п.

Проведение анализа можно разделить на следующие стадии: подготовка образцов (в том числе экстракция и денатурация ДНК), фиксация пробы на носителе (чаще всего — полимерный мембранный фильтр), предгибридизация, собственно гибридизация, отмывание несвязавшихся продуктов, детекция.

Для исследования используют пробы сыворотки крови, мочи, уретральных соскобов, форменных элементов или цельной крови на присутствие инфекционного агента. Для освобождения нуклеиновых кислот из состава клеточных структур проводят лизис клеток, а в некоторых случаях очищают препарат ДНК с помощью фенола. Денатурация ДНК, то есть переход ее в одноцепочную форму, происходит при обработке щелочью. Затем образец нуклеиновых кислот фиксируют на носителе (нитроцеллюлезной или нейлоновой мембране) обычно путем инкубации в течение от 10 мин до 4 ч при 80 °С в вакууме. Далее

в процессе предгибридизации достигают инактивации свободных мест связывания для уменьшения неспецифического взаимодействия зонда с мембраной. Процесс гибридизации занимает от 2 до 20 ч, в зависимости от концентрации ДНК в образце, концентрации используемого зонда и его размера.

После окончания гибридизации и отмывания несвязавшихся продуктов проводят детекцию образовавшегося комплекса. Если в состав зонда входит радиоактивная метка, то для проявления реакции мембрану экспонируют с фотопленкой (ауторадиография). Для других меток используют соответствующие процедуры. Например, метод определения модифицированных участков ДНК с помощью антител или введенных в состав зонда низкомолекулярных компонентов (биотин, дигоксин и др.) с последующим проявлением конъюгатом авидин—фермент, антитело—фермент, как в методе ИФА.

## 16.2. ДИАГНОСТИКА СИФИЛИСА

Сифилис — передающееся половым путем заболевание, которое вызывает бледная спирохета (*Treponema pallidum*). Заболевание начинается с появления безболезненной язвы в месте внедрения возбудителя (твердого шанкра) и регионарного лимфаденита. Через некоторое время инфекция становится генерализованной: развивается вторичный, а затем третичный сифилис.

### Классификация сифилиса

- Первичный — развивается спустя 10–90 сут (в среднем 21 сут) после заражения.
- Вторичный — развивается спустя 2–6 мес после заражения или 2–10 нед после появления твердого шанкра.
- Латентный (скрытый) — стадия болезни, при которой серологические реакции положительны, а какие-либо признаки поражения кожи, слизистых оболочек и внутренних органов отсутствуют:
  - ▶ ранний — менее 2 лет с начала заболевания;
  - ▶ поздний — более 2 лет с начала заболевания;
  - ▶ неуточненный.
- Третичный — развивается через 3–7 лет после начала заболевания (от 2 до 60 лет), гуммы появляются через 15 лет.
- Врожденный.

Для диагностики сифилиса наиболее широко используют серологические методы, позволяющие обнаруживать иммунные сдвиги (появление противосифилитических антител) в организме больного в ответ

на размножение в нем возбудителя болезни. Сифилитические антитела могут быть неспецифическими (реагины) и специфическими (противотрепонемными). Реагины направлены против липидных антигенов бледной трепонемы и аутоантигенов, возникающих вследствие разрушения клеток больного. При различных физиологических и патологических состояниях уровень реагинов может повышаться, поэтому они могут стать причиной ложноположительных серологических реакций на сифилис. Специфические антитрепонемные антитела направлены против бледной трепонемы и поэтому позволяют более надежно подтвердить факт заражения.

Возникновение противосифилитических антител при заболевании происходит в соответствии с общими закономерностями иммунного ответа: вначале вырабатываются антитела класса IgM, по мере развития болезни начинает преобладать синтез антител класса IgG. Антитела IgM появляются на 2–4-й неделе после заражения и исчезают у нелеченых больных примерно через 18 мес, при лечении раннего сифилиса — через 3–6 мес, позднего — через 1 год. Антитела IgG появляются обычно на 4-й неделе после заражения и достигают более высоких титров, чем IgM. Они могут длительно сохраняться даже после клинического излечения больного.

Серологические реакции, в зависимости от выявляемых ими антител, подразделяют на 2 группы.

- Реакция микропреципитации (РМП) с плазмой крови или инaktivированной сывороткой крови — экспресс-метод диагностики сифилиса, который позволяет обнаружить реагиновые (неспецифические) антитела.
- Видоспецифические трепонемные реакции (выявляют специфические трепонемные антитела в сыворотке крови):
  - ▶ РПГА бледных трепонем;
  - ▶ метод ИФА, который позволяет выявлять антитела класса IgM и IgG;
  - ▶ реакция иммобилизации бледных трепонем;
  - ▶ реакция иммунофлуоресценции (РИФ).

Многообразие серологических реакций для диагностики сифилиса приводит к ненужным затруднениям. В целях упорядочения применения серологических реакций для диагностики сифилиса были разработаны методические указания «Постановка отборочных и диагностических тестов на сифилис» (приложение 1, утверждено приказом Минздрава России от 26.03.2001 № 87). В связи с тем что использование тестов для диагностики сифилиса строго регламентировано, ниже приведены основные положения данных рекомендаций.

Для серо- и ликвородиагностики сифилиса в России можно использовать следующие методы.

- РМП с кардиолипидным антигеном, которая служит отборочным тестом при обследовании населения на сифилис. Постановку РМП осуществляют с плазмой или инактивированной сывороткой крови пациента. Зарубежные тесты ВДРЛ (VDRL), РПР (RPR) и другие аналогичны РМП как по принципу постановки реакции, так и по чувствительности и специфичности.
- ИФА с антигеном из культуральных или патогенных бледных трепонем.
- РПГА с антигеном из культуральных или патогенных бледных трепонем.
- Реакция иммунофлуоресценции с антигеном патогенной бледной трепонемы штамма Никольса.
- Реакция иммобилизации бледных трепонем, в которой в качестве антигена используют патогенные бледные трепонемы штамма Никольса.

Реакция иммобилизации бледных трепонем, иммунофлуоресценции, ИФА и РПГА служат высокочувствительными и высокоспецифичными реакциями на сифилис. Их относят к диагностическим подтверждающим тестам. При этом в связи с простотой постановки и наличием коммерческих тест-систем ИФА и РПГА могут быть и высокоэффективными отборочными тестами.

Ввиду различной чувствительности при разных формах сифилиса, специфичности и сложности постановки каждая из указанных реакций имеет свое предназначение.

Профилактическое обследование населения на сифилис можно проводить с помощью РМП, ИФА и РПГА.

При получении положительного результата в РМП пациент должен обследоваться дерматовенерологом с повторным исследованием крови в любом диагностическом тесте на сифилис.

При профилактическом обследовании на сифилис больных офтальмологических, психоневрологических, кардиологических стационаров, беременных, в частности, направляемых на искусственное прерывание беременности, должны использовать ИФА или РПГА.

При обследовании доноров необходимо применять ИФА или РПГА, но обязательно в сочетании с РМП. Постановка двух реакций одновременно обусловлена высокой ответственностью данного исследования.

РМП в количественном варианте с экономической точки зрения необходимо использовать в качестве контроля эффективности лечения.



Вышеуказанные специфические тесты служат для диагностики всех форм сифилиса, в частности, скрытого, а также для распознавания ложноположительных результатов, полученных в РМП. При диагностике скрытого сифилиса целесообразна постановка двух специфических тестов одновременно.

Таким образом, последовательность обследования пациентов на сифилис следующая.

- При первичном обследовании производят постановку отборочной (скрининговой) РМП или ее модификации (RPR — РПР, TRUST — ТРАСТ, VDRL — ВДРЛ) в количественном и качественном варианте и в случае положительного результата — любого специфического подтверждающего трепонемного теста (РПГА, ИФА, реакции иммунофлуоресценции, иммобилизации бледных трепонем).
- После окончания лечения ставят РМП или ее модификацию и по снижению титра судят о динамике инфекционного процесса и эффективности терапии. Подтверждением эффективности проведенного лечения считают снижение титра в 4 раза и более в течение 1 года.
- По окончании этого срока осуществляют постановку той же специфической реакции, что и при первичном обследовании. Следует учитывать, что специфические трепонемные тесты могут оставаться положительными (не негативировать) в течение ряда лет, а в отдельных случаях остаются положительными на всю жизнь.

Характеристики трепонемальных и нетрепонемальных методов диагностики сифилиса приведены в табл. 16.2.

Таблица 16.2. Характеристики трепонемальных и нетрепонемальных методов диагностики сифилиса

Нетрепонемальные тесты	Трепонемальные тесты
Антигеном в этих тестах служат кардиолипин, холестерин и лецитин	Антигеном в этих тестах служит <i>T. pallidum</i>
Положительны у 80–86% пациентов с первичным сифилисом	Положительны у 90–95% пациентов с первичным сифилисом
Положительны почти у всех пациентов со вторичным и ранним латентным сифилисом	Положительны почти у всех пациентов со вторичным и ранним латентным сифилисом
Положительны у 70–75% пациентов с поздним латентным сифилисом	Положительны у 94–96% пациентов с поздним латентным сифилисом
Могут быть использованы для оценки эффективности антибиотикотерапии и диагностики реинфекции	Не могут быть использованы для оценки эффективности антибиотикотерапии и диагностики реинфекции (обычно тесты положительны всю жизнь)

### 16.3. ДИАГНОСТИКА ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

ВИЧ-инфекция — заболевание, вызываемое вирусом иммунодефицита человека, длительное время персистирующего в лимфоцитах, макрофагах, клетках нервной ткани, в результате чего развивается медленно прогрессирующее поражение иммунной и нервной системы организма, характеризуется вторичными инфекциями, опухолями, подострым энцефалитом и другими патологическими изменениями.

Возбудители — ВИЧ 1-го и 2-го типа (ВИЧ-1, ВИЧ-2 — HIV-1, HIV-2, Human Immunodeficiency Virus, types I, II) — относят к семейству ретровирусов, подсемейству медленных вирусов. Вирионы являются сферическими частицами диаметром 100–140 нм. Вирусная частица имеет наружную фосфолипидную оболочку, включающую гликопротеины (структурные белки) с определенной молекулярной массой, измеряемой в килодальтонах. У ВИЧ-1 — это gp 160, gp 120, gp 41. Внутренняя оболочка вируса, покрывающая ядро, также представлена белками с известной молекулярной массой — p17, p24, p55 (ВИЧ-2 содержит gp 140, gp 105, gp 36, p16, p25, p55).

В организме человека основной мишенью ВИЧ служат Т-лимфоциты, несущие на поверхности наибольшее количество CD4-рецепторов. После проникновения ВИЧ в клетку он синтезирует ДНК, которая встраивается в генетический аппарат клетки-хозяина (CD4-лимфоциты) и остается там пожизненно в состоянии провируса. Помимо Т-лимфоцитов-хелперов, поражаются макрофаги, В-лимфоциты, клетки нейроглии, слизистой оболочки кишечника и др. В результате нарушения функции иммунной системы, особенно при снижении числа Т-лимфоцитов (CD4) до 400 клеток/мкл крови и менее, возникают условия для неконтролируемой репликации (размножения) ВИЧ со значительным увеличением количества вирионов в различных средах организма. В результате поражения многих звеньев иммунной системы человек, зараженный ВИЧ, становится беззащитным перед возбудителями различных инфекций. На фоне нарастающей иммунодепрессии развиваются тяжелые прогрессирующие болезни, которые не встречаются у человека с нормально функционирующей иммунной системой. Эти болезни ВОЗ определила как СПИД-маркерные (индикаторные). Их подразделяют на две группы. Первая группа — заболевания, которые присущи только тяжелому иммунодефициту (уровень CD4 ниже 200 клеток/мкл крови). Клинический диагноз ставят при отсутствии анти-ВИЧ-антител или ВИЧ-антигенов. Вторая группа — заболевания, которые могут развиваться как на фоне тяжелого иммунодефицита, так

и в ряде случаев без него. Именно поэтому в этих случаях необходимо лабораторное подтверждение диагноза.

### СПИД-индикаторные болезни

- Первая группа.
  - ◊ Кандидоз пищевода, трахеи, бронхов.
  - ◊ Внелегочный криптококкоз.
  - ◊ Криптоспоридиоз с диареей более 1 мес.
  - ◊ Цитомегаловирусные поражения различных органов, помимо печени, селезенки или лимфатических узлов у больного старше 1 мес.
  - ◊ Инфекция, обусловленная вирусом простого герпеса, проявляющаяся язвами на коже и слизистых оболочках, которые персистируют (сохраняются) более 1 мес, а также бронхитом, пневмонией или эзофагитом любой продолжительности, поражающим больного в возрасте старше 1 мес.
  - ◊ Генерализованная саркома Капоши у больных в возрасте моложе 60 лет.
  - ◊ Лимфома головного мозга (первичная) у больных в возрасте моложе 60 лет.
  - ◊ Лимфоцитарная интерстициальная пневмония и/или легочная лимфоидная дисплазия у детей в возрасте до 12 лет.
  - ◊ Диссеминированная инфекция, вызванная атипичными микобактериями (микобактерии комплекса *M. avium-intracellulare*) с локализацией внелегочной или (дополнительно к легким) в коже, лимфатических узлах шейных и корней легких.
  - ◊ Пневмоцистная пневмония.
  - ◊ Прогрессирующая многоочаговая лейкоэнцефалопатия.
  - ◊ Токсоплазмоз головного мозга у больного в возрасте старше 1 мес.
- Вторая группа.
  - ◊ Бактериальные инфекции, сочетанные или рецидивирующие у детей в возрасте до 13 лет (более 2 случаев за 2 года наблюдения): сепсис, пневмония, менингит, поражение костей или суставов, абсцессы, обусловленные гемофильными палочками, стрептококками.
  - ◊ Кокцидиоидомикоз диссеминированный (внелегочная локализация).
  - ◊ ВИЧ-энцефалопатия (ВИЧ-деменция, СПИД-деменция).
  - ◊ Гистоплазмоз с диареей, персистирующей более 1 мес.
  - ◊ Изоспороз с диареей, персистирующей более 1 мес.
  - ◊ Саркома Капоши в любом возрасте.

- ◊ Лимфома головного мозга (первичная) у лиц любого возраста.
- ◊ Другие В-клеточные лимфомы (за исключением болезни Ходжкина) или лимфомы неизвестного иммунофенотипа:
  - мелкоклеточные лимфомы (типа лимфомы Беркитта и др.);
  - иммунобластные саркомы (лимфомы иммунобластные, крупноклеточные, диффузные гистиоцитарные, диффузные недифференцированные).
- ◊ Микобактериоз диссеминированный (не туберкулез) с поражением, помимо легких, кожи, шейных или прикорневых лимфатических узлов.
- ◊ Туберкулез внелегочной (с поражением внутренних органов, помимо легких).
- ◊ Сальмонеллезная септицемия, рецидивирующая.
- ◊ ВИЧ-дистрофия (истощение, резкое похудание).

Определение антител к ВИЧ служит основным методом лабораторной диагностики ВИЧ-инфекции. В основе метода лежит ИФА (чувствительность более 99,5%, специфичность более 99,8%). Антитела к ВИЧ возникают у 90–95% инфицированных в течение 3 мес после заражения, у 5–9% — через 6 мес и 0,5–1% — в более поздние сроки. В стадии СПИДа количество антител может снижаться, вплоть до полного исчезновения. При получении положительного ответа (обнаружении антител к ВИЧ) во избежание ложноположительных результатов анализ должен быть повторен еще 1–2 раза, желательно с использованием диагностикума другой серии. Положительным результатом считают, если из двух — оба или из трех — два анализа отчетливо выявили антитела.

Метод ИФА по определению антител к ВИЧ считают скрининговым. При получении положительного результата для подтверждения его специфичности используют метод иммуноблотинга вестерн-блоттинг (Western-blot) — встречная преципитация в геле антител в сыворотке крови больного с различными вирусными белками, подвергнутыми разделению по молекулярной массе с помощью электрофореза и нанесенными на нитроцеллюлозу. Определяют антитела к вирусным белкам гр 41, гр 120, гр 160, р 24, р 18, р 17 и др. Обнаружение антител к одному из гликопротеинов — гр 41, гр 120, гр 160 следует считать положительным результатом. В случае обнаружения антител к другим белкам вируса результат считают сомнительным, и такого человека следует обследовать еще дважды: через 3 и 6 мес. Отсутствие антител к специфическим белкам ВИЧ означает, что иммуноферментный метод дал ложноположительный результат.

Алгоритм диагностики ВИЧ-инфекции приведен на рис. 16.5.

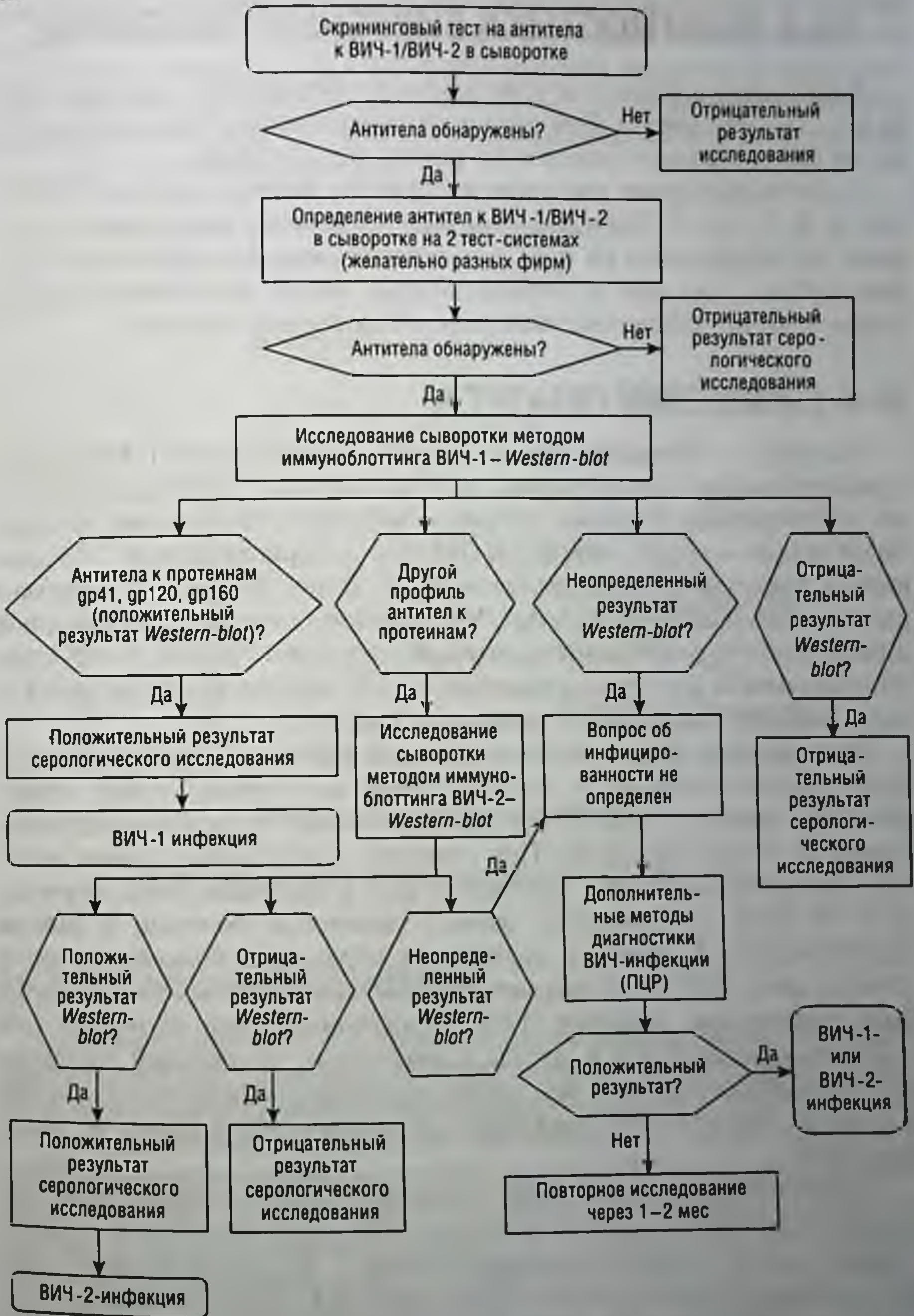


Рис. 16.5. Алгоритм диагностики ВИЧ-инфекции

## 16.4. ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТОВ

Вирусные гепатиты — инфекционные заболевания, характеризуются поражением печени. Они имеют сходную клиническую симптоматику, но различаются по этиологии, патогенезу и исходам.

В настоящее время выделяют следующие формы вирусных гепатитов: А, В, С, D и E. По механизму инфицирования вирусные гепатиты делят на энтеральные (А и E) и парентеральные (все остальные). Для диагностики каждой из перечисленных форм вирусных гепатитов используют определенный перечень лабораторных маркеров.

### 16.4.1. ВИРУСНЫЙ ГЕПАТИТ А

Гепатит А (Hepatitis A) — острая энтеровирусная инфекция, характеризуется симптомами интоксикации, быстропроходящими нарушениями функции печени и доброкачественностью течения. Возбудитель — вирус гепатита А (HAV) — энтеровирус типа 72. Геном вируса представлен однонитчатой РНК. Вирус гепатита А содержит единственный антиген (HA-Ag). Удельный вес гепатита А в суммарной заболеваемости вирусными гепатитами составляет 70–80%. В структуре заболеваемости им дети составляют до 80%, причем основная масса — дошкольники и школьники начальных классов.

Достоверного подтверждения диагноза гепатита А достигают серологическими методами — обнаружением нарастания уровня специфических антител (анти-HAV), принадлежащих к иммуноглобулинам класса М (анти-HAV-IgM). При гепатите А нарастание уровня антител, относящихся к IgM, начинается еще в инкубационном периоде, за 5–10 дней до появления первых симптомов болезни, и быстро прогрессирует. К моменту первичного обращения больного к врачу уровень анти-HAV-IgM успевает достичь высоких показателей, чтобы быть выявленным методом ИФА. Общепринято, что анти-HAV-IgM у больных появляются в начале клинических проявлений заболевания и сохраняются до 6 мес после перенесенной инфекции. Спустя год после перенесенной инфекции анти-HAV-IgM в крови не обнаруживают.

Определение анти-HAV-IgM — основной тест специфической диагностики гепатита А. Нарастание анти-HAV-IgG происходит в более поздние сроки — в фазу реконвалесценции — и поэтому не может служить критерием ранней диагностики гепатита А. Выявление анти-HAV-IgG у здоровых людей (возможно, у 30–60% здорового населения) свидетельствует о предыдущей инфекции и иммунитете (ретроспективная

диагностика). Вместе с тем отсутствие анти-HAV-IgG в период разгара гепатита позволяет исключить его связь с вирусом А. Количественное определение анти-HAV-IgG в сыворотке крови может быть использовано для оценки динамики поствакцинального иммунного ответа при вакцинировании против гепатита А. Динамика маркеров вирусного гепатита А представлена на рис. 16.6.

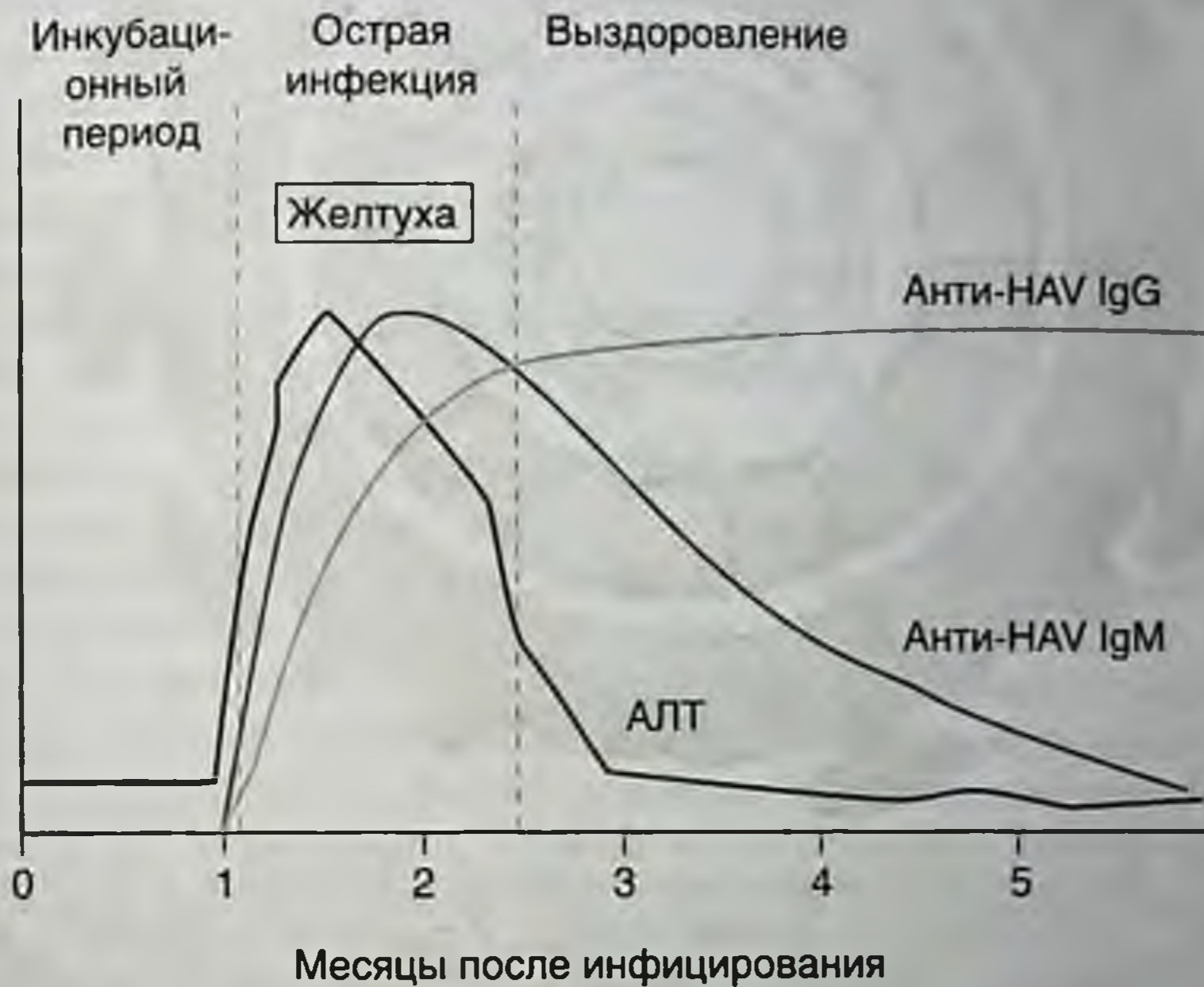
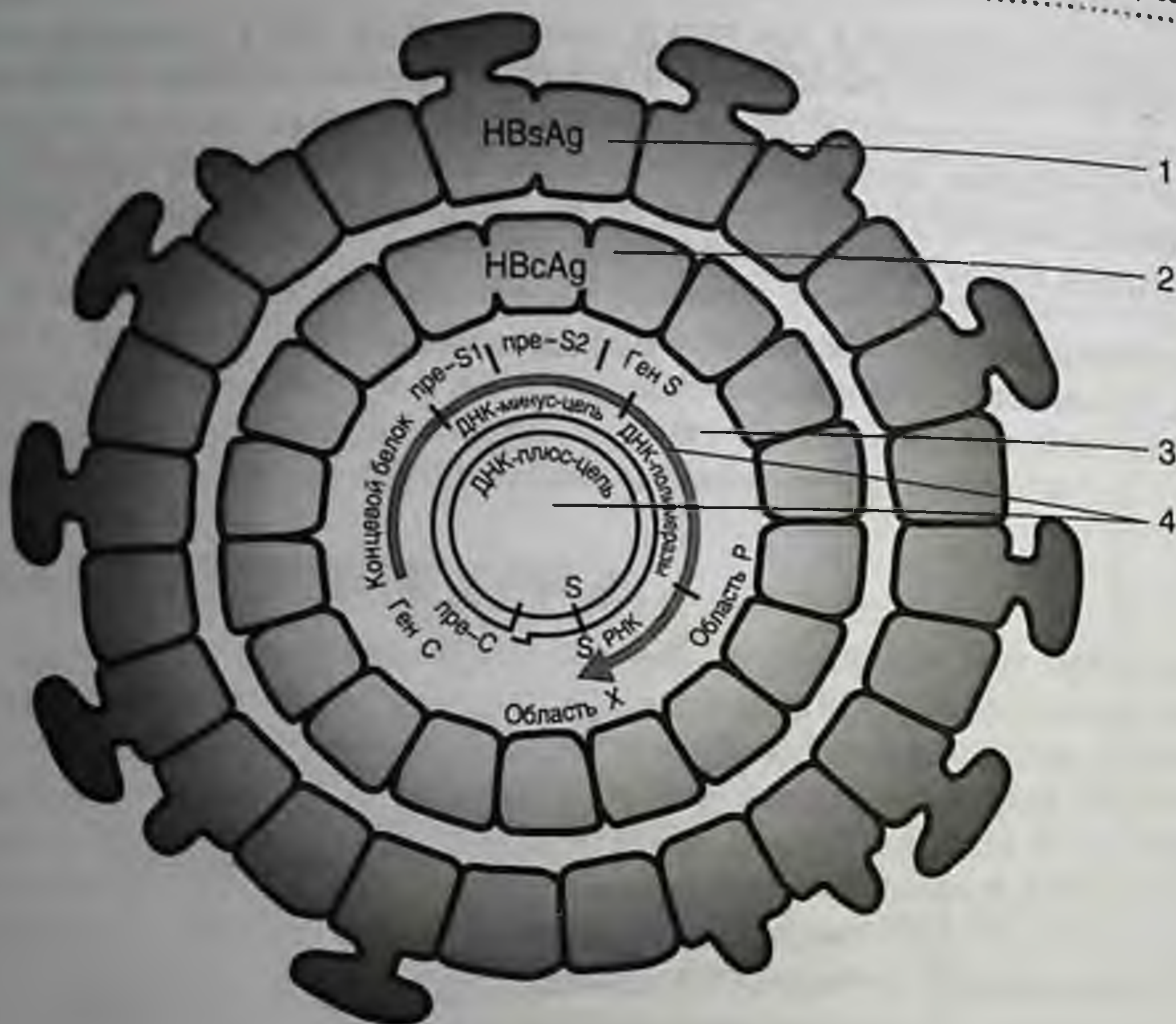


Рис 16.6. Динамика маркеров вирусного гепатита А

## 16.4.2. ВИРУСНЫЙ ГЕПАТИТ В

Вирусный гепатит В — острое или хроническое поражение печени. Хронический вирусный гепатит В характеризуется медленным развитием, длительным течением и частым формированием цирроза печени и гепатокарциномы. Возбудитель заболевания — вирус гепатита В (HBV) — относят к семейству гепаднавирусов, ДНК-содержащих вирусов, поражающих клетки печени. Вирионы вируса гепатита В имеют наружную липопротеидную оболочку и нуклеокапсид, содержащий двунитчатую циркулярную ДНК и ДНК-зависимую ДНК-полимеразу. На рис. 16.7 представлена антигенная структура вириона и маркеры вирусного гепатита В.



**Рис. 16.7.** Антигенная структура вириона вирусного гепатита В: 1 — наружная оболочка — поверхностный антиген (HBsAg); 2 — антиген с (HBcAg) — коровский или ядерный; 3 — антиген е (HBeAg); 4 — полимеразы дезоксирибонуклеиновой кислоты, дезоксирибонуклеиновая кислота вируса гепатита В

В структуре вируса гепатита В выделяют следующие антигенные системы:

- **поверхностный («австралийский») антиген, HBsAg**, находящийся в составе липопротеидной оболочки вируса гепатита В, служит маркером, указывая на инфицированность вирусом;
- **ядерный (core), HbcAg** — обнаруживают в составе нуклеокапсида вирионов, свидетельствует об активной репродукции вируса;
- **HbeAg** — входит в состав ядра вируса гепатита В, указывая на активность вируса и, кроме того, на его высокую вирулентность и инфекционность;
- **HBxAg** — расположен вблизи оболочки вириона, его роль в генезе инфекции изучают.

Свыше 5% населения планеты охвачено этой инфекцией, а частота безжелтушных форм вирусного гепатита В составляет от 60 до 82%.



В диагностике вирусного гепатита В ведущее значение имеет определение комплекса маркеров гепатита.

**Поверхностный антиген гепатита В в сыворотке крови.** Обнаружение поверхностного антигена (HBsAg) гепатита В в сыворотке подтверждает острое или хроническое инфицирование вирусом гепатита В.

При остром заболевании HBsAg выявляют в сыворотке крови в последнюю 1–2 нед инкубационного и первые 2–3 нед клинического периода. Циркуляция HBsAg в крови может ограничиваться несколькими днями, поэтому следует стремиться к раннему первичному обследованию больных. Частота выявления HBsAg зависит от чувствительности используемого метода исследования. Метод ИФА позволяет обнаружить HBsAg более чем у 90% больных. Почти у 5% больных самые чувствительные методы исследования не обнаруживают HBsAg, в таких случаях этиологию вирусного гепатита В подтверждают наличием анти-HBcAg-IgM.

При остром течении гепатита В концентрация HBsAg в крови постепенно снижается, вплоть до полного исчезновения. HBsAg исчезает у большинства больных в течение 3 мес от начала острой инфекции. Снижение концентрации его более чем на 50% к концу 3-й недели острого периода, как правило, свидетельствует о близком завершении инфекционного процесса. Обычно у больных с высокой концентрацией HBsAg в разгар болезни его обнаруживают в крови в течение нескольких месяцев. У больных с низкой концентрацией HBsAg исчезает значительно раньше (иногда через несколько дней после начала заболевания). В целом срок обнаружения HBsAg колеблется от нескольких дней до 4–5 мес. Максимальный срок обнаружения HBsAg при гладком течении острого гепатита В не превышает 6 мес от начала заболевания.

HBsAg может быть обнаружен у практически здоровых людей, как правило, при профилактических или случайных исследованиях. В таких случаях исследуют другие маркеры вирусного гепатита В (анти-HBcAg-IgM, анти-HBc-IgG, анти-HBeAg) и изучают функцию печени. При отрицательных результатах необходимы повторные исследования на HBsAg. Если повторные исследования крови в течение более 3 мес выявляют HBsAg, такого человека относят к хроническим носителям поверхностного антигена. Носительство HBsAg — довольно распространенное явление. В мире насчитывают более 300 млн носителей, у нас в стране — около 10 млн. Прекращение циркуляции HbsAg с последующей сероконверсией (появление антител к HbsAg) всегда свидетельствует о санации организма.

**Антитела к HBsAg (анти-HBsAg) гепатита В в сыворотке крови.** Антитела к поверхностному антигену гепатита В — анти-HBsAg —

обнаруживают в конце острого вирусного гепатита В или, чаще всего, через 3 мес от начала инфекции, изредка позже (до года). Они сохраняются долго, в среднем 5 лет. Анти-НВsAg обнаруживают не сразу после исчезновения НВsAg. Продолжительность фазы «окна» варьирует от нескольких недель до нескольких месяцев. Антитела к поверхностному антигену гепатита В нейтрализуют вирус, их рассматривают как признак иммунитета. Они относятся к классу IgG. Определение анти-НВsAg — надежный критерий развития постинфекционного иммунитета и выздоровления. Выявление анти-НВsAg может служить критерием ретроспективной диагностики гепатита ранее не уточненной этиологии. Анти-НВsAg свидетельствуют о ранее перенесенной инфекции.

Обнаружение антител к НВsAg играет важную роль в определении контингента для вакцинации против гепатита В. Согласно рекомендациям ВОЗ, если уровень анти-НВsAg составляет менее 10 мМЕ/л, то таким лицам показана вакцинация против гепатита В, при уровне 10–100 мМЕ/л вакцинация должна быть отложена на 1 год, при уровне более 100 мМЕ/л вакцинация показана через 5–7 лет.

**Общие антитела к ядерному антигену гепатита В (анти-НВсAg) в сыворотке крови.** Антиген НВсAg обнаруживают только в ядрах гепатоцитов. В крови в свободном виде НВсAg не выявляют. Антитела к ядерному антигену гепатита В появляются первыми среди других антител, связанных с гепатитом В в сыворотке крови больных острым и хроническим вирусным гепатитом В, а также у реконвалесцентов (выздоровливающих). Общие антитела к ядерному антигену гепатита В состоят из иммуноглобулинов класса М и G. Определение общих антител к ядерному антигену гепатита В можно использовать только для ретроспективной диагностики гепатита В, так как у 5–10% больных исследования на НВsAg дают отрицательный результат. Чтобы установить, в какой стадии развития находится гепатит В, необходимо дополнительное определение антител IgM. Антитела класса IgM — маркер активной репликации вируса, то есть острой инфекции, а антитела класса IgG — перенесенной инфекции.

**Антитела IgM к ядерному антигену гепатита В (анти-НВсAg-IgM) в сыворотке крови** обнаруживают уже в начале острой фазы болезни, еще до появления желтухи или в первые ее дни, иногда даже в конце инкубации. Выявление анти-НВсAg-IgM служит убедительным критерием диагностики гепатита В, особенно при отрицательных результатах исследования на НВsAg. Анти-НВсAg-IgM циркулируют в крови больных в течение нескольких месяцев (2–5 мес) до периода реконвалесценции, а затем исчезают, что рассматривают как признак очищения организма от вируса гепатита В.

Антитела IgG к ядерному антигену гепатита В (анти-НВсAg-IgG) в сыворотке крови у больных появляются в острый период вирусного гепатита В и сохраняются на протяжении всей жизни. Анти-НВсAg-IgG — ведущий маркер перенесенного гепатита В.

НВе-антиген (НВеAg) гепатита В можно обнаружить в сыворотке крови большинства больных острым вирусным гепатитом В. Он обычно исчезает из крови раньше НВс-антигена. Высокий уровень НВеAg в первые недели заболевания или обнаружение его на протяжении более 8 нед дает основание заподозрить хроническую инфекцию. Этот антиген часто обнаруживают при хроническом активном гепатите вирусной этиологии. Наличие НВеAg в крови свидетельствует о присутствии в организме обследуемого активной инфекции гепатита В, обнаруживают только в случае присутствия в крови НВс-антигена. Наличие НВеAg свидетельствует о продолжающейся репликации вируса и заразности больного. НВеAg — маркер острой фазы и репликации вируса гепатита В.

Антитела к НВеAg гепатита В (анти-НВеAg) в сыворотке крови. Появление анти-НВеAg антител указывает обычно на интенсивное выведение из организма вируса гепатита В и незначительное инфицирование больного. Эти антитела появляются в острый период заболевания и сохраняются до 5 лет после перенесенной инфекции. При хроническом персистирующем гепатите анти-НВеAg обнаруживают в крови больного вместе с НВсAg.



Рис. 16.8. Динамика маркеров вирусного гепатита В в первые недели после инфицирования



Рис. 16.9. Динамика маркеров в крови при остром вирусном гепатите В

Подробная динамика основных маркеров вирусного гепатита В в первые недели после инфицирования представлена на рис. 16.8 и 16.9.

Периоды обнаружения в крови маркеров вирусного гепатита В при остром процессе следующие.

- Поверхностный HBs-антиген — с инкубационного периода до периода ранней реконвалесценции (5,5–6 мес).
- Антиген Hbe определяют в инкубационный и продромальный период (до 3,5 мес); его обнаружение свидетельствует о репликации вируса.
- Антитела к Hbe-антигену появляются в острый период заболевания (3–4-й месяц) и сохраняются до нескольких лет.
- Антитела класса IgM к ядерному антигену (анти-HbcAg-IgM) появляются в продромальном периоде и сохраняются до периода реконвалесценции (со 2-го по 6-й месяц заболевания).
- Антитела класса IgG к ядерному антигену (анти-HbcAg-IgG) появляются в продромальном периоде и сохраняются на протяжении всей жизни (ведущий маркер вирусного гепатита В).
- Антитела к поверхностному Hbs-антигену (анти-HBsAg) появляются в стадию поздней реконвалесценции (6-й месяц) и сохраняются до 5 лет.

### 16.4.3. ВИРУСНЫЙ ГЕПАТИТ С

Гепатит С (Hepatitis C) — вирусное заболевание, наиболее часто протекающее в виде посттрансфузионного гепатита с преобладанием без-

желтушных форм и склонное к хронизации процесса. Возбудитель — ВГС имеет сходство с флавовирусами, содержит РНК.

Примерно 90% всех случаев посттрансфузионных гепатитов связано с ВГС. Среди доноров антитела к ВГС (анти-ВГС) обнаруживают в 0,2–5% случаев. У 40–75% пациентов регистрируют бессимптомную форму болезни, у 50–75% больных острым вирусным гепатитом С формируется хронический гепатит, у 20% из них развивается цирроз печени. Важная роль ВГС принадлежит и в этиологии гепатоклеточной карциномы.

Геном ВГС представлен одноцепочечной положительно заряженной РНК, которая кодирует 3 структурных (нуклеокапсидный белок *core* и нуклепротеины оболочки  $E_1$ – $E_2$ ) и 5 структурных ( $NS_1$ ,  $NS_2$ ,  $NS_3$ ,  $NS_4$ ,  $NS_5$ ) белков. К каждому из этих белков вырабатываются антитела, обнаруживаемые в крови больных гепатитом С.

Отличительной чертой ВГС считают волнообразное течение заболевания, в котором разграничивают три фазы: острую, латентную и реактивации. Для острой фазы характерно повышение активности печеночных ферментов в сыворотке крови, уровня антител класса IgM и IgG к ВГС с нарастанием титров, а также присутствие РНК ВГС в крови. Латентная фаза характеризуется отсутствием клинических проявлений, наличием в крови антител класса IgG к ВГС в высоких титрах, отсутствием антител класса IgM и РНК ВГС в крови либо их присутствием в низких концентрациях на фоне незначительного повышения активности печеночных ферментов в периоды обострения. Для фазы реактивации характерно появление клинических признаков, повышение активности печеночных ферментов, наличие антител класса IgG в высоких титрах, присутствие РНК ВГС и нарастание титров антител класса IgM к ВГС в динамике.

**Антитела к ВГС в сыворотке крови.** Диагностика гепатита С основана на обнаружении суммарных антител к ВГС методом ИФА, которые появляются в первые 2 нед заболевания и свидетельствуют о возможной инфицированности вирусом или перенесенной инфекции. Анти-ВГС антитела могут сохраняться в крови реконвалесцентов на протяжении 8–10 лет с постепенным снижением их концентрации. Возможно позднее обнаружение антител спустя год и более после инфицирования. При хроническом гепатите С антитела определяют постоянно и в более высоких титрах. Большинство используемых в настоящее время тест-систем для диагностики ВГС основано на определении антител класса IgG. Тест-системы, способные определять антитела класса IgM, позволят верифицировать активную инфекцию. Антитела класса IgM могут выявлять не только при остром вирусном гепатите С,

но и при хроническом. Снижение их уровня в процессе лечения больных хроническим гепатитом С может свидетельствовать об эффективности лекарственной терапии.

Обнаружение суммарных антител IgG к ВГС методом ИФА недостаточно для постановки диагноза вирусного гепатита С и требует подтверждения способом иммуноблоттинга для исключения ложноположительного результата исследования. Необходимо полное обследование пациента на антитела класса IgG к различным белкам ВГС (core и NS) и антитела класса IgM к ВГС в динамике. Результаты серологических исследований совместно с клинико-эпидемиологическими данными позволяют установить диагноз и стадию заболевания.

**Иммуноблоттинг на антитела к белкам ВГС в сыворотке крови.** Метод ИФА, применяемый для определения антител к ВГС, считают скрининговым. В случае получения положительного результата для подтверждения его специфичности используют метод вестерн-блот — встречную преципитацию в геле антител в сыворотке крови больного с различными вирусными белками, подвергнутыми разделению по молекулярной массе с помощью электрофореза и нанесенными на нитроцеллюлозу. Исследование считают положительным, если выявляют антитела к 2 белкам ВГС или более интенсивностью «+1». Специфичными для ВГС считают антитела к белкам — core, NS<sub>1-5</sub>.

Иммуноблоттинг на ВГС служит подтверждающим тестом специфичности результата определения антител методом ИФА.

Динамика маркеров вирусного гепатита С представлена на рис. 16.10.



Рис. 16.10. Динамика маркеров при остром вирусном гепатите С

У пациентов с хроническим вирусным гепатитом С для определения стратегии лечения, помимо установления этиологического диагноза серологическими методами, необходимо определить генотип ВГС и вирусную нагрузку (уровень вирусных частиц в 1 мл крови). Для этих целей используют метод ПЦР.

#### 16.4.4. ВИРУСНЫЙ ГЕПАТИТ D

Гепатит D — вирусная инфекция («дельта-инфекция»), вследствие биологических особенностей вируса протекающая исключительно в присутствии вируса гепатита В, характеризуется тяжелым течением, часто с неблагоприятным исходом.

Возбудитель — вирус гепатита D (ВГD), по своим биологическим свойствам приближается к вирионам — обнаженным молекулам нуклеиновых кислот. Печень человека — единственное место репликации (размножения) ВГD. Инфекцию ВГD встречают у 5–15% больных гепатитом В. Сочетание вируса гепатита В и ВГD сопровождается развитием более тяжелых форм патологического процесса, что определяется главным образом действием ВГD. Летальность достигает 5–20%.

Для диагностики вирусного гепатита D используют обнаружение РНК вируса в сыворотке крови или плазме методом молекулярной гибридизации или выявления антител класса IgM и IgG к ВГD.

Антитела IgM к ВГD в сыворотке крови (анти-ВГD-IgM) появляются в острый период «дельта-инфекции» (со 2-й недели). По мере выздоровления происходит элиминация (удаление) вируса из печени и исчезновение анти-ВГD-IgM (через 2 мес с начала периода разгара). При хронизации процесса наблюдают персистирование ВГD в ткани печени и анти-ВГD-IgM в высокой концентрации в крови. Анти-ВГD-IgM свидетельствуют об активной репликации вируса.

Антитела IgG к ВГD в сыворотке крови (анти-ВГD-IgG) появляются в период реконвалесценции (3–8 нед от начала заболевания), и их концентрация постепенно снижается в течение нескольких месяцев (могут обнаруживаться в течение 1–2 лет в низких концентрациях). Определение анти-ВГD-IgG может служить критерием ретроспективной (отдаленной) диагностики гепатита ранее не уточненной этиологии.

#### 16.4.5. ВИРУСНЫЙ ГЕПАТИТ E

Возбудителем вирусного гепатита E (ВГE) служит РНК-вирус. Для заболевания характерен фекально-оральный путь передачи, пре-

имущественно водный. Инкубационный период болезни — около 35 сут. Клиническое течение острого вирусного гепатита Е и А похоже. Существенно тяжелее заболевание протекает у беременных, особенно в III триместре. РНК вируса гепатита Е появляется в крови через 2–3 нед после заражения. Вирусемия свидетельствует о факте заражения и длится в среднем в течение 3 мес, а в ряде случаев — до 6 мес.

Для специфической диагностики вирусного гепатита Е используют метод ИФА, основанный на выявлении антител класса IgM, которые появляются в крови через 3–4 нед после заражения (10–12-й день от начала клинических проявлений заболевания). Обнаружение в крови повышенного уровня антител класса IgM служит лабораторным подтверждением диагноза. Их обнаруживают у 90% пациентов с острой инфекцией в течение 1–4 нед от начала заболевания. Антитела класса IgM исчезают из крови в течение нескольких месяцев. Антитела класса IgG при вирусном гепатите Е обнаруживают в крови в разгар заболевания; в период выздоровления их уровень достигает наивысших значений (обнаруживают у 93–95% больных). Наличие только антител класса IgG не считают подтверждением диагноза вирусного гепатита Е. Для подтверждения положительного результата определения антител класса IgM и IgG используют метод вестерн-блоттинг — встречную

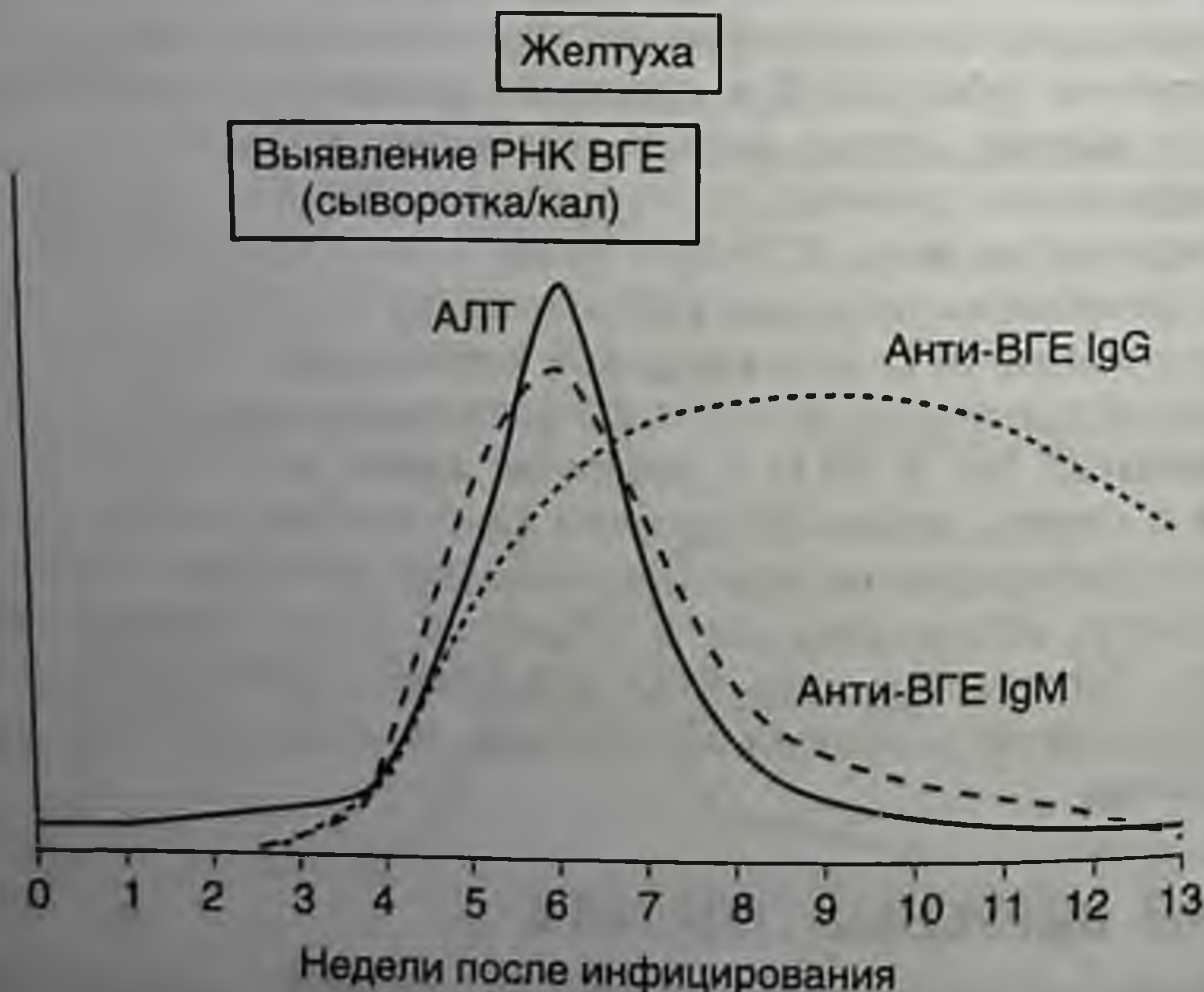


Рис. 16.11. Динамика маркеров вирусного гепатита Е



преципитацию в геле антител в сыворотке крови больного с антигенами вируса гепатита Е, подвергнутыми разделению по молекулярной массе с помощью электрофореза и нанесенными на нитроцеллюлозу.

При вирусном гепатите Е в ранние стадии заболевания вирусная РНК методом ПЦР может быть выявлена в сыворотке крови у 75% больных. Нередко РНК обнаруживают даже в инкубационный период инфекции.

Динамика маркеров вирусного гепатита Е представлена на рис. 16.11.

### 16.4.6. ВИРУСНЫЙ ГЕПАТИТ G

В настоящее время вирусный гепатит G считают официально признанным инфекционным заболеванием с парентеральным механизмом заражения (в основном при гемотрансфузиях). Вирус гепатита G относят к семейству *Flaviviridae*. Геном вируса представлен одноцепочечной РНК. В настоящее время предполагают наличие не менее трех генотипов и нескольких субтипов вируса гепатита G, которые распределены в соответствии с их географическим происхождением. Вирус содержит липидную оболочку, которая служит препятствием для образования иммунных комплексов антиген–антитело во время персистенции вируса в организме человека. В России его встречают у 3–11% доноров крови, 16–24% — больных вирусным гепатитом С. Клинические проявления заболевания по сравнению с другими формами вирусных гепатитов менее выражены. Только у 30–50% инфицированных вирусом гепатита G отмечают повышение активности трансаминаз в сыворотке крови.

Основным лабораторным маркером служит обнаружение в крови РНК вируса методом ПЦР. Для ретроспективной диагностики можно использовать обнаружение специфических антител класса IgG к белку оболочки E<sub>2</sub> вируса гепатита G в сыворотке крови.

## 16.5. СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ПЕРИНАТАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Заражение плода в организме матери может привести к различным инфекционным заболеваниям, которые объединены одним общим названием — внутриутробная инфекция. Ребенок может заразиться различными возбудителями инфекционных заболеваний во время родов (при прохождении по инфицированным родовым путям) или после рождения (через материнское молоко и другие биологические жид-

кости). Инфекционные заболевания, развившиеся вследствие этих причин, получили название неонатальных инфекций (интра- и постнатальные). У многих новорожденных, заразившихся во время родов или после них, инфекция может протекать бессимптомно. Однако у некоторых из них, особенно у недоношенных, развиваются выраженные клинические проявления заболевания с тяжелым течением. Перинатальные инфекции — инфекционные заболевания, возникшие вследствие инфицирования плода во время внутриутробного развития, в процессе родов или после рождения.

В последние годы отмечают значительное увеличение частоты врожденных инфекций, причем преимущественно вирусной этиологии. В настоящее время очевидна роль этих инфекций в формировании младенческой заболеваемости, инвалидности и смертности. Согласно последним данным, более 10% новорожденных инфицируются внутриутробно различными вирусами и микроорганизмами.

Вирусные инфекции вызывают до 80% врожденных пороков развития у детей, среди которых ведущее место занимают поражения ЦНС, а также врожденные пороки сердца и почек. Многочисленные научные данные свидетельствуют об этиологической связи врожденных пороков развития у детей с вирусными инфекциями, перенесенными во время беременности, или трансплацентарной передачей вирусов от матерей с персистентной формой инфекции.

К наиболее распространенным перинатальным инфекциям относят герпетическую, цитомегаловирусную, парвовирусную и токсоплазменную инфекцию, краснуху, хламидиоз.

Лабораторное обследование новорожденных и беременных позволяет диагностировать вирусную инфекцию у подавляющего большинства обследованных (до 98%). Нередко у беременных и новорожденных определяют смешанную инфекцию, представленную не менее чем 3 вирусами, которые способны вызывать развитие врожденных пороков.

Ранняя и своевременная диагностика вирусной инфекции у беременных и врожденной инфекции у детей позволяет выработать оптимальную терапевтическую тактику ведения беременности и родов, рационально применять препараты с противовирусной направленностью с целью снижения вероятности возникновения у детей пороков развития.

При подозрении на внутриутробную инфекцию чаще всего проводят исследование беременных на наличие маркеров герпетической, цитомегаловирусной, парвовирусной, хламидийной и токсоплазменной инфекции, а также краснухи. Отрицательные результаты иссле-

лований матери во время беременности на данные инфекции в большинстве случаев позволяют исключить возможность инфицирования плода. В случае, если подозревают интра- и постнатальную инфекцию, необходимо проводить одновременное исследование крови матери и ребенка.

Лабораторное обследование беременных и ребенка при подозрении на наличие перинатальных инфекций включает определение в сыворотке крови антител класса IgM и IgG:

- к цитомегаловирусу;
- к вирусу простого герпеса типа 1 и 2;
- к парвовирусу;
- к вирусу краснухи;
- к токсоплазме;
- IgA к *Chlamydia trachomatis*.

## 16.6. ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ В ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — один из методов ДНК-диагностики, позволяет увеличить число копий детектируемого (изучаемого) участка генома (ДНК) бактерий или вирусов в миллионы раз. Тестируемый специфический для данного генома отрезок нуклеиновой кислоты многократно умножается (амплифицируется), что позволяет его идентифицировать (точно определить). Для диагностики достаточно одной молекулы ДНК, то есть одной бактерии или вирусной частицы. Введение в реакцию дополнительного этапа — синтеза ДНК на молекуле РНК при помощи фермента обратной транскриптазы — позволило тестировать и РНК-вирусы, например, ВГС. ПЦР — трехступенчатый процесс, повторяющийся циклично. Синтезированное количество ДНК идентифицируют методом ИФА или электрофореза.

В ПЦР может быть использован различный биологический материал — сыворотка или плазма крови, соскоб из уретры, биоптат, плевральная жидкость или СМЖ и т.д. В первую очередь ЦПР применяют для диагностики инфекционных болезней, таких как вирусные гепатиты В, С, D, цитомегаловирусная инфекция, заболевания инфекционные, передающиеся половым путем (гонорея, хламидийная, микоплазменная, уреаплазменная инфекция), туберкулез, ВИЧ-инфекция и т.д.

Преимущества ПЦР в диагностике инфекционных заболеваний перед другими методами исследований:

- возбудитель инфекции может быть обнаружен в любой биологической среде организма, в том числе и материале, получаемом при биопсии;
- возможна диагностика инфекционных болезней на самых ранних стадиях заболевания;
- возможна количественная оценка результатов исследований (сколько вирусов или бактерий содержится в исследуемом материале);
- высокая чувствительность метода (для обнаружения бактерий или вирусов достаточно наличие всего 4–5 патогенов).

### 16.6.1. ОБНАРУЖЕНИЕ ВИРУСА ГЕПАТИТА С

В отличие от серологических методов диагностики ВГС, где обнаруживают антитела к нему, ПЦР позволяет выявить наличие непосредственно РНК вируса и количественно выразить его концентрацию в исследуемом материале. Тест имеет видовую специфичность и высокую чувствительность — 10 молекул РНК ВГС в исследуемом материале достаточно для его выявления. Обнаружение антител к ВГС подтверждает лишь факт инфицирования пациента, но не позволяет судить об активности инфекционного процесса (о репликации вируса), прогнозе заболевания. Кроме того, антитела к ВГС обнаруживают как в крови больных острым и хроническим гепатитом, так и у тех пациентов, кто болел и выздоровел, а нередко антитела в крови возникают только спустя несколько месяцев после появления клинической картины заболевания, что затрудняет своевременную диагностику. Обнаружение ВГС в крови с использованием ПЦР — более информативный метод диагностики. Выявление ПЦР РНК вируса свидетельствует о виремии, позволяет судить о репликации вируса в организме и служит одним из критериев эффективности противовирусной терапии. Обнаружение РНК ВГС с помощью ПЦР на ранних этапах развития вирусной инфекции на фоне полного отсутствия каких-либо серологических маркеров может служить самым ранним свидетельством инфицирования. Однако изолированное выявление РНК вируса на фоне полного отсутствия каких-либо других серологических маркеров не может полностью исключить ложноположительный результат. В таких случаях требуются всесторонняя оценка клинических, биохимических и морфологических исследований и повторное неоднократное подтверждение наличия инфекции методом ПЦР.

Большое значение имеет применение метода ПЦР у больных с хроническим вирусным гепатитом С, так как у большинства из них отсутствует корреляция (соответствие) между наличием вирусной репликации и активностью печеночных ферментов. В таких случаях только ПЦР позволяет судить о наличии вирусной репликации, особенно, если конечный результат выражен количественно. В большинстве случаев заболевания исчезновение из сыворотки крови РНК ВГС наблюдают позже нормализации активности печеночных ферментов. Именно поэтому нормализация их активности не может служить основанием для прекращения противовирусного лечения. В таких случаях количественный метод определения содержания РНК ВГС в крови дает важную информацию об интенсивности развития заболевания, эффективности лечения и развитии резистентности к антивирусным препаратам.

Кроме того, метод ПЦР позволяет установить генотип ВГС, который во многом определяет клинические особенности течения вирусного гепатита С. Для клинической практики имеют значение 5 субтипов ВГС: 1a, 1b, 2a, 2b и 3a. В нашей стране наиболее часто встречаются субтип 1b, далее идут 3a, 1a, 2a. При инфицировании пациента субтипом 1b хронический вирусный гепатит С развивается примерно в 90% случаев, при наличии субтипа 2a и 3a — в 33–50%. У пациентов с субтипом 1b заболевание протекает в более тяжелой форме и часто заканчивается развитием цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы. Определение генотипа (субтипа) вируса имеет большое значение для определения прогноза течения вирусного гепатита С и выбора схемы лечения.

Обнаружение РНК ВГС в материале с помощью ПЦР используют в целях:

- разрешения сомнительных результатов серологических исследований;
- дифференциации (различия) гепатита С от других форм гепатита;
- диагностики острой стадии заболевания по сравнению с ранее перенесенной инфекцией или контактом, определения стадии инфицированности новорожденных от серопозитивных по ВГС матерей;
- контроля эффективности противовирусного лечения.

## 16.6.2. ОБНАРУЖЕНИЕ ВИРУСА ГЕПАТИТА В

Примерно 5–10% случаев цирроза и других хронических заболеваний печени обусловлены хроническим носительством вируса гепатита В. Маркерами активности таких заболеваний служат HBeAg и ДНК вируса гепатита В в сыворотке крови.

ПЦР позволяет определять в исследуемом материале (кровь, пунктат печени) ДНК вируса гепатита В как качественно, так и количественно. Качественное определение вируса в материале позволяет подтвердить его наличие в организме больного и тем самым устанавливает причину заболевания. Количественный метод определения содержания ДНК вируса гепатита В в исследуемом материале дает важную информацию об интенсивности развития заболевания, эффективности лечения и развитии резистентности (устойчивости) к противовирусным препаратам. Проведение ПЦР при вирусном гепатите В необходимо для суждения о вирусной репликации. Вирусную ДНК в сыворотке крови обнаруживают у 50% больных при отсутствии HBeAg. Материалом для выявления ДНК вируса гепатита В могут служить сыворотка крови, лимфоциты, гепатобиоптаты. Оценка результатов исследования на ДНК вируса гепатита В во многом аналогична описанному для гепатита С.

Обнаружение ДНК вируса гепатита В в материале с помощью ПЦР необходимо для:

- разрешения сомнительных результатов серологических исследований;
- выявления острой стадии заболевания для различения с ранее перенесенной инфекцией или контактом;
- контроля эффективности противовирусного лечения.

### 16.6.3. ОБНАРУЖЕНИЕ ВИЧ

Метод ПЦР для обнаружения РНК ВИЧ может быть качественным и количественным. Качественное обнаружение РНК с помощью ПЦР используют для:

- неонатального скрининга;
- подтверждения результатов скринингового серологического исследования;
- скрининга пациентов с высоким риском наличия ВИЧ-инфекции;
- разрешения сомнительных результатов по иммуноблоттинговому исследованию;
- контроля эффективности противовирусного лечения;
- определения стадии заболевания СПИД (переход инфицированности в заболевание).

Прямое количественное определение РНК ВИЧ с помощью ПЦР позволяет более точно, чем определение содержания CD4-лимфоцитов, предсказать скорость развития СПИДа у лиц, инфицированных ВИЧ, следовательно, более точно оценить их выживаемость. Высокое содержание вирусных частиц обычно коррелирует с выраженным наруше-

нием иммунного статуса и низким содержанием CD4-лимфоцитов. Низкое содержание вирусных частиц обычно коррелирует с более благополучным иммунным статусом и более высоким содержанием CD4-лимфоцитов. При инфекции ВИЧ прогноз непосредственно определяют уровнем вирусемии. Снижение уровня вирусемии при лечении улучшает прогноз заболевания.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ

1. Для чего в клинической практике используют серологические исследования?
2. Что такое авидность?
3. Перечислите основные группы серологических методов для диагностики инфекционных заболеваний.
4. В чем сущность ИФА?
5. Назовите основные лабораторные тесты, которые используют для диагностики сифилиса.
6. Какие тесты используют для выявления ВИЧ-инфекции?
7. Перечислите вирусные гепатиты, диагностику которых проводят в лабораториях.
8. Назовите лабораторные тесты для диагностики вирусного гепатита В.
9. Назовите лабораторные тесты для диагностики вирусного гепатита С.
10. Что такое ПЦР?
11. Для чего используют ПЦР в диагностике инфекционных заболеваний?

# ГОРМОНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данная глава посвящена лабораторным исследованиям, используемым в клинической эндокринологии — разделе практической медицины, который занимается лечением пациентов с заболеваниями органов или их частей, отвечающих за продукцию и секрецию гормонов.

Человеческий организм находится в очень тесных взаимоотношениях с внешним миром. Физические условия среды, степень ее загрязнения, стрессорные воздействия — главные факторы, с которыми неразрывно связана жизнедеятельность организма. Однако организм человека может существовать только при условии, если внутренние параметры обмена веществ поддерживаются в определенных, обычно довольно узких пределах. Это положение было сформулировано великим французским физиологом Клодом Бернардом еще в XIX в. и получило название закона постоянства внутренней среды организма — необходимого условия жизни организма. Выполнение закона постоянства внутренней среды организма обеспечивается деятельностью эндокринной системы (греч. *endon* — внутри + *krinō* — отделять, выделять). Эндокринная система включает железы внутренней секреции. Их называют так потому, что свои гормоны (биологически активные вещества) они выделяют непосредственно в кровь.

## 17.1. ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ЭНДОКРИННОЙ СИСТЕМЫ

Гормоны — биологически активные вещества, которые выделяются железами внутренней секреции непосредственно в кровь или тканевую жидкость и с током крови разносятся по всему организму. Гормоны оказывают свой физиологический эффект в клетках органов и тканей (органах-мишенях), нередко находящихся на значительном отдалении



от места их образования. Главные функции гормонов: регуляция обмена веществ и других процессов жизнедеятельности в основном путем их воздействия на активность ферментов, обмен витаминов, рост тканей и всего организма в целом, активность генов, формирование пола и размножение, приспособленность к среде обитания, поддержание постоянства внутренней среды организма.

Гормоны отличаются по своей химической структуре и физико-химическим свойствам. В организме человека функционирует более 100 гормонов. Их общим свойством считают то, что после выделения из клеток, в которых они образуются, они достигают клеток других органов и вызывают в них более или менее специфические изменения метаболизма. После инактивации гормоны выводятся из организма. Скорость образования гормонов, длительность их действия и разрушения регулируется потребностями макроорганизма.

Эндокринная система состоит из центральных и периферических органов. Центральными органами эндокринной системы являются гипоталамус и гипофиз (рис. 17.1). Синтез и секреция гормонов регулируются гипоталамусом. Гипоталамус — область головного мозга, служащая центром эндокринной системы. Здесь происходит выработка веществ, регулирующих деятельность гипофиза. Гипоталамус — типичная эндокринная железа, синтезирующая и выделяющая специальные гормоны. Здесь образуются гормоны пептидной природы, называемые либеринами (рилизинг-гормонами) или пусковыми факторами, которые в небольших количествах через систему портального кровообращения гипофиза приносятся к клеткам гипофиза.

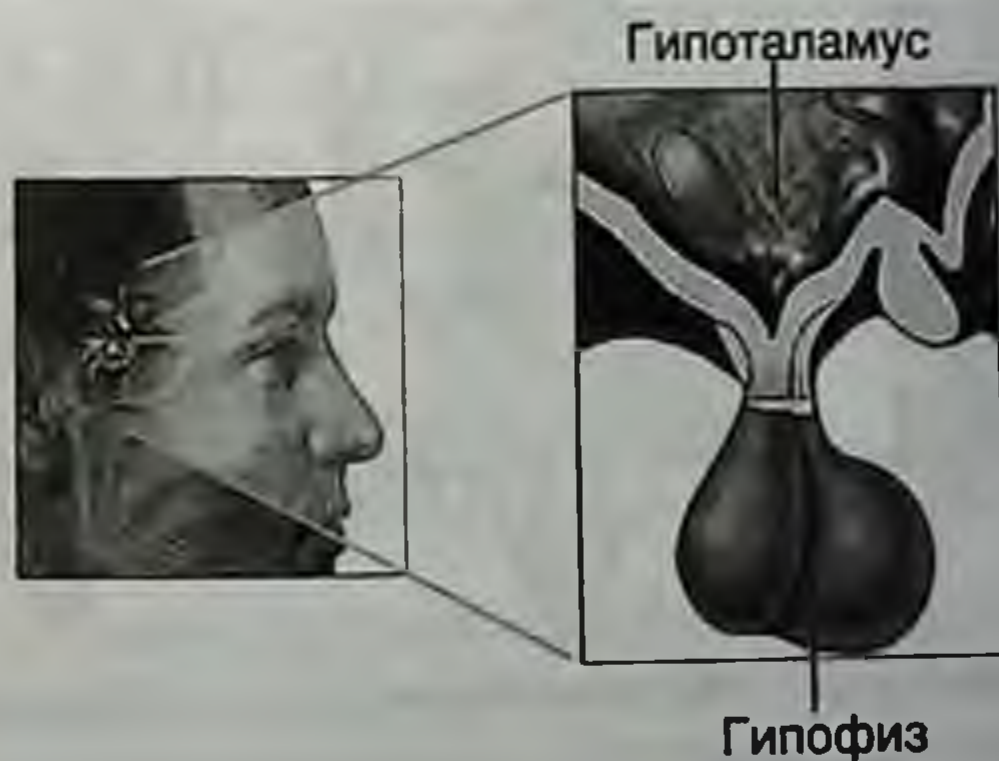


Рис. 17.1. Анатомия гипоталамуса и гипофиза

Гипоталамус чутко реагирует на изменение уровня гормонов в крови и сразу же «дает приказания» гипофизу, который регулирует перифери-

ческие органы эндокринной системы — половые железы, щитовидную железу, надпочечники.

Гипофиз — придаток головного мозга, состоит из клеток, которые синтезируют гормоны, регулирующие деятельность периферических эндокринных органов. В клетках передней доли гипофиза синтезируются различные гормоны. Попадая в кровоток, они транспортируются к клеткам периферических желез внутренней секреции, в которых вызывают синтез и высвобождение гормонов, оказывающих прямое биологическое действие. Под строгим контролем гипоталамуса и гипофиза находятся такие периферические железы внутренней секреции, как щитовидная и половые железы (у мужчин яички, у женщин — яичники), надпочечники (рис. 17.2).



Рис. 17.2. Регуляция секреции гормонов

Через гипофизарные гормоны гипоталамус регулирует функцию периферических желез внутренней секреции. Так, например, гипота-

лапус, секретирова тиреотропин-релизинг гормон (ТРГ), стимулирует образование и выделение ТТГ гипофизом, который, в свою очередь, стимулирует секрецию щитовидной железой тиреоидных гормонов. В связи с этим принято говорить о единых функциональных системах: гипоталамус—гипофиз—щитовидная железа, гипоталамус—гипофиз—надпочечники, гипоталамус—гипофиз—яичники (у женщин), гипоталамус—гипофиз—яички (у мужчин).

Транспорт гормонов осуществляется кровью. Большинство гормонов (особенно белковой и пептидной природы) хорошо растворимы в воде и, следовательно, плазме крови. Исключение составляют тироксин ( $T_4$ ) и стероидные гормоны. Они транспортируются кровью с помощью специальных белков-носителей.

Гормоны циркулируют в крови в очень низких концентрациях (обычно около  $10^{-6}$ — $10^{-9}$  моль/л), но количество молекул, соответствующих этой концентрации, огромно ( $10^{17}$ — $10^{14}$  молекул/л) — практически триллионы молекул в 1 л крови. Это огромное количество молекул гормонов делает возможным их влияние на каждую отдельную клетку организма и регуляцию ее специфических метаболических процессов.

Гормоны чаще всего классифицируют по вырабатывающим их железам (гипофизарные, щитовидные, половые и др.).

Регуляция секреции гормонов гипоталамусом происходит по системе обратной отрицательной связи. При высоком уровне того или иного гормона в крови, вырабатываемого железой внутренней секреции (например, щитовидной), гипоталамус дает меньше стимулов гипофизу, и тот вырабатывает меньше регулирующих периферические железы гормонов. Соответственно концентрация гормонов в крови падает, а в ответ на это снижение уровня гипоталамус начинает посылать больше стимулов и побуждает гипофиз к повышению секреции гормонов и стимуляции периферических эндокринных желез. Весь цикл повторяется снова и снова.

## 17.2. ГОРМОНЫ ГИПОТАЛАМУСА И ГИПОФИЗА

Регуляция секреции гормонов гипофиза осуществляется выделением гипоталамических гормонов. Гипоталамус выделяет специфические медиаторы — релизинг-гормоны, которые по сосудам портальной системы гипоталамуса—гипофиза поступают в гипофиз и, воздействуя непосредственно на его клетки, стимулируют или тормозят секрецию гормонов. Гормоны гипоталамуса и гипофиза относят к белковым и полипептидным.

Стимуляцию секреции гормонов гипофиза осуществляют следующие гормоны гипоталамуса:

- кортикотропин-рилизинг гормон (КРГ);
- тиреотропин-рилизинг гормон (ТРГ);
- гонадотропин-рилизинг гормон (ГРГ);
- пролактин-рилизинг гормон (ПРГ);
- соматотропин-рилизинг гормон (СТРГ);
- меланотропин-рилизинг гормон (МРГ).

Помимо названных гормонов, в гипоталамусе синтезируется антидиуретический гормон (АДГ), который поступает в тканевые депо задней доли гипофиза.

Гипофиз выделяет гормоны с широким спектром действия (рис. 17.3).

**Передней долей гипофиза секретируются:**

- АКТГ;
- СТГ или гормон роста;
- ТТГ;
- ФСГ;
- ЛГ;
- пролактин (ПРЛ);
- $\beta$ -липотропный гормон ( $\beta$ -ЛТГ);
- пропiomеланокортин (ПМК).

**Задней долей гипофиза секретируются:**

- АДГ (аргинин-вазопрессин);
- окситоцин — гормон, который регулирует выделение молока из лактирующей молочной железы, а также может участвовать в инициации сокращений матки при родах.

Гипофизарные гормоны могут образовываться также в других тканях организма, в основном злокачественными и доброкачественными опухолями. Опухоли различных органов способны секретировать АКТГ, АДГ, пролактин, ТТГ, СТГ и др.

### 17.3. НАРУШЕНИЕ СЕКРЕЦИИ ГОРМОНОВ ГИПОТАЛАМУСА И ГИПОФИЗА

Секреция гормонов гипофиза регулируется механизмом, функционирующим по принципу обратной отрицательной связи, который работает следующим образом. Гипоталамус секретирует повышенное количество определенного рилизинг гормона, например ТРГ, который заставляет гипофиз вырабатывать ТТГ. Этот гормон с током крови

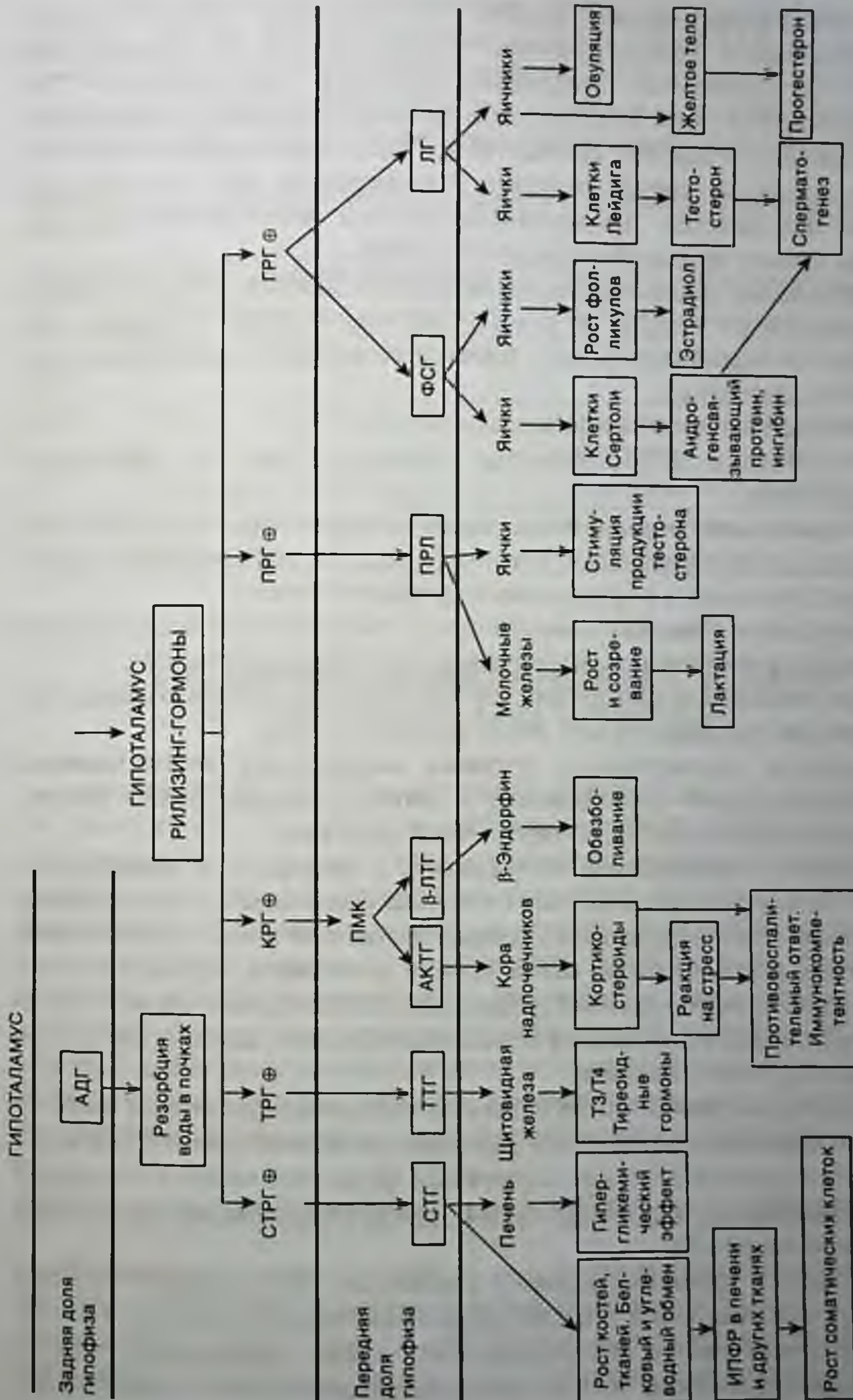


Рис. 17.3. Гормоны гипоталамуса, гипофиза и эндокринных желез

доставляется к щитовидной железе, где стимулирует синтез и секрецию тироксина и трийодтиронина. Соответственно, их концентрация в крови увеличивается и тормозит секрецию гипоталамусом ТРГ, а гипофизом ТТГ. Как только концентрации тироксина и трийодтиронина в крови снижаются, снимается их тормозящее влияние на гипоталамус, который снова начинает секретировать ТРГ. И весь круг событий повторяется. Аналогичным образом регулируется секреция половых гормонов, гормонов надпочечников.

Повреждение патологическим процессом любого из компонентов гормональной регуляции из общей системы нарушает единую цепь регуляции функций организма и приводит к развитию различных патологических состояний.

Причины эндокринных заболеваний:

- генетически обусловленные дефекты синтеза различных гормонов;
- повреждение эндокринных желез (центральных и периферических) воспалительными, аутоиммунными и опухолевыми процессами, травмами, нарушениями кровоснабжения;
- нарушение чувствительности самих эндокринных желез, а также периферических тканей (органов-мишеней) к гормонам;
- неадекватное поступление в организм веществ, необходимых для синтеза гормонов.

Патология эндокринной системы выражается заболеваниями и патологическими состояниями, в основе которых лежит гипер-, гипо- или дисфункция желез внутренней секреции.

Нарушение взаимосвязи гипоталамуса, гипофиза и периферических желез внутренней секреции — основа большинства эндокринных заболеваний. Для выбора эффективных методов лечения таких больных необходимо установить, на каком уровне произошла поломка взаимосвязи в системе гормональной регуляции. Лабораторные тесты помогают обнаружить эти нарушения механизма обратной связи и тем самым установить причину болезни.

Эндокринные заболевания наиболее часто манифестируют симптомами снижения или повышения функции гипофиза (табл. 17.1) и могут развиваться в результате как нарушения функционального состояния самого гипофиза, так и первичного поражения периферических желез внутренней секреции.

Для оценки функционального состояния эндокринной системы используют определение в крови целого комплекса гормонов, обеспечивающего всю линию функциональной связи: гипоталамус → гипофиз → периферическая железа внутренней секреции → гипоталамус.

Например, если исследуют состояние гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной системы, то проводят исследования ТРГ → ТТГ → свободный тироксин (сТ<sub>4</sub>). Более подробно изменения лабораторных показателей при нарушениях в различных отделах гипоталамо-гипофизарной системы будут рассмотрены в соответствующих разделах данной главы.

**Таблица 17.1.** Последствия первичного нарушения секреции гормонов передней доли гипофиза

Гормон	Избыток	Недостаточность
СТГ	Акромегалия, чрезмерный рост	Наносомия (карликовость)
Пролактин	Аменорея, бесплодие, галакторея	Отсутствие лактации
АКТГ	Болезнь Иценко–Кушинга	Вторичная гипофункция коры надпочечников
ТТГ	Гипертиреоз (очень редко)	Вторичный гипотиреоз
ЛГ/ФСГ	Преждевременная половая зрелость	Вторичная гипофункция половых желез, бесплодие

## 17.4. ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Заболевания щитовидной железы по распространенности занимают 2-е место среди эндокринных заболеваний после сахарного диабета. Они развиваются в результате изменений биосинтеза тиреоидных гормонов, нарушений механизмов регуляции функции щитовидной железы или действия гормонов на ткани. Лабораторные исследования, которые включают определение концентрации тиреоидных гормонов, играют важную роль в диагностике, мониторинге (отслеживании) эффективности лечения заболеваний щитовидной железы. Нарушениями функции щитовидной железы страдает около 5% взрослого населения, поэтому наиболее широко используют в клинической практике исследование уровня тиреоидных гормонов в крови.

### 17.4.1. БИОСИНТЕЗ ГОРМОНОВ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Щитовидная железа состоит из двух долей и перешейка (рис. 17.4). У трети людей имеется добавочная пирамидальная долька, отходящая от перешейка. Располагается щитовидная железа на передней поверхности шеи в нижней ее трети и имеет бабочко- или подковообразную

(реже) форму. Она охватывает спереди трахею (дыхательное горло) и хрящи гортани, располагаясь чуть ниже щитовидного хряща, который как щит закрывает гортань. Из-за этого соседства железа и получила свое название — щитовидная. Средняя масса щитовидной железы у взрослого человека колеблется от 15 до 30 г. Щитовидная железа снабжается кровью четырех артерий, причем интенсивность кровотока в ней значительно превосходит все другие, без исключения, органы и ткани. Через железу прокачивается крови около 300 мл/мин. Таким образом, практически вся кровь, которая циркулирует в нашем организме, проходит через щитовидную железу примерно за 17 мин. Доли железы покрывают крупные сосуды (общую сонную артерию, яремную вену), нервы (возвратные), околощитовидные железы и прилегают сзади к пищеводу.



Рис. 17.4. Анатомия щитовидной железы

Увеличение щитовидной железы, получившее название «зоб» (по аналогии с зобом у птиц), — признак многих нарушений ее функции. Его можно легко обнаружить при осмотре больного в виде припухлости шеи или пропальпировать при физикальном обследовании.

Щитовидная железа содержит три типа клеток, синтезирующих гормоны и гормонально активные вещества:

- А-клетки — фолликулярные клетки, вырабатывают два вида тиреоидных гормонов [трийодтиронин ( $T_3$ ) и тироксин ( $T_4$ )];
- В-клетки синтезируют серотонин и обладают высокой метаболической активностью;
- С-клетки — парафолликулярные, синтезируют кальцитонин, гормон, необходимый для нормального обмена кальция.



Для образования тиреоидных гормонов необходимы неорганический йод и аминокислота тирозин. Около 95% йода, содержащегося в организме человека, сконцентрировано в щитовидной железе. Йод поступает в организм с пищей и водой, всасывается в тонкой кишке и с кровью доставляется в щитовидную железу, где используется для синтеза трийодтиронина и тироксина. Баланс йода в организме подвержен значительным колебаниям. Избыточное количество его из организма выделяется с мочой (98%) и желчью (2%).

Синтез гормонов щитовидной железы происходит в фолликулярных клетках из аминокислоты тирозина. Йод включается в молекулу тирозина, образуя моно- и дийодтирозин. Соединение двух молекул дийодтирозина приводит к образованию тироксина ( $T_4$ ), а молекул моно- и дийодтирозина — трийодтиронина ( $T_3$ ). Синтезированные гормоны секретруются фолликулярными клетками в кровь. Однако около 80% трийодтиронина образуется не в щитовидной железе, а в периферических тканях (печень, почки) и осуществляется путем отщепления молекулы йода от тироксина ( $T_4$ ).

Тиреоидные гормоны тироксин и трийодтиронин в крови обратимо связаны со специфическим белком — тироксинсвязывающим глобулином. Когда содержание тиреоидных гормонов повышается, избыток связывается с другими белками — преальбумином и альбумином. Только 0,05% общего количества трийодтиронина и тироксина находятся в крови в свободной форме. Свободные гормоны отвечают за метаболический эффект (обладают метаболической активностью). В крови создается равновесие связанных гормонов и небольших количеств свободных гормонов. Белковосвязанные гормоны представляют своего рода депо гормонов, освобождающихся по мере необходимости.

## 17.4.2. МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ГОРМОНОВ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Тиреоидные гормоны влияют на различные метаболические процессы в организме. Трийодтиронин и тироксин играют важную роль в водно-электролитном и газовом обмене, стимулируя, прежде всего, поглощение кислорода и выделение углекислого газа. Непосредственное отношение они имеют и к белковому обмену. При недостаточном поступлении белков трийодтиронин и тироксин стимулируют их синтез, а при насыщении — усиливают распад. От состояния функции щитовидной железы зависят такие важные биологические процессы, как рост, развитие и дифференцировка тканей. Трийодтиронин

и тироксин (при адекватном уровне) стимулируют рост, оказывают положительное действие на регенеративные процессы, участвуют в регуляции жирового и углеводного обмена. Они увеличивают всасывание углеводов (глюкозы и галактозы) в кишечнике и утилизацию их в клетках, стимулируют распад гликогена, уменьшая его содержание в печени, снижают уровень холестерина в крови.

Тиреоидные гормоны оказывают влияние на работу сердца и ЦНС. Неадекватная продукция гормонов щитовидной железы приводит к нарушению роста и психического развития у детей.

### 17.4.3. РЕГУЛЯЦИЯ ФУНКЦИИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Концентрация тиреоидных гормонов в крови должна поддерживаться в определенных нормальных границах. Регулирование синтеза и секреции гормонов щитовидной железой осуществляется гипоталамусом и гипофизом. Гипоталамус вырабатывает ТРГ, или тиролиберин.

Функция щитовидной железы находится под контролем тиролиберина, секретлируемого гипоталамусом. ТРГ относят к группе гипоталамических гипофизотропных рилизинг-гормонов (образуется в серобугорных ядрах гипоталамуса), стимулирует синтез и освобождение ТТГ гипофизом (рис. 17.5). ТТГ — гликопротеин, выделяемый гипофизом. Он действует на щитовидную железу, стимулируя синтез тироксина ( $T_4$ ) и трийодтиронина ( $T_3$ ) и их выделение в кровь. Референтные величины содержания ТТГ в сыворотке крови у новорожденных составляют 1–39 мМЕ/л, у взрослых — 0,4–4,2 мМЕ/л.

В свою очередь, высвобождение ТРГ и ТТГ гипоталамусом и гипофизом контролируется концентрацией в крови трийодтиронина и тироксина. Как только их уровень в крови снижается, секреция ТРГ и ТТГ возрастает, стимулируя щитовидную железу к синтезу и секреции тиреоидных гормонов. В свою очередь, как только концентрация трийодтиронина и тироксина в крови повышается, секреция ТРГ и ТТГ снижается и соответственно уменьшается продукция тиреоидных гормонов. Этот постоянно действующий механизм, получивший название отрицательной обратной связи, поддерживает концентрацию тиреоидных гормонов в крови в нормальных границах.

Референтные величины тиреоидных гормонов в сыворотке крови:

- трийодтиронин — 1,08–3,14 нмоль/л;
- свободный трийодтиронин ( $cT_3$ ) — 4,0–7,4 пмоль/л;
- тироксин — 60–150 нмоль/л;
- свободный тироксин ( $cT_4$ ) — 9,0–26,0 пмоль/л.

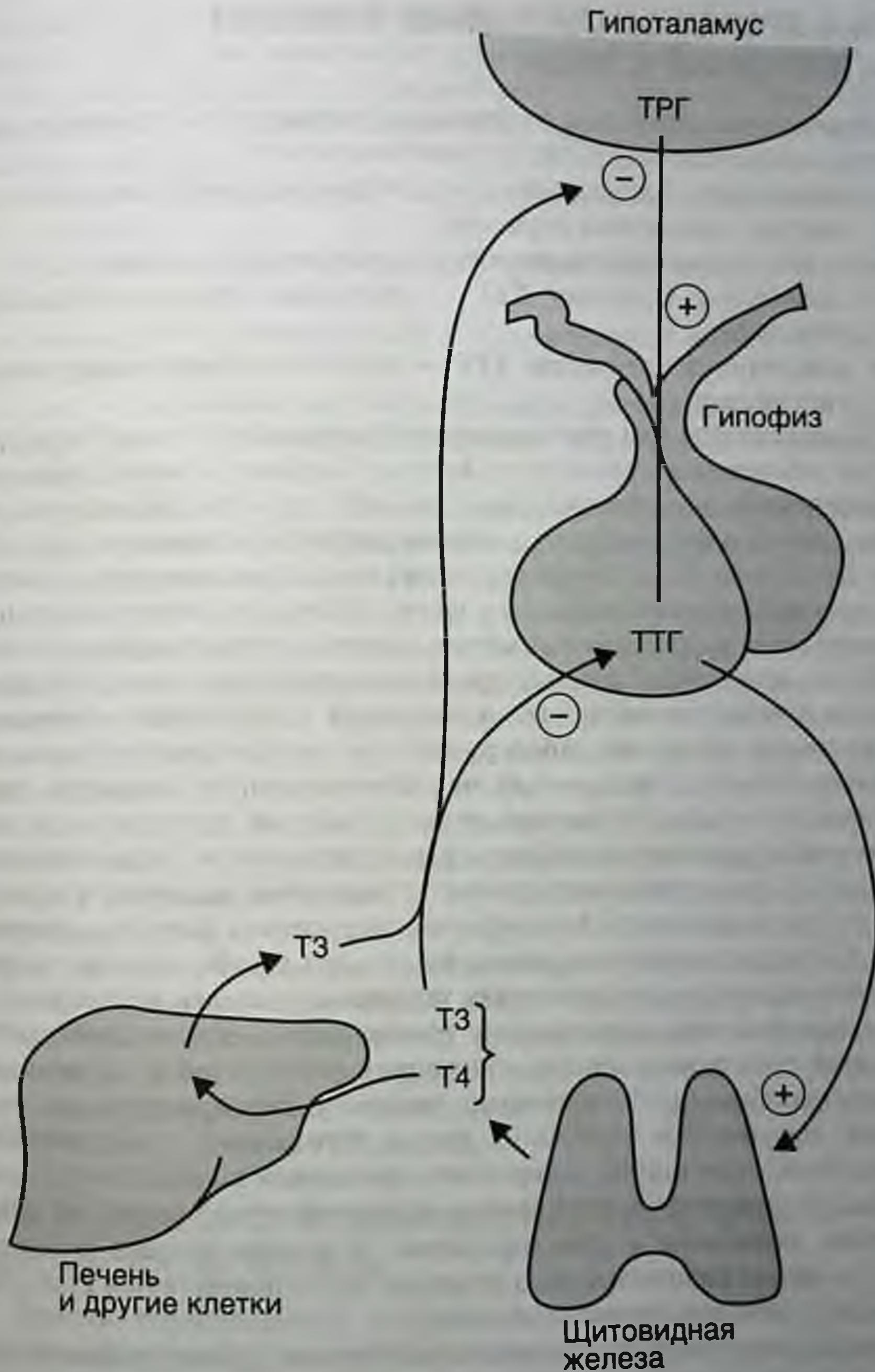


Рис. 17.5. Регуляция секреции гормонов щитовидной железы

#### 17.4.4. ПРИЧИНЫ НАРУШЕНИЙ ФУНКЦИИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Нормальная секреция тиреоидных гормонов и, следовательно, их нормальная концентрация в крови зависит от:

- адекватного поступления с пищей йода, который необходим для синтеза тиреоидных гормонов;
- нормального функционирования щитовидной железы;
- адекватной секреции ТТГ — нормально функционирующего гипофиза;
- адекватного количества ТРГ — нормально функционирующего гипоталамуса.

Недостаточное или чрезмерное поступление йода может быть причиной заболевания щитовидной железы. Здоровый человек нуждается в ежедневном поступлении примерно 150 мкг йода. Недостаток его в пищевых продуктах служит основной причиной возникновения зоба. При недостатке йода снижается синтез тироксина щитовидной железой, что повышает содержание в крови ТТГ по оси обратной отрицательной связи и приводит к развитию гиперплазии щитовидной железы и образованию зоба. Гиперплазированная щитовидная железа образует больше трийодтиронина, что клинически проявляется эутиреозом (отсутствием признаков заболевания) при низком уровне тироксина в крови. Помимо абсолютной недостаточности, не меньшую роль в генезе тиреоидной патологии играют факторы, приводящие к возникновению относительной йодной недостаточности. Такая патология возникает при поражении печени и желудочно-кишечного тракта, поступлении в организм йода в форме, затрудняющей его всасывание.

В большинстве случаев йододефицит дает о себе знать повышенной утомляемостью, сонливостью, ухудшением памяти и способности к сосредоточению, повышенной тревожностью, чрезмерной температурной чувствительностью, снижением умственной и физической работоспособности, постоянными запорами, подверженностью простудам, нарушением сердечного ритма, выпадением и истончением волос, ломкостью ногтей, ожирением, снижением количества грудного молока и быстрым прекращением лактации у кормящих женщин. Болезни, связанные с йододефицитом, в первую очередь угрожают тем, кто много работает и мало отдыхает, часто подвергается стрессам, неправильно и нерегулярно питается.

Чрезмерное употребление пищи с высоким содержанием йода и введение фармакологических доз йодидов в виде препаратов для лечения хронических легочных заболеваний в составе рентгеноконтрастных

препаратов могут приводить к развитию зоба, появлению симптомов недостаточности или повышенной функции щитовидной железы.

Для оценки функции щитовидной железы используют ряд терминов, значение которых медицинская сестра должна понимать и использовать в своей работе:

- эутиреоз (эутиреоидизм) — нормальная активность щитовидной железы;
- гипертиреоз (гипертиреоидизм) — повышенная активность щитовидной железы;
- гипотиреоз (гипотиреоидизм) — пониженная активность щитовидной железы;
- зоб — увеличение щитовидной железы (в зависимости от функции щитовидной железы может быть эу-, гипо- или гипертиреоидным);
- тиреотоксикоз — клинический синдром (совокупность клинических признаков), который развивается при гипертиреозе (нередко используют как синоним гипертиреоза);
- микседема — клинический синдром (совокупность клинических признаков), который развивается при выраженном гипотиреозе.

Повышенную функциональную активность щитовидной железы называют гипертиреозом. При данном состоянии секреция трийодтиронина и тироксина и, соответственно, их концентрация в крови повышена, а уровень ТТГ снижен. Гипертиреоз может быть вызван болезнью самой железы. В таком случае говорят о первичном гипотиреозе. Если повышенная функциональная активность щитовидной железы связана с высокой секрецией ТТГ гипофизом, то говорят о вторичном гипотиреозе, а если избыточной секрецией ТРГ гипоталамусом — о третичном гипотиреозе. Аналогичным образом сниженная функциональная активность щитовидной железы (гипотиреоз) может быть обусловлена повреждением самой железы (первичный гипотиреоз), снижением секреции ТТГ гипофизом (вторичный гипотиреоз) или ТРГ гипоталамусом (третичный гипотиреоз). При гипотиреозе продукция ТТГ снижена, а уровень ТТГ повышен.

### 17.4.5. ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Оценка гормонального статуса щитовидной железы позволяет определить три ее функциональных состояния: гипер-, гипофункция и эутиреоидное состояние. Определение в сыворотке крови концентрации ТТГ совместно со свободным тироксином ( $cT_4$ ) служит одним

из ведущих «стратегических» маркеров при оценке гормонального статуса щитовидной железы.

Уровень ТТГ в сыворотке крови — наиболее чувствительный индикатор функции щитовидной железы. Увеличение содержания ТТГ в сыворотке крови служит маркером при первичном гипотиреозе. Снижение его уровня или полное отсутствие — наиболее существенный индикатор первичного гипертиреоза. Совместное определение ТТГ и свободного тироксина имеет большое значение для подбора адекватной терапии, диагностированных нарушений функции щитовидной железы. Дозу препаратов тиреоидных гормонов, которые используют в лечении гипотиреоза, подбирают соответственно уровню ТТГ. Адекватное лечение сопровождается нормализацией его уровня. Определение свободного тироксина особенно важно для мониторинга лечения гипертиреоза, так как может потребоваться 4–6 мес для восстановления функции гипофиза. На этой стадии выздоровления уровень ТТГ может быть снижен несмотря на то, что содержание свободного тироксина нормально или понижено, и лечение гипертиреоза адекватно.

#### 17.4.5.1. ЭУТИРЕОИДНЫЙ (НЕТОКСИЧЕСКИЙ) ЗОБ

Зобом называют любое увеличение щитовидной железы. Простой зоб служит результатом «попытки» организма компенсировать сниженное образование тиреоидных гормонов. Если содержание свободного тироксина в крови снижается, секреция ТТГ по механизму обратной отрицательной связи возрастает. Это стимулирует синтез тироксина и трийодтиронина, поддерживая адекватный уровень гормона в крови. В результате увеличивается щитовидная железа (зоб), но гипотиреоз не развивается. Причинами таких изменений могут быть нарушение синтеза тиреоидных гормонов (снижение активности ферментов, катализирующих реакции синтеза гормона), недостаточность йода в организме (эндемический зоб), прием таких лекарственных препаратов, как парааминосалициловая кислота<sup>р</sup>, амиодарон (Кордарон<sup>ф</sup>), соли лития (медикаментозный зоб), поступление с пищей зобогенных веществ, таких как тиоцинаты и тиооксизолиды (содержатся в отдельных видах овощей). Довольно часто зоб развивается при длительном лечении гипотиреоза. Сочетание зоба и врожденной глухоты получило название синдрома Пендреда.

Простой зоб со временем становится многоузловым и имеет тенденцию к автономности функции, которая проявляется независимой от ТТГ продукцией и секрецией тиреоидных гормонов. Некоторые

узлы могут стать гиперфункционирующими, сопровождаясь гипертиреозом.

У больных с узловым или диффузным увеличением щитовидной железы без нарушения ее функции концентрация ТТГ в крови в нормальных пределах, иногда незначительно повышена. Уровни тироксина и трийодтиронина не изменяются. Однако содержание трийодтиронина и свободного трийодтиронина (сТ<sub>3</sub>) бывает заметно снижено при нормальном или высоком уровне свободного тироксина. Исследованиям уровня гормонов щитовидной железы в крови у больных с эутиреоидным зобом отводят важную роль в наблюдении за течением заболевания и эффективностью проводимого лечения.

### 17.4.5.2. ГИПЕРТИРЕОЗ (ТИРЕОТОКСИКОЗ)

Гипертиреоз, или тиреотоксикоз, развивается при избыточном образовании гормонов щитовидной железы (трийодтиронина и тироксина). Он бывает первичным — при повреждении самой щитовидной железы, а также вторичным (при заболеваниях гипофиза) или третичным (при заболеваниях гипоталамуса). Наиболее частая форма — первичный гипертиреоз. Выделяют три формы первичного гипертиреоза: диффузный токсический зоб (болезнь Грейвса, базедова болезнь), токсический узловой зоб и автономную аденому щитовидной железы.

Диффузный токсический зоб — аутоиммунное заболевание, которое встречаются у 1–2% взрослого населения, чаще у женщин. Щитовидная железа при диффузном токсическом зобе диффузно увеличена и функционально гиперактивна, что проявляется повышенной секрецией тиреоидных гормонов (трийодтиронина, тироксина и, соответственно, их свободных форм). В основе заболевания лежит постоянное образование иммунной системой патологических антител (аутоантител), которые действуют на щитовидную железу так же как ТТГ. В результате уровень трийодтиронина и тироксина в крови повышается. Однако в отличие от ТТГ, когда высокий уровень тиреоидных гормонов в крови по механизму обратной отрицательной связи угнетает его секрецию и функция щитовидной железы приходит в норму, аутоантитела никуда не исчезают и непрерывно стимулируют железу. Именно поэтому концентрация трийодтиронина и тироксина в крови постоянно повышена.

При диффузном токсическом зобе у больных в лабораторных анализах крови повышено содержание тироксина, свободного тироксина, трийодтиронина и снижена концентрация ТТГ. Лучшими тестами диагностики тиреотоксикоза считают определение в крови ТТГ, сво-

бодных тироксина и трийодтиронина, которые при совместном определении позволяют диагностировать до 100% случаев тиреотоксикоза.

Определение уровня свободного тироксина и ТТГ важно для контроля лечения заболевания. Цель терапии: снижение тиреоидных гормонов в крови до нормального уровня и ликвидация, таким образом, клинических проявлений заболевания, то есть достижение состояния клинического эутиреоза.

Для лечения больных диффузным токсическим зобом применяют три подхода. Большинство пациентов получает лечение антитиреоидными лекарственными средствами. При правильном подборе их дозировки концентрация свободного тироксина в крови должна поддерживаться на нормальном уровне. Чрезмерная блокада синтеза тиреоидных гормонов (уровень свободного тироксина в крови ниже нормы) может привести к выбросу ТТГ. Повышение уровня ТТГ в крови более 6,0 мМЕ/л свидетельствует о передозировке препарата и приводит к увеличению зоба. В процессе лечения определение концентрации свободного тироксина и ТТГ в крови необходимо выполнять регулярно каждые 4–6 нед. Достижение эутиреоидного состояния и уменьшение симптомов тиреотоксикоза служит показанием для перехода на поддерживающие дозы антитиреоидных препаратов. Стойкое сохранение эутиреоидного состояния и клинической ремиссии в течение 4–6 мес служит показанием для их отмены. Обычно ежедневный прием антитиреоидных препаратов в течение 12–18 мес приводит к излечению почти 50% больных. В отношении остальных 50% пациентов применяют лечение радиоактивным йодом или частичное хирургическое удаление тканей щитовидной железы.

Наиболее часто в лечении диффузного токсического зоба используют радиоактивный натрия йодид [ $^{131}\text{I}$ ], который, как и обычный йод, накапливается в щитовидной железе и вызывает разрушение ее ткани (в течение 2–3 мес). Исследование уровня ТТГ, свободного тироксина в крови важно для выбора терапевтической дозы, оценки эффективности лечения натрия йодидом [ $^{131}\text{I}$ ] и дальнейшего наблюдения за функцией щитовидной железы. Нормализация уровня свободного тироксина в крови через 2–3 нед считается показателем эффективности проведенного лечения. Увеличение уровня ТТГ в крови после проведенной терапии радиоактивным натрия йодидом [ $^{131}\text{I}$ ] в 2 раза и более (вне зависимости от клинической картины) служит основанием для назначения заместительной терапии левотироксином натрия (L-тироксинам<sup>®</sup>) для профилактики развития одного из частых осложнений этого лечения — гипотиреоза, который наблюдают в 1–10% случаев.



Менее часто первичный гипертиреоз встречается при узловом токсическом зобе и аденоме щитовидной железы. Почти у всех больных с выраженной клинической картиной заболевания в крови выявляют повышение свободного тироксина и сниженный уровень ТТГ.

Вторичный и третичный гипертиреоз — очень редкие состояния, при которых повышенная секреция тиреоидных гормонов вызвана неконтролируемой секрецией ТТГ (гипофиз) и ТРГ (гипоталамус). В большинстве случаев эти формы гипертиреоза обусловлены опухолью гипофиза или гипоталамуса. Щитовидная железа нормально реагирует на повышенную стимуляцию ТТГ — избыточной секрецией трийодтиронина и тироксина. Однако при опухолях гипофиза или гипоталамуса высокие концентрации трийодтиронина и тироксина в крови не могут подавить продукцию опухолью ТТГ или ТРГ. Типичные изменения в результатах лабораторных анализов при вторичном и третичном гипертиреозе — повышенная концентрация ТТГ, тироксина, свободного тироксина и трийодтиронина в сыворотке крови.

Клинически гипертиреоз проявляется:

- повышенной потливостью;
- потерей массы тела;
- повышением аппетита;
- тахикардией;
- сердцебиением;
- нервозностью;
- тремором рук;
- невозможностью сконцентрировать внимание;
- нарушениями менструального цикла;
- экзофтальмом (пучеглазием).

### 17.4.5.3. ГИПОТИРЕОЗ

Гипотиреоз может быть связан с первичным поражением непосредственно щитовидной железы (первичный), нарушением регуляции ее функции гипоталамо-гипофизарной системой (третичный и вторичный). В подавляющем большинстве случаев (90–95%) он обусловлен патологическим процессом в щитовидной железе, снижающим уровень продукции гормонов (первичный гипотиреоз). Первичный гипотиреоз встречаются сравнительно часто, примерно у 2–3% всего населения, и обусловлен уменьшением содержания в циркулирующей крови одного или обоих гормонов щитовидной железы. Это состояние наиболее широко встречаются у женщин, особенно в возрасте старше 45 лет. Дефицит свободных трийодтиронина или тироксина приводит к развитию клинической картины заболевания.

Наиболее частая причина первичного гипотироза — хронический аутоиммунный тиреоидит (тиреоидит Хасимото), заболевание, обусловленное генетическим дефектом иммунных клеток, что приводит к инфильтрации щитовидной железы макрофагами, лимфоцитами, плазматическими клетками. В результате этих процессов в щитовидной железе происходит образование антител к антигенам ткани железы. Взаимодействие антител с антигенами вызывает деструктивные изменения в фолликулярных клетках и ведет к снижению функции щитовидной железы. Вследствие этих процессов синтез и секреция тиреоидных гормонов снижаются. В процессе развития хронического аутоиммунного тиреоидита функция щитовидной железы претерпевает стадийные изменения с практически обязательным исходом в гипотиреоз.

Среди пациентов с аутоиммунным тиреоидитом преобладают больные с субклиническими формами заболевания, у которых показатели функции щитовидной железы (уровень ТТГ и свободного тироксина) обычно нормальные. Однако даже у клинически эутиреоидных больных уровень ТТГ может быть слегка или умеренно повышен. По мере прогрессирования недостаточности функции железы снижается концентрация в крови тироксина, а затем и трийодтиронина, а уровень ТТГ постепенно нарастает. В дальнейшем развивается клиника гипотиреоза с характерными лабораторными признаками — низкими значениями в крови свободного тироксина (тироксина, трийодтиронина) и повышенными — ТТГ.

Функциональное состояние щитовидной железы при аутоиммунном тиреоидите оценивают по уровню ТТГ и свободного тироксина в крови. Если уровень ТТГ находится в пределах 0,2–5 мМЕ/л, то это расценивают как эутиреоидное состояние. Повышение уровня ТТГ свыше 5 мМЕ/л при нормальной концентрации свободного тироксина расценивают как субклинический гипотиреоз, а повышение уровня ТТГ при снижении свободного тироксина — как манифестный гипотиреоз.

Клинически гипотиреоз проявляется:

- сухостью кожного покрова;
- увеличением массы тела;
- снижением аппетита;
- сонливостью;
- заторможенностью;
- непереносимостью холода;
- одутловатостью лица;
- брадикардией (редкие сердечные сокращения).

При первичном гипотиреозе в результатах лабораторных анализов могут быть следующие изменения:

- концентрация ТТГ в сыворотке крови повышена;
- концентрация тироксина в сыворотке крови снижена (может быть на нижней границе нормы на ранних стадиях болезни);
- концентрация свободного тироксина в сыворотке крови снижена (может быть на нижней границе нормы на ранних стадиях болезни).

Вторичный и третичный гипотиреоз развивается вследствие поражения гипофиза (травма, кровоизлияние в него, оперативное или лучевое лечение по поводу его аденомы) или гипоталамуса. Недостаточная секреция ТТГ гипофизом или ТРГ гипоталамусом приводит к низкой стимуляции щитовидной железы и снижению уровня тиреоидных гормонов в крови. Характерная особенность вторичного и третичного гипотиреоза — низкий уровень в сыворотке крови ТТГ на фоне сниженных концентраций свободного тироксина, тироксина, трийодтиронина.

Основной и единственный способ лечения первичного гипотиреоза — заместительная терапия препаратами щитовидной железы (левотироксином натрия). Таблетки необходимо принимать ежедневно и, как правило, всю жизнь. Цель лечения — повышение уровня трийодтиронина и тироксина в крови до нормального уровня. Это приводит к нормализации концентрации ТТГ в крови и ликвидации клинических проявлений гипотиреоза. Дозировка левотироксина натрия для достижения цели лечения для каждого пациента различна. Ее подбирают путем постепенного повышения с учетом результатов определения уровня ТТГ и свободного тироксина в крови. Эффективным считают лечение, при котором нормализуются уровни ТТГ и свободного тироксина в крови. Динамический контроль уровня ТТГ и свободного тироксина в крови позволяет подходить к подбору дозы заместительного препарата индивидуально. Уровень ТТГ, как правило, нормализуется медленно, особенно при длительно существующем гипотиреозе. После подбора оптимальной дозы гормонального препарата у больного необходимо ежегодно определять уровень ТТГ в крови. С возрастом потребность в гормонах щитовидной железы снижается, и дозу левотироксина натрия (L-тироксина\*) уменьшают в соответствии с уровнем ТТГ в крови. При подборе лечения рекомендуют поддерживать уровень ТТГ в крови в пределах от 0,5 до 1,5 мМЕ/л.

## 17.5. ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ НАДПОЧЕЧНИКОВ

Гипоталамус, передняя доля гипофиза и кора надпочечников функционально объединены в гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую систему.

Надпочечники представляют собой парный внебрюшинный орган, располагающийся на уровне XI—XII грудного позвонка. Правый надпочечник лежит несколько ниже левого. Задней поверхностью правый надпочечник прилегает к поясничной части диафрагмы, передней соприкасается с поверхностью печени и двенадцатиперстной кишкой, а нижней вогнутой — с верхним полюсом правой почки. Левый надпочечник передней поверхностью прилегает к хвосту поджелудочной железы, желудку, задняя его поверхность соприкасается с диафрагмой, а нижняя — с верхним полюсом левой почки. В среднем надпочечник имеет длину 45 мм, ширину — 25—30 мм, толщину — 6—10 мм. Суммарная масса обоих надпочечников колеблется в пределах 10—12 г. Правый надпочечник имеет пирамидальную форму, левая железа более сглажена и, как правило, принимает вид полумесяца.

Каждый надпочечник состоит из коры и мозговой части, выполняющих различные функции. Гистологически в коре надпочечников взрослого человека различают три слоя. На долю коркового слоя у взрослого человека приходится около 90% ткани надпочечника. Этот слой состоит из трех зон: наружной — клубочковой, средней — пучковой и внутренней (окружающей мозговой слой) — сетчатой. Располагаясь непосредственно под фиброзной капсулой, клубочковая зона занимает примерно 15% объема коркового слоя; ее клетки содержат сравнительно небольшое количество цитоплазмы и липидов, вырабатывают гормон альдостерон. На долю пучковой зоны приходится 75% всего коркового вещества; ее клетки богаты холестерином и его эфирами, вырабатывают в основном кортизол. Клетки сетчатой зоны также продуцируют кортизол и половые гормоны — андрогены и эстрогены.

В корковом слое надпочечников вырабатывается более 50 различных стероидных соединений. Он служит единственным источником глюко- и минералокортикоидов в организме, важнейшим источником андрогенов у женщин и играет незначительную роль в продукции эстрогенов и прогестинов. Основным глюкокортикоидом у человека служит кортизол. Избыток или недостаток этого гормона сопровождается существенными нарушениями всех видов обмена веществ. Из минералокортикоидов основной у человека — альдостерон. Избыток мине-

ралокортикоидов обуславливает артериальную гипертензию и гипокалиемию, а недостаток — гиперкалиемию, которые могут оказаться несовместимы с жизнью.

Мозговой слой надпочечников продуцирует соединения, далекие от гормонов по своей структуре, — катехоламины. К ним относят адреналин, норадреналин и дофамин.

### 17.5.1. БИОСИНТЕЗ ГОРМОНОВ НАДПОЧЕЧНИКОВ

Кора надпочечников — источник трех важнейших классов гормонов: глюко-, минералокортикоидов и половых. Основным представителем глюкокортикоидов в организме человека служит кортизол (80% всех глюкокортикоидов), минералокортикоидов — альдостерон.

Синтез стероидных гормонов в надпочечниках происходит из холестерина (рис. 17.6). В пучковой зоне коры надпочечников прегненолон, синтезированный из холестерина, преобразуется в 17- $\alpha$ -оксипрегненолон, служащий предшественником кортизола, андрогенов и эстрогенов. На пути синтеза кортизола из 17- $\alpha$ -оксипрегненолона образуется 17- $\alpha$ -оксипрогестерон, который последовательно гидроксилируется в кортизол.

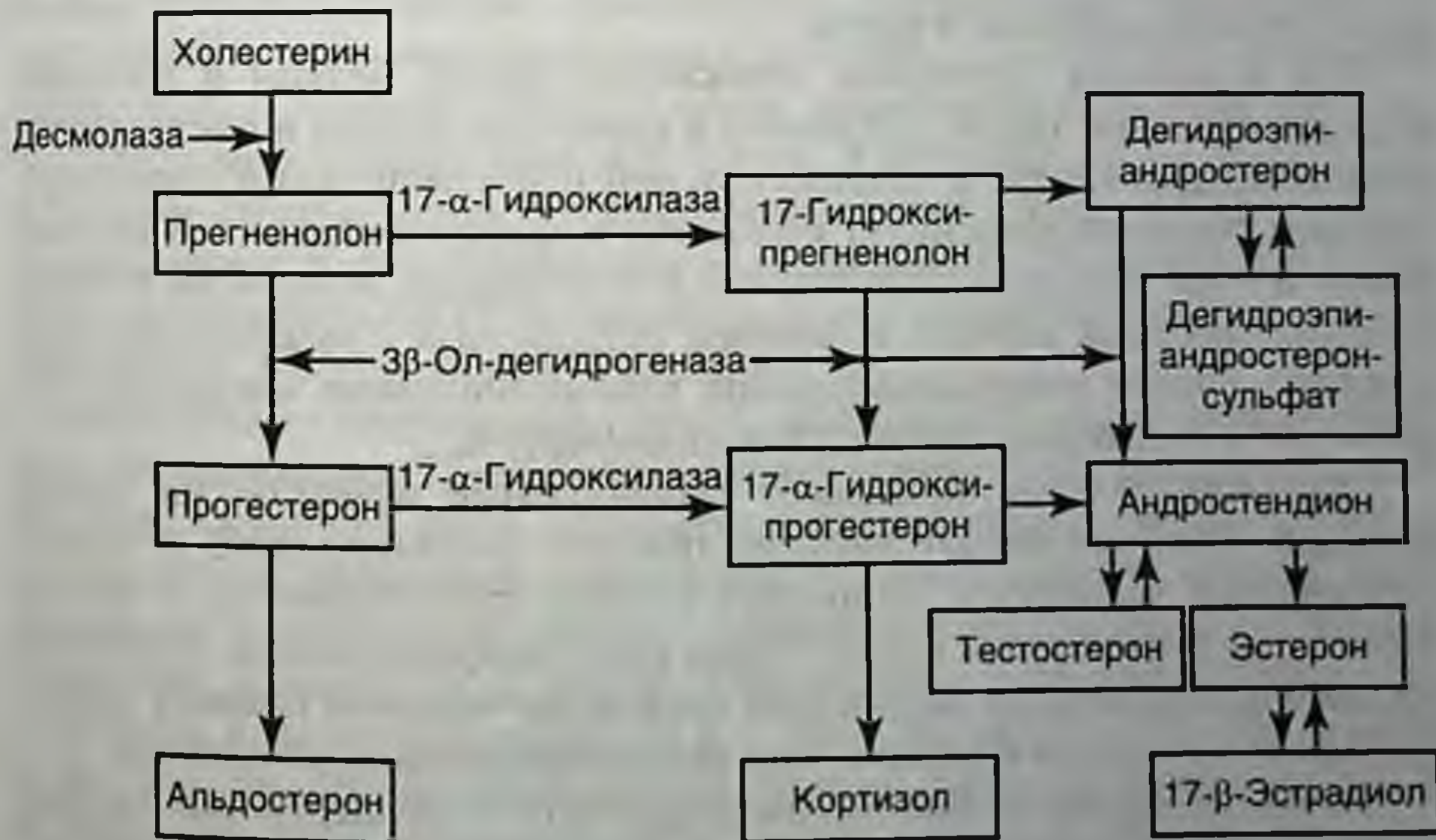


Рис. 17.6. Биосинтез половых стероидов в надпочечниках

К продуктам секреции коры надпочечников относят гормоны, обладающие андрогенной активностью: дегидроэпиандросте-

рон (ДГЭА), дегидроэпиандростерон-сульфат (ДГЭА-С), андростенедион (и его 11  $\beta$ -аналог) и тестостерон. Все они образуются из 17- $\alpha$ -оксипрегненолона. В количественном отношении главными андрогенами надпочечников считают ДГЭА и ДГЭА-С. Андрогенная активность надпочечниковых стероидов в основном обусловлена их способностью преобразовываться в тестостерон. В самих надпочечниках его образуется очень мало, равно как и эстрогенов (эстрона и эстрадиола).

## 17.5.2. МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ГОРМОНОВ НАДПОЧЕЧНИКОВ

Глюкокортикоиды обладают разнообразным действием на организм. Наиболее значительным следует считать влияние кортизола на углеводный обмен, в связи с чем и возникло наименование «глюкокортикоид», то есть глюкозакортикоид. Глюкокортикоидные гормоны стимулируют образование глюкозы в печени через процесс глюконеогенеза. В скелетных мышцах глюкокортикоиды ингибируют (тормозят) синтез гликогена и активируют его распад. Суммарный эффект влияния глюкокортикоидов на углеводный обмен выражается в повышении концентрации глюкозы в крови.

Под влиянием кортизола снижается синтез белков в мышцах и соединительной ткани, усиливается протеолиз белков и поступление аминокислот в кровь. В соединительной и костной ткани глюкокортикоиды тормозят биосинтез коллагена и фибронектика, что служит одной из причин сморщивания кожи и усиления резорбции (рассасывания) костной ткани с развитием остеопороза. Глюкокортикоиды угнетают синтез иммуноглобулинов плазматическими клетками, что приводит к снижению гуморального иммунитета.

Глюкокортикоиды оказывают своеобразные эффекты на обмен липидов. Они усиливают липолиз (распад триглицеридов) в тканях конечностей человека и липогенез (синтез триглицеридов) в других частях тела (туловище и лицо). Такая разнонаправленность обменных процессов в различных частях тела организма человека придает характерный вид больным с избыточной секрецией глюкокортикоидов.

Основная функция минералокортикоидов — поддержание баланса электролитов и жидкостей в организме человека. Альдостерон увеличивает реабсорбцию натрия из первичной мочи и одновременно — экскрецию ионов калия. Задержка натрия приводит к увеличению содержания воды в организме и повышению АД, а потеря калия — к развитию гипокалиемии.

Гормоны коры надпочечников играют важнейшую роль в поддержании постоянства внутренней среды, регуляции обменных процессов и функционального состояния различных органов и систем, а также в обеспечении адаптационных механизмов и защитных реакций организма.

#### 17.5.4. РЕГУЛЯЦИЯ ФУНКЦИИ НАДПОЧЕЧНИКОВ

Производство надпочечниковых глюкокортикоидов регулируется гипоталамо-гипофизарной системой. В гипоталамусе вырабатывается КРГ, попадающий через портальные сосуды в переднюю долю гипофиза, где он стимулирует продукцию АКТГ, который вызывает в корковом слое надпочечников быстрые и резкие сдвиги. В коре надпочечников АКТГ повышает скорость синтеза кортизола в надпочечниках. Эти гормоны (КРГ → АКТГ → свободный кортизол) связаны между собой классической петлей отрицательной обратной связи. Повышение уровня свободного кортизола в крови тормозит секрецию КРГ. Снижение уровня свободного кортизола в крови ниже нормы активирует систему, стимулируя высвобождение КРГ гипоталамусом.

АКТГ — гормон, выделяемый передней долей гипофиза под влиянием тропных факторов гипоталамуса, представляет собой пептид, состоящий из 39 аминокислотных остатков с молекулярной массой около 4500. Секреция АКТГ в кровь подвержена суточным ритмам, концентрация максимальна в 6 ч утра, а минимальна — около 22 ч. Сильным стимулятором его выделения служит стресс. АКТГ считают важнейшим стимулятором коры надпочечников. Референтные величины содержания АКТГ в сыворотке крови составляют: в 8 ч — менее 26 пмоль/л, в 22 ч — менее 19 пмоль/л.

Кортизол — стероидный гормон, выделяемый корой надпочечников. Он составляет 75–90% всех глюкокортикоидов, циркулирующих в крови. Основная часть кортизола в плазме крови связана с кортикостероид-связывающим глобулином, и только незначительная часть находится в свободной форме. Кортизол фильтруется в почечных клубочках и удаляется с мочой. Референтные величины содержания кортизола в сыворотке крови: в 8 ч — 200–700 нмоль/л (70–250 нг/мл), в 20 ч — 55–250 нмоль/л (20–90 нг/мл); разница между утренней и вечерней концентрацией >100 нмоль/л. При беременности концентрация кортизола повышается, нарушается суточный ритм его выделения.

Одновременное определение АКТГ и кортизола в крови играет важнейшую роль в диагностике заболеваний коры надпочечников.

17- $\alpha$ -Гидроксиprogестерон — стероид, предшественник кортизола, обладающий натрийуретическими свойствами. Гормон вырабатывается в основном в надпочечниках. 17- $\alpha$ -Гидроксиprogестерон в результате гидроксилирования превращается в кортизол. Референтные величины 17- $\alpha$ -гидроксиprogестерона в сыворотке приведены в табл. 17.2.

Таблица 17.2. Референтные величины 17- $\alpha$ -гидроксиprogестерона в сыворотке

Возраст	17- $\alpha$ -Гидроксиprogестерон, нмол/л
Дети, пубертатный возраст:	
мальчики	0,1–2,7
девочки	0,1–2,5
Женщины:	
фолликулиновая фаза	0,4–2,1
лютеиновая фаза	1,0–8,7
постменопауза	<2,1

Определение 17- $\alpha$ -гидроксиprogестерона в крови играет ведущую роль в диагностике адреногенитального синдрома, который сопровождается гиперпродукцией корой надпочечников гормонов одной группы и снижением секреции другой.

### 17.5.5. ПРИЧИНЫ НАРУШЕНИЙ ФУНКЦИИ НАДПОЧЕЧНИКОВ

Основной причиной нарушений функции надпочечников считают заболевания их коры, которые могут протекать или с гиперфункцией, когда секреция ее гормонов повышается (гиперкортицизм), или с гипофункцией при снижении секреции (гипокартицизм). Патологию, при которой определяют повышение секреции одних гормонов и снижение других, относят к группе дисфункций коры надпочечников.

При заболеваниях коры надпочечников выделяют следующие синдромы.

- Гиперкортицизм:

- ▶ болезнь Иценко–Кушинга — гипоталамо-гипофизарное заболевание (наиболее часто доброкачественная опухоль гипофиза);
- ▶ синдром Иценко–Кушинга — кортикостерома (доброкачественная или злокачественная опухоль коры надпочечников) или двусторонняя мелкоузловая дисплазия коры надпочечников.



- Гипокортицизм (недостаточность коры надпочечников):
  - ▶ первичный;
  - ▶ вторичный;
  - ▶ третичный.
- Дисфункция коры надпочечников — аденогенитальный синдром. Для оценки функционального состояния гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы определяют уровень АКТГ и кортизола в плазме, а для выявления аденогенитального синдрома — содержание 17- $\alpha$ -гидроксиprogестерона в плазме крови.

### 17.5.5.1. БОЛЕЗНЬ ИЦЕНКО–КУШИНГА

Болезнь Иценко–Кушинга — одно из наиболее тяжелых и сложных эндокринных заболеваний гипоталамо-гипофизарного происхождения. В основе большинства случаев болезни Иценко–Кушинга лежит доброкачественная аденома гипофиза. Она продуцирует большое количество АКТГ, что приводит к избыточной стимуляции коры надпочечников, синтезу повышенного количества кортизола и связанного с ним нарушения всех видов обмена. Высокая концентрация кортизола в крови не в состоянии подавить избыточную продукцию АКТГ опухолью гипофиза. Обратная отрицательная связь в функциональной системе гипоталамус → гипофиз → кора надпочечников (КРГ → АКТГ → кортизол) перестает работать, и развивается гиперплазия клеток (кортикотрофов) коры надпочечников.

Для болезни Иценко–Кушинга характерно одновременное увеличение содержания в крови АКТГ и кортизола, что определяют при проведении лабораторных исследований.

Синдром Иценко–Кушинга — заболевание, обусловленное добро- или злокачественной опухолью коры надпочечников либо двусторонней мелкоузелковой их дисплазией. При данном заболевании кора надпочечников секретирует избыточное количество кортизола. Однако функционирование в функциональной системе КРГ → АКТГ → кортизол не нарушено, поэтому высокий уровень кортизола в крови подавляет секрецию КРГ и АКТГ. В крови у больных с синдромом Иценко–Кушинга определяют низкую концентрацию АКТГ и высокую — кортизола.

Основной метод лечения болезни Иценко–Кушинга — оперативное удаление аденомы гипофиза. Об эффективности лечения будет свидетельствовать нормализация уровня АКТГ в крови. В случае неэффективности операции концентрация АКТГ в крови остается повышенной. Это служит показанием к повторной операции, вплоть до тотальной гипофизэктомии.

Хирургическое вмешательство с целью удаления гиперплазированных надпочечников (двусторонняя адреналэктомия) для лечения болезни Иценко—Кушинга в настоящее время применяют реже. После операции патологические следствия избыточной секреции глюкокортикоидов во многом подвергаются обратному развитию. Однако секреция АКТГ опухолью гипофиза после удаления надпочечников остается высокой. Больным с удаленными надпочечниками показана заместительная терапия препаратами глюкокортикоидов и регулярный контроль уровня АКТГ и кортизола в крови, что позволяет индивидуально регулировать дозу принимаемого препарата.

### 17.5.5.2. НЕДОСТАТОЧНОСТЬ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ

Недостаточность коры надпочечников, или гипокортицизм, может быть следствием повреждения патологическим процессом самих надпочечников (первичная), гипофиза (вторичная) или гипоталамуса (третья).

Первичную недостаточность коры надпочечников (болезнь Аддисона) наиболее часто встречают в клинической практике. Среди причин, приводящих к развитию первичной надпочечниковой недостаточности, различают следующие:

- аутоиммунное поражение надпочечников (нередко сочетается с аутоиммунным поражением других эндокринных желез — щитовидной, поджелудочной, паращитовидных желез, яичников и кожи);
- удаление надпочечников по поводу болезни Иценко—Кушинга и других заболеваний;
- бактериальные и грибковые инфекции (туберкулез, бластомиоз, гистоплазмоз, менингококковая инфекция, сепсис);
- амилоидоз;
- гемохроматоз;
- метастазы рака (чаще рака бронхов, молочной железы);
- осложнения при использовании различных лекарственных препаратов (антикоагулянты, блокаторы стероидогенеза в надпочечниках — аминоглутетимид, хлодитан<sup>®</sup>, кетоконазол; барбитураты, спиронолактон, рифампицин).

При первичной надпочечниковой недостаточности в результате деструктивных процессов в коре надпочечников снижается продукция глюко-, минералокортикоидов и андрогенов. Низкая концентрация кортизола в крови не оказывает тормозящего влияния на гипоталамус и гипофиз, в результате секреция КРГ и АКТГ повышается. Однако

повышенная секреция АКТГ вследствие повреждения надпочечников не способна обеспечить синтез адекватного количества кортизола и других гормонов, что приводит к нарушению всех видов обмена в организме.

Наиболее грозные симптомы болезни Аддисона обусловлены недостаточностью минералокортикоидов (альдостерона). Недостаточность альдостерона приводит к повышенной потере натрия и хлоридов с мочой. Первоначально выведение натрия сопровождается адекватными потерями воды, поэтому концентрация натрия в крови остается в пределах нормы. В дальнейшем уменьшение ОЦК приводит к стимуляции секреции АДГ, в результате чего реабсорбция воды увеличивается в большей степени, чем натрия, что приводит к развитию гипонатриемии. Длительное течение заболевания приводит к дегидратации и развитию гипотонии. Среди других нарушений водно-электролитного баланса определяют повышение уровня калия в крови и метаболический ацидоз.

Недостаточность глюкокортикоидов усугубляет водно-электролитные сдвиги и гипотензию, происходят глубокие изменения углеводного обмена:

- повышается чувствительность к инсулину, ослабевают процессы глюконеогенеза — в результате появляется тенденция к гипогликемии;
- угнетается синтез белка, снижается активность ферментов, тормозится эритро- и лейкопоэз (количество лимфоцитов увеличено).

Снижение продукции половых гормонов приводит к ослаблению анаболических процессов, особенно в мышцах (гипоплазия и атрофия), нарушению половых функций — импотенция у мужчин, нарушение менструального цикла у женщин.

При выраженной декомпенсации состояния больных с хронической надпочечниковой недостаточностью (в результате стресса, острой инфекции, хирургического вмешательства) может развиваться острая надпочечниковая недостаточность — аддисонический криз. Он развивается в течение нескольких суток или даже часов.

Наиболее частым лабораторным признаком первичной надпочечниковой недостаточности служат гипонатриемия и гиперкалиемия. У больных может также развиваться нормоцитарная нормохромная анемия, а в мазках периферической крови обнаруживают эозинофилию и лимфоцитоз.

Гормональная диагностика первичной надпочечниковой недостаточности основана на определении в крови гормонов гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси. При первичной недостаточности

коры надпочечников уровень АКТГ в крови значительно повышен — в 2–3 раза и более, а уровень кортизола снижен. Для первичной надпочечниковой недостаточности характерно и снижение концентрации альдостерона в крови.

**Вторичная и третичная надпочечниковая недостаточность** возникает в результате поражения гипоталамуса или гипофиза с последующим снижением продукции АКТГ. Поскольку АКТГ секретируется недостаточно, надпочечники не получают адекватного количества стимулов и перестают синтезировать глюкокортикоиды. Постепенно развивается гипоплазия или атрофия коры надпочечников. Обычно вторичная надпочечниковая недостаточность бывает врожденного или аутоиммунного происхождения. Наиболее частой причиной третичной недостаточности надпочечников служит длительное использование подавляющих доз глюкокортикоидов в лечении воспалительных или ревматических заболеваний. Вторичная и третичная надпочечниковая недостаточность часто сочетается с гипотиреозом, гипогонадизмом, а у молодых людей — и с отставанием в росте (следствие недостаточной секреции гормона роста).

Содержание АКТГ в крови при вторичной надпочечниковой недостаточности снижено в отличие от первичной. Одновременно определяют низкие концентрации кортизола в крови.

### 17.5.5.3. АДРЕНОГЕНИТАЛЬНЫЙ СИНДРОМ

В основе адреногенитального синдрома лежит наследственный дефицит различных ферментов, участвующих в биосинтезе стероидных гормонов. Различают несколько форм адреногенитального синдрома, клинические проявления которых зависят от дефицита конкретного фермента: 21-гидроксилазы, 11 $\beta$ -гидроксилазы, 3 $\beta$ -оксидегидрогеназы, P<sub>450</sub>SCC (20,22-десполаза), 17-гидроксилазы (см. рис. 17.6). Общим для всех форм адреногенитального синдрома считают нарушение синтеза кортизола, регулирующего секрецию АКТГ по принципу механизма обратной отрицательной связи.

Снижение содержания кортизола в крови способствует усиленному выделению передней долей гипофиза АКТГ, что ведет к гиперфункции надпочечников, их гиперплазии и увеличению секреции стероидных предшественников, из которых синтезируются андрогены. Однако большое количество андрогенов не в состоянии по принципу обратной связи уменьшить выделение гипофизом АКТГ. В результате в коре надпочечников накапливается избыточное количество 17- $\alpha$ -гидроксипрогестерона, как из-за недостаточ-

ного его превращения в кортизол, так и вследствие усиленного его образования.

Наиболее часто (80–95% всех случаев) обнаруживают недостаточность 21-гидроксилазы, которая необходима для превращения 17- $\alpha$ -гидроксиprogестерона в 11-дeзoксикортизол и далее в кортизол. У каждой третьей больной с этим типом ферментного дефекта наблюдают грубые нарушения синтеза кортизола и недостаточный синтез альдостерона. Клинически это выражается в синдроме потери соли. Организм не способен удерживать натрий, в результате чего наступает потеря его с мочой, дегидратация, коллапс. Дети обычно умирают в первые недели жизни.

Пренатальная диагностика основана на определении 17- $\alpha$ -гидроксиprogестерона в амниотической жидкости, так как надпочечники плода начинают функционировать на 3-м месяце внутриутробного развития. Постнатальная диагностика основана на определении 17- $\alpha$ -гидроксиprogестерона в крови новорожденного. Высокий его уровень в крови или амниотической жидкости свидетельствует о наличии у больного адреногенитального синдрома.

Менее тяжелая форма недостаточности 21-гидроксилазы (неклассическая форма адреногенитального синдрома) имеет более поздние клинические проявления — в период полового созревания или позднее. При данной клинической форме заболевания повышение уровня 17- $\alpha$ -гидроксиprogестерона в крови не столь выражено, как при классической форме, а иногда вообще отсутствует.

## 17.6. ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ

Репродуктивная система характеризуется только ей присущей функцией — обеспечением репродуктивного процесса (вынашивание и рождение ребенка). Она состоит из конкретных структурных элементов: определенных структур гипоталамуса и гипофиза, гонад (яичников у женщин и яичек — у мужчин), органов-мишеней (маточные трубы, матка и др.). Элементы репродуктивной системы связаны между собой гормональной регуляцией, что позволяет ей функционировать как единое целое.

Гормональные механизмы регуляции репродуктивной системы сложны. Они включают гипоталамус, который синтезирует и секретирует ГРГ. Он стимулирует продукцию двух гормонов гипофиза — ЛГ и ФСГ, которые оказывают стимулирующее воздействие на гонады.

Гонады в ответ вырабатывают половые гормоны, которые оказывают тормозящее влияние на секрецию гонадотропных гормонов. Таким образом, гормональные механизмы регуляции репродуктивной системы обеспечивают состояние физиологического равновесия между гонадотропинами плазмы и половыми стероидами.

### 17.6.1. ГОРМОНЫ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ

Важнейшая роль в регуляции репродуктивной системы отводится гормонам, которых классифицируют по их химическому строению и месту секреции. Точное определение концентрации этих гормонов в биологических жидкостях человека имеет огромное значение для оценки функционального состояния гормональных систем регуляции репродуктивной системы и диагностики заболеваний, вызывающих их нарушения. Определение содержания гормонов широко используют для установления причин как женского, так и мужского бесплодия, при которых во многих случаях на 1-м месте стоит нарушение гормональной регуляции.

**Классификация гормонов репродуктивной системы по месту синтеза**

- **Гипоталамус:** ГРГ, пролактин-рилизинг гормон, гонадотропин-рилизинггибирующий гормон (ГРИГ), пролактин-рилизинггибирующий гормон (ПРИГ).
- **Гипофиз:** ЛГ (лютропин), ФСГ (фоллитропин), пролактин.
- **Яичники:** эстрогены, гестагены, андрогены.
- **Плацента:** эстрогены, гестагены, хорионический гонадотропин (ХГ), пролактин.
- **Семенники:** андрогены.
- **Кора надпочечников:** андрогены, эстрогены.

Далее рассмотрены отдельные группы гормонов по их происхождению, химической природе и физиологическим функциям.

#### 17.6.1.1. ГОНАДОТРОПИН-РИЛИЗИНГ ГОРМОН И ГОНАДОТРОПИНЫ

Гонадотропин-рилизинг гормон, или гонадолиберин, представляет собой полипептид, который синтезируется в клетках гипоталамуса. В передней доле гипофиза ГРГ стимулирует синтез и освобождение ЛГ и ФСГ. Органом-мишенью ГРГ служит передняя доля гипофиза.

Гонадотропины — ФСГ и ЛГ, гликопротеины, секретируемые клетками передней доли гипофиза под действием гипоталамического рилизинг-фактора. Органами-мишенями служат гонады (яичники у женщин и яички у мужчин). Регуляция секреции ФСГ и ЛГ осуществляется по типу обратной отрицательной связи. У мужчин высокий уровень

тестостерона в крови оказывает угнетающее действие на секрецию ЛГ. Регуляция секреции гонадотропинов у женщин гораздо сложнее, поэтому она будет рассмотрена ниже (см. раздел «Гормональная регуляция менструального цикла»). В течение менструального цикла у женщин концентрации гормонов в крови подвержены определенным ритмическим изменениям. Менструальный цикл имеет продолжительность 28+4 дня; различают:

- фолликулиновую (фолликулярную) фазу, которая включает все стадии созревания фолликула;
- фазу овуляции;
- заключительную лютеиновую фазу, то есть стадию цикла, продолжающуюся от овуляции до момента децидуации эндометрия и таким образом отражающую полный период жизни желтого тела.

Началом менструального цикла считают 1-й день менструального кровотечения.

**Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ)** — пептидный гормон, выделяемый передней долей гипофиза. У женщин он контролирует рост фолликулов до наступления их зрелости и готовности к овуляции. Совместное действие ФСГ и ЛГ стимулирует синтез гранулезными клетками фолликулов эстрадиола. У мужчин ФСГ контролирует рост и функцию семенных канальцев, в особенности сперматогенез в клетках Сертоли. Содержание ФСГ в сыворотке в норме представлено в табл. 17.3.

Таблица 17.3. Референтные величины фолликулостимулирующего гормона в сыворотке

Возраст	ФСГ, МЕ/л
Дети младше 11 лет	0,3–6,7
Женщины:	
фолликулиновая фаза	1,37–10
фаза овуляции	6,17–17,2
лютеиновая фаза	1,09–9,2
период менопаузы	19,3–100,6
Мужчины	1,42–15,4

Изменения концентрации ФСГ в течение нормального менструального цикла приведены на рис. 17.7. В начале цикла уровень ФСГ выше, чем в заключительных стадиях менструального цикла. Пик концентрации гормона наблюдают в середине цикла одновременно с овуляторным пиком ЛГ. После овуляции уровень ФСГ падает и вновь достигает значений, наблюдаемых в ранних стадиях фолликулиновой фазы к концу цикла.

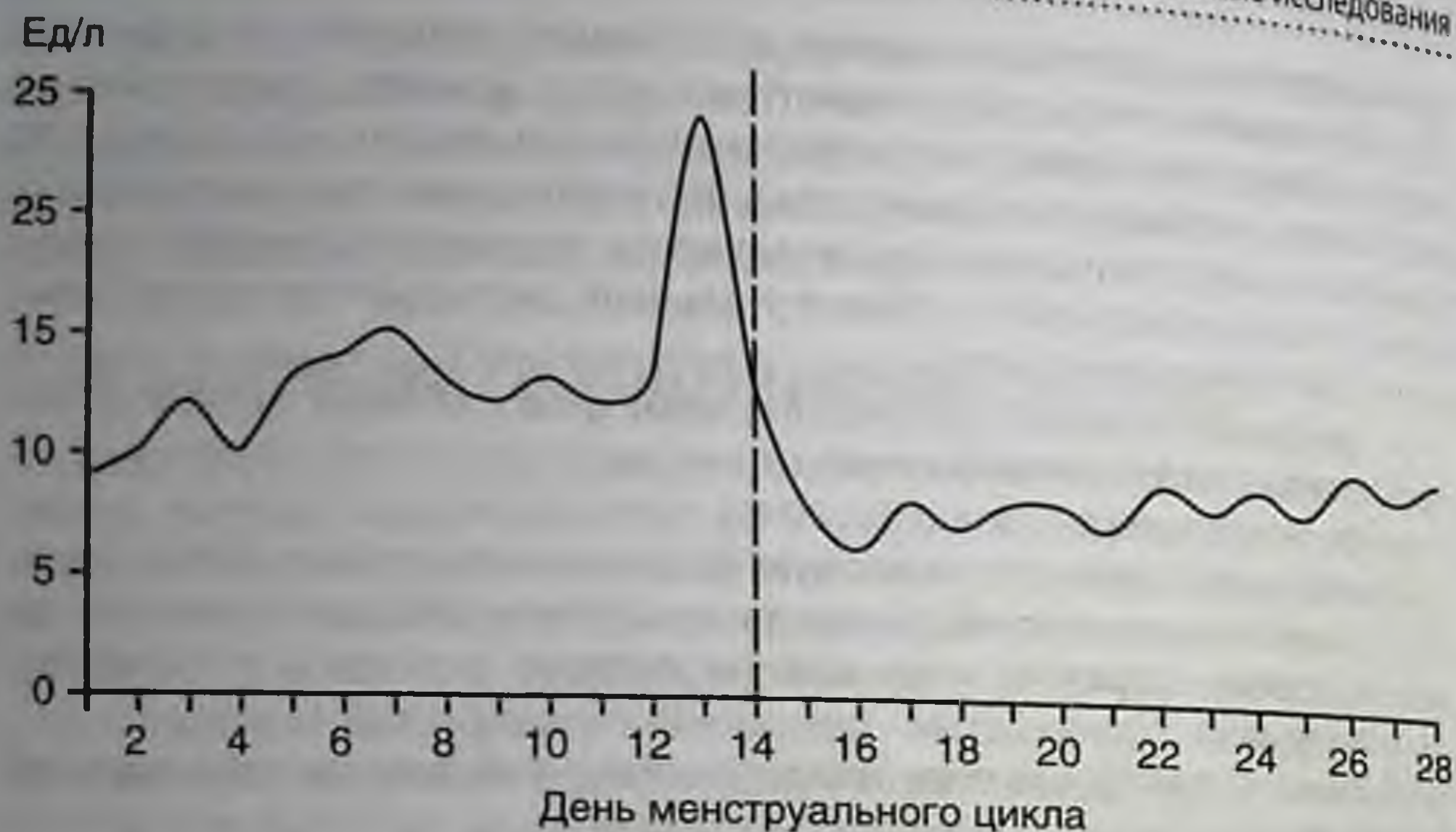


Рис. 17.7. Изменение концентрации фолликулостимулирующего гормона в течение нормального менструального цикла

**Лютеинизирующий гормон (ЛГ)** — пептидный гормон передней доли гипофиза. Мишенями ЛГ у женщин служат клетки оболочки яичника и желтое тело. Он стимулирует овуляцию и активизирует в клетках яичников синтез эстрогенов и прогестерона, активизирует синтез тестостерона в клетках Лейдига семенников у мужчин. Референтные величины ЛГ в крови приведены в табл. 17.4.

Таблица 17.4. Референтные величины лютеинизирующего гормона в крови

Возраст	ЛГ, МЕ/л
Дети младше 11 лет	0,03–3,9
Женщины:	
фолликулиновая фаза	1,68–15
фаза овуляции	21,9–56,6
лютеиновая фаза	0,61–16,3
период менопаузы	14,2–52,3
Мужчины	1,24–7,8

Изменения концентрации ЛГ в течение нормального менструального цикла отражены на рис. 17.8. В течение менструального цикла уровень ЛГ остается низким, за исключением его подъема в середине цикла. Овуляция происходит примерно 12–20 ч спустя после достижения максимальной концентрации ЛГ.



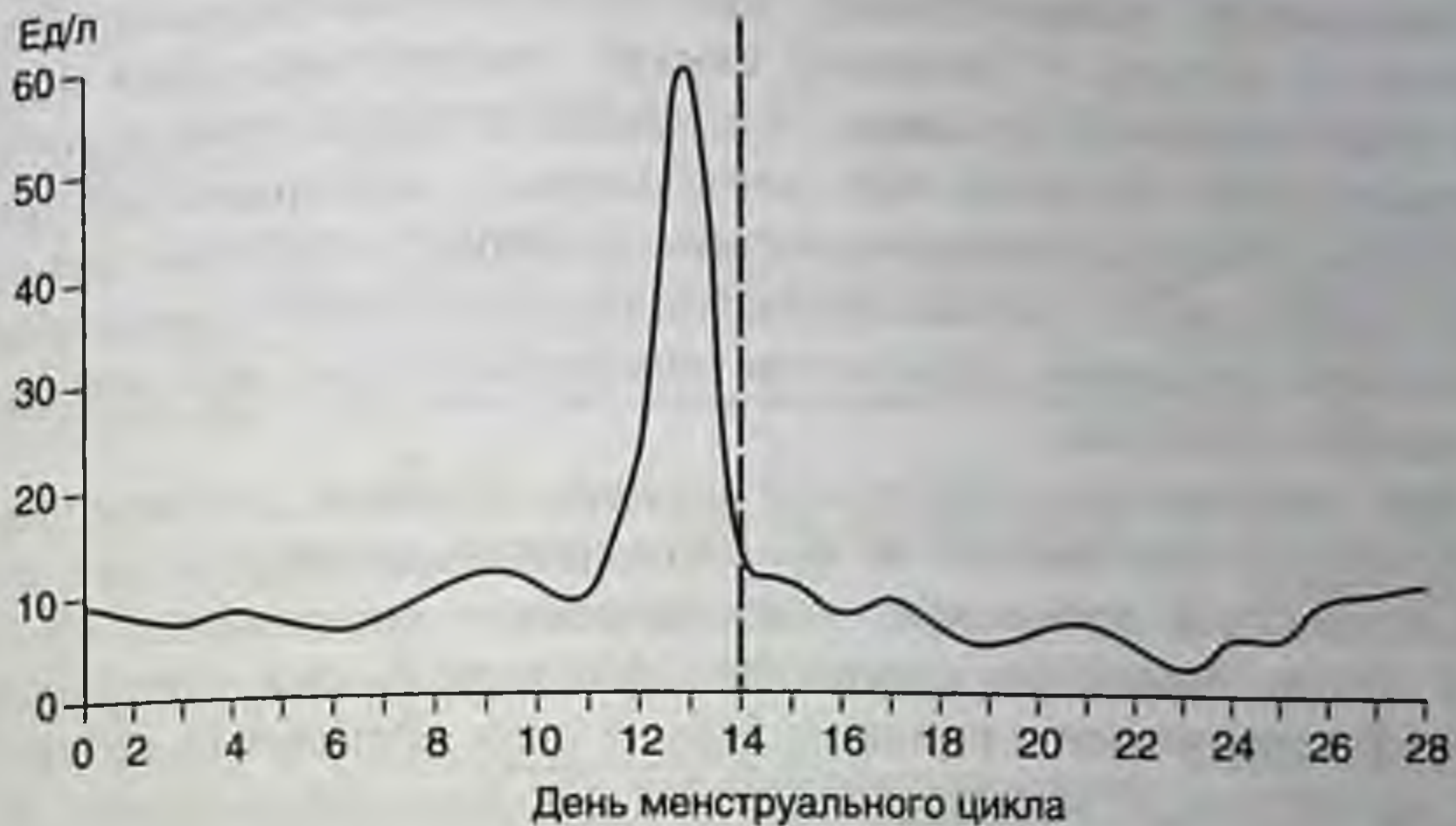


Рис. 17.8. Изменение концентрации лютеинизирующего гормона в течение нормального менструального цикла

**Пролактин** — гормон передней доли гипофиза. Его синтез и освобождение находится под стимуляционно-ингибиторным влиянием гипоталамуса. Гормон секретируется эпизодически. Органом-мишенью для пролактина служит молочная железа, развитие и дифференциация которой стимулируются этим гормоном. В период беременности концентрация пролактина повышается под влиянием усиленного образования эстрогена и прогестерона. Стимулирующее воздействие пролактина на молочную железу приводит к послеродовой лактации. Концентрация пролактина в крови увеличивается во время сна, физических упражнений, гипогликемии, лактации, беременности.

Высокие концентрации пролактина оказывают ингибирующее действие на синтез половых гормонов в яичниках, образование и секрецию ФСГ и ЛГ гипофизом. У мужчин функция его не известна. Референтные величины пролактина в крови представлены в табл. 17.5.

Таблица 17.5. Референтные величины пролактина в сыворотке

Возраст	Пролактин, мМЕ/л
Дети до 10 лет	91–526
Женщины	61–512
Беременность:	
12 нед	500–2000
12–28 нед	2000–6000
29–40 нед	4000–10000
Мужчины	58–475

Повышение концентрации пролактина (гиперпролактинемия) в крови (у мужчин и женщин) служит главной причиной нарушения репродуктивной функции. Исследование пролактина используют в клинической практике при нерегулярных менструальных циклах у женщин, гиперпролактинемической аменорее (отсутствии менструаций), гинекомастии и азооспермии (полное отсутствие сперматозоидов в семенной жидкости). Пролактин определяют также при подозрении на опухоли гипофиза.

При определении пролактина следует помнить, что выявленная концентрация его зависит от времени взятия крови, так как секреция пролактина происходит эпизодически и подчиняется 24-часовому циклу. Выделение пролактина физиологически стимулируется грудным кормлением и стрессом. Кроме того, повышение концентраций пролактина в сыворотке вызывает ряд фармацевтических препаратов (например, дибензодиазепины, производные фенотиазина), ТРГ и эстрогены. Секрецию пролактина подавляют производные дофамина, L-дофы и эрготамина.

### 17.6.1.2. ПОЛОВЫЕ СТЕРОИДЫ

По биологическому действию, а также последовательности и количеству углеродных атомов (18, 19, 21) в их молекулах половые стероиды делят на три основные группы:

- $C_{18}$  — эстрогены с основным представителем — эстрадиолом;
- $C_{19}$  — андрогены с основным представителем — тестостероном;
- $C_{21}$  — гестагены с основным представителем — прогестероном.

В женском организме местом синтеза наиболее важных половых стероидов (то есть эстрогенов, гестагенов и андрогенов) служат яичники и кора надпочечников, а во время беременности — плацента. Принципиальные половые стероиды для мужского организма — андрогены, которые синтезируются в яичках и, в небольшом количестве, коре надпочечников. Биосинтез половых стероидов в яичниках и яичках представлен на рис. 17.9.

Все половые стероиды и гормоны коры надпочечников являются производными холестерина. Стероиды липофильны, это означает их низкую способность растворяться в воде. Именно поэтому в крови 95% стероидных гормонов находятся в связанном состоянии со специфическими транспортными белками. С помощью транспортных белков гормоны переносятся к своим органам-мишеням. Только свободные, не связанные с белком стероиды, являются биологически активными. Стероид-связывающий глобулин специфично связывает эстрадиол

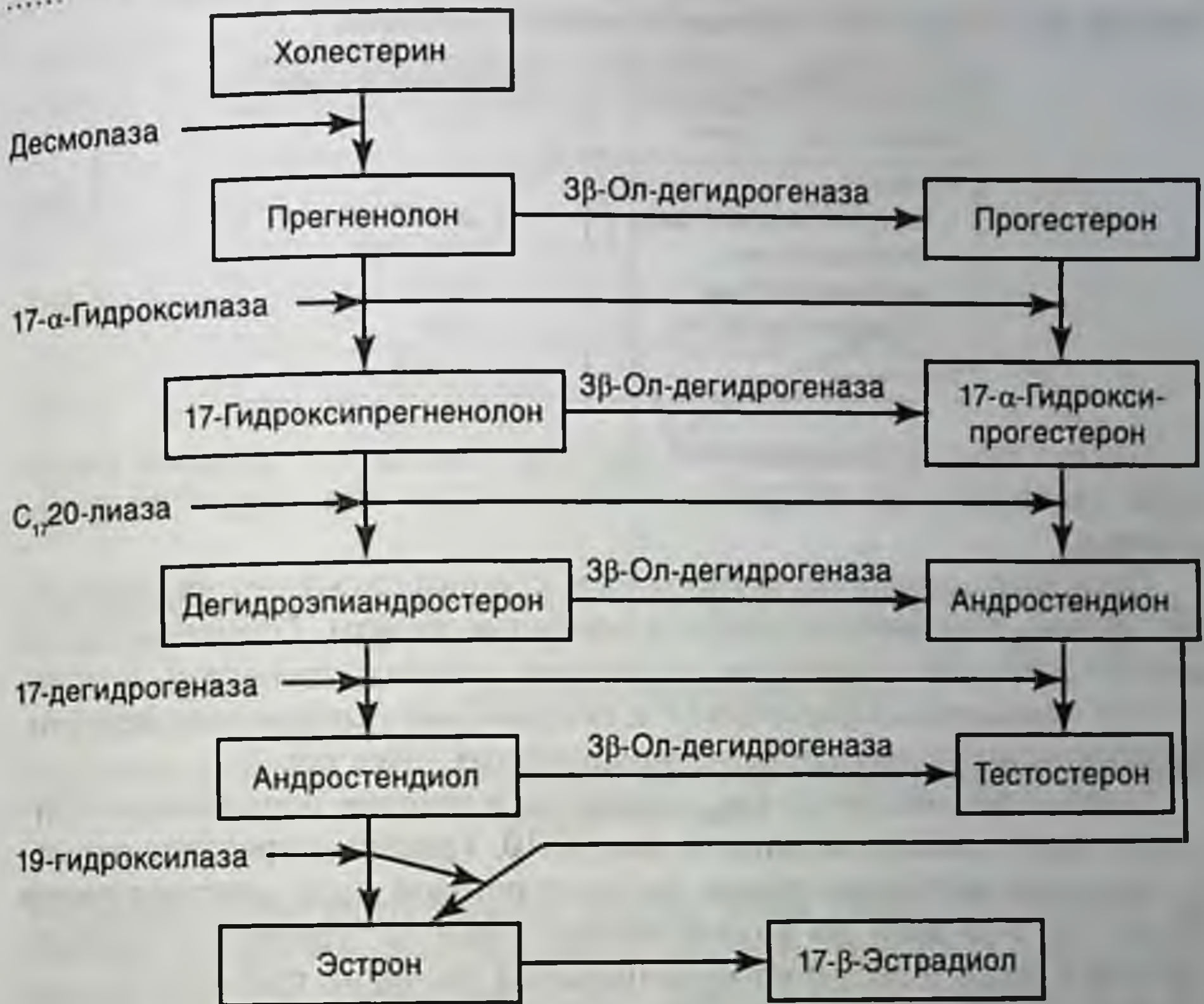


Рис. 17.9. Биосинтез половых стероидов

и андрогены, в то время как кортикостероид-связывающий глобулин связывает прогестерон и глюкокортикоиды. Помимо своей транспортной функции, гормонсвязывающие белки защищают стероиды от метаболической инактивации по пути от секретирующей железы к органу-мишени. Далее рассмотрены все три основных группы половых стероидов.

**Эстрогены.** Главным представителем эстрогенов является эстрадиол, который обладает наивысшей биологической активностью и продуцируются главным образом гранулезными клетками яичника. Секреция эстрогенов усиливается в ответ на выход ФСГ из гипофиза. В гипоталамусе и гонадотрофах передней доли гипофиза возросший уровень эстрадиола в крови подавляет секрецию ГРГ и ФСГ. Определение концентрации эстрадиола необходимо для оценки функции яичников. Референтные величины эстрадиола в крови приведены в табл. 17.6.

Таблица 17.6. Референтные величины эстрадиола в сыворотке

Возраст	Эстрадиол, пг/мл
Дети младше 11 лет	<15
Женщины:	
фолликулиновая фаза	20–350
фаза овуляции	150–750
лютеиновая фаза	30–450
период менопаузы	<20
Мужчины	10–50

Достоверных подтверждений наличия секреции эстрогенов в мужском организме не обнаружено, обычно они образуются из тестостерона.

Органами-мишенями эстрогенов у женщин служат матка, влагалище, вульва, фаллопиевы трубы и молочные железы. Гормоны данной группы отвечают за развитие вторичных половых признаков и определяют характерные физические и психические особенности женщин. Эстрогены вызывают закрытие эпифизарных точек роста.

Изменения концентрации эстрадиола в течение нормального менструального цикла отражены на рис. 17.10. Уровень эстрадиола остается низким в начале и середине фолликулиновой фазы менструального цикла. За 3–5 дней до возникновения пика ЛГ уровень эстрадиола начинает расти и достигает максимальных значений примерно за 12 ч до пика ЛГ. После резкого падения до наименьших значений, наблюдаемых спустя 48 ч после пика ЛГ, уровень эстрадиола начинает снова подниматься. Максимальная концентрация достигается на 9-й день после овуляции, и затем к концу цикла концентрация гормона вновь падает по мере атрезии желтого тела.

При заболеваниях уровень эстрадиола в крови может быть снижен, повышен или не изменен. Низкие уровни эстрадиола характерны для заболеваний гипоталамуса или гипофиза; высокие уровни наблюдаются при эстроген-секретирующих опухолях или фолликулярных кистах яичников. В таких случаях избыток эстрадиола добавляет секрецию ЛГ и ФСГ, приводя к ановуляции.

**Гестагены** продуцируются в яичниках, яичках, коре надпочечников, а во время беременности — плацентой. Действие гестагенов направлено на осуществление нормальной репродуктивной функции организма. Основным представителем этой группы гормонов является прогестерон.

Прогестерон — женский стероидный гормон, способствует пролиферации слизистой оболочки матки, облегчает имплантацию оплодо-

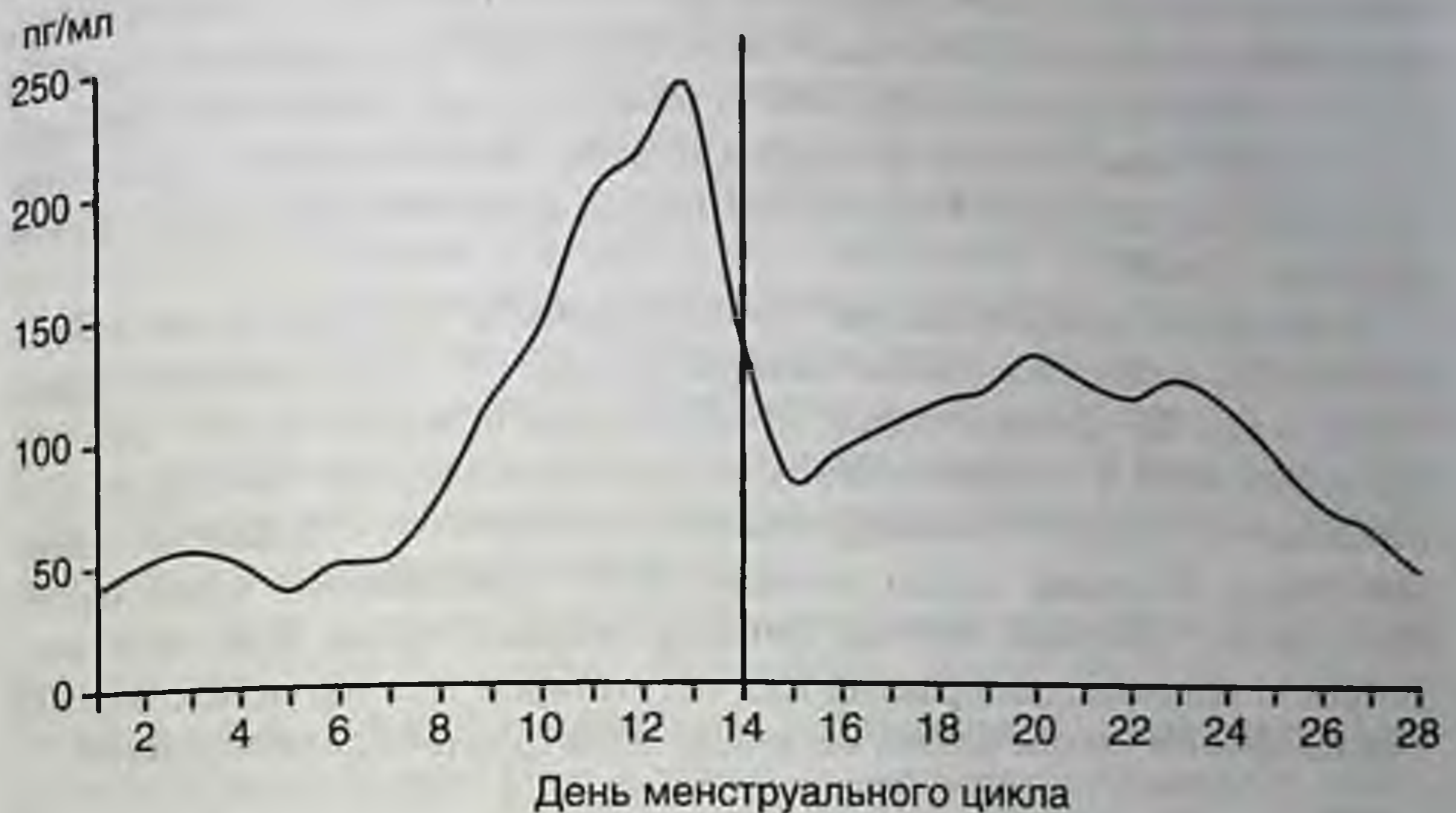


Рис. 17.10. Изменение концентрации эстрадиола в течение нормального менструального цикла

творенного яйца, синтезируется желтым телом. После оплодотворения главным его источником становится плацента. Измерение концентрации прогестерона в крови проводят с целью подтверждения или исключения овуляции во время менструального цикла. Референтные величины прогестерона в сыворотке представлены в табл. 17.7.

Таблица 17.7. Референтные величины прогестерона в сыворотке

Возраст	Прогестерон, нмоль/л
Женщины:	
фолликулиновая фаза	0,5–2,2
фаза овуляции	3,1–7,1
лютеиновая фаза	6,4–79,5
период менопаузы	0,06–1,3
Беременность:	
9–16 нед	32,6–139,9
16–18 нед	62,0–262,4
28–30 нед	206,7–728,2
предродовой период	485,8–1104
Мужчины	0,4–3,1

Главным органом-мишенью прогестерона служит матка. Гормон вызывает секреторную трансформацию пролиферативно утолщенного

эндометрия, тем самым обеспечивая его готовность к имплантации оплодотворенной яйцеклетки. Более того, прогестерон несет важную контрольную функцию в системе гонадотропины—гонадные стероиды и вызывает стимуляцию теплового центра. Это вызывает повышение температуры тела на  $0,5^{\circ}\text{C}$  в лютеиновую фазу менструального цикла после овуляции.

Изменения концентрации прогестерона в течение нормального менструального цикла представлены на рис. 17.11. До момента окончания пика ЛГ концентрация прогестерона остается крайне низкой. Одновременно с эстрадиолом уровень прогестерона начинает подниматься во вторую половину цикла. Это означает, что лютеинизация завершена. К концу цикла концентрация прогестерона снова падает и достигает значений первой, фолликулиновой фазы, в которой воздействие желтого тела практически отсутствует. Данное резкое падение концентрации прогестерона вызывает менструальное кровотечение.

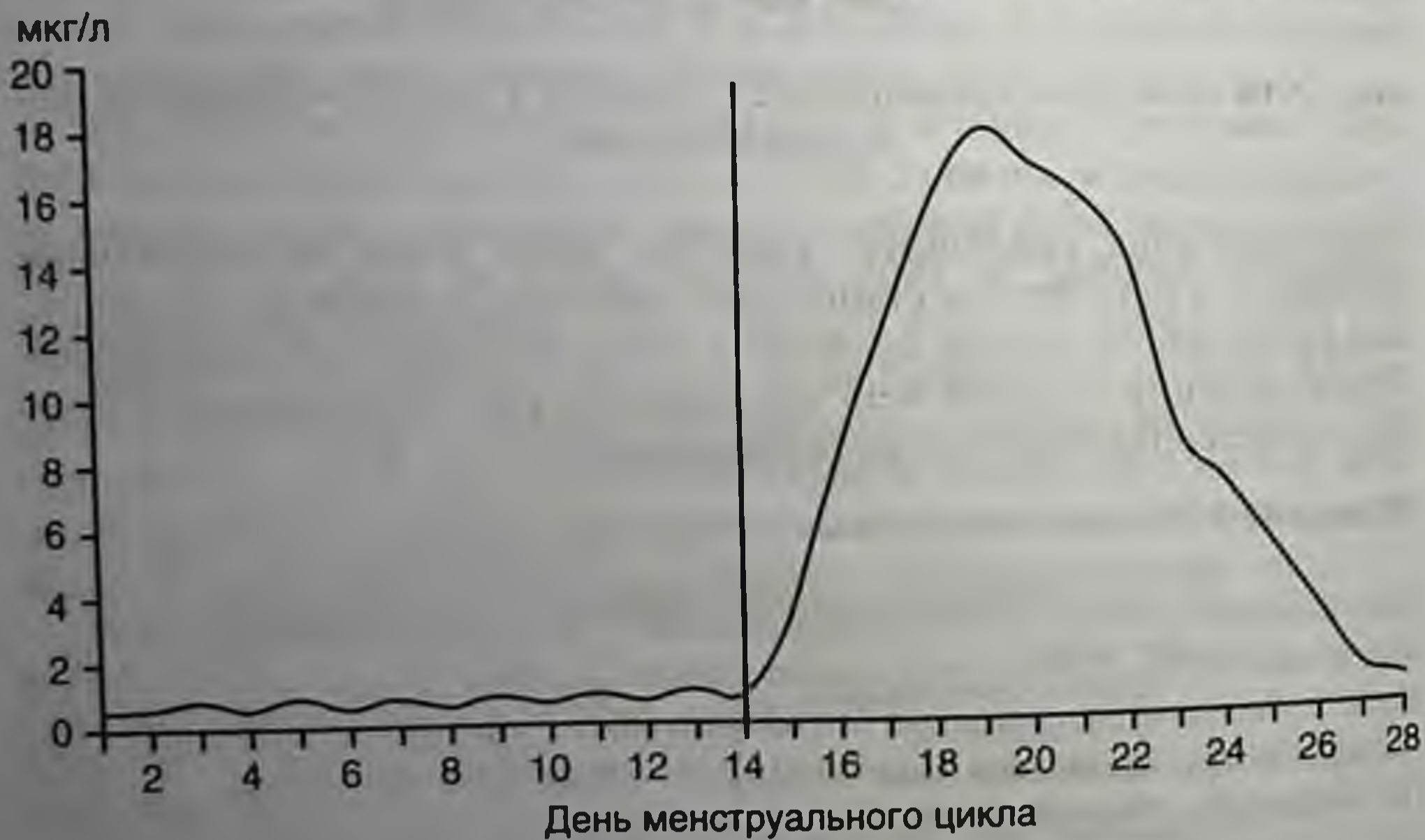


Рис. 17.11. Изменение концентрации прогестерона в течение нормального менструального цикла

**Андрогены.** Главными представителями андрогенов в женском организме являются тестостерон, андростендион и ДГЭА-с. Андрогены стимулируют рост волос на лобке и подмышечных впадинах, повышают либидо (половое влечение) и оказывают влияние на размер клитора и больших половых губ.

В организме мужчин главными представителями андрогенов являются тестостерон и дигидротестостерон. Большая часть тестостерона в сыворотке связана со стероид-связывающим глобулином (около 60%). Доля свободного тестостерона составляет 1–3%, а тестостерона, связанного с альбумином, — около 40%. В органы-мишени (простата, семенные пузырьки и кожа) может проникать только тестостерон свободный и связанный с альбумином. Достигнув органа-мишени и проникнув внутрь клеток, тестостерон превращается в дигидротестостерон (основное количество образуется в предстательной железе). Только после этого дигидротестостерон оказывает свой биологический эффект. В других органах-мишенях, таких как мышцы и почки, эффект андрогенов осуществляется напрямую.

Тестостерон — андрогенный гормон, ответственный за вторичные половые признаки у мужчин. Важнейшим источником тестостерона служат клетки Лейдига семенников. Тестостерон поддерживает сперматогенез, стимулирует рост и функционирование добавочных половых желез, а также развитие полового члена и мошонки. Гормон обладает анаболическим эффектом, главным образом в отношении костей и мышц. За счет непосредственного воздействия на костный мозг, а также путем активации синтеза эритропоэтина в почках, тестостерон стимулирует эритропоэз. Гормон также необходим для поддержания либидо и потенции. Синтез тестостерона контролируется ЛГ передней доли гипофиза. У мужчин это главный андроген, обуславливающий достижения половой зрелости. Концентрация гормона в крови увеличивается после физической нагрузки. Референтные величины тестостерона в сыворотке приведены в табл. 17.8.

Таблица 17.8. Референтные величины тестостерона в сыворотке

Возраст	Пол	Уровень тестостерона	
		нг/дл	нмоль/л
Новорожденные	Мужской	75–400	2,6–13,9
	Женский	20–64	0,69–2,22
Препубертатный период			
1–5 мес	Мужской	1–177	0,03–6,14
	Женский	1–5	0,03–0,17
6–11 мес	Мужской	2–7	0,07–0,24
	Женский	2–5	0,07–0,17
1–5 лет	Мужской	2–25	0,07–0,87
	Женский	2–10	0,07–0,35

6–9 лет	Мужской	3–30	0,10–1,04
	Женский	2–20	0,07–0,69
Пубертатный период			
Возрастная группа 1	Мужской	2–23	0,07–0,80
	Женский	2–10	0,07–0,35
Возрастная группа 2	Мужской	5–70	0,17–2,43
	Женский	5–30	0,17–1,04
Возрастная группа 3	Мужской	15–280	0,52–9,72
	Женский	10–30	0,35–1,04
Возрастная группа 4	Мужской	105–545	3,64–18,91
	Женский	15–40	0,52–1,39
Возрастная группа 5	Мужской	265–800	9,19–27,76
	Женский	10–40	0,35–1,39
Взрослые	Мужской	280–1100	8,72–38,17
	Женский	15–70	0,52–2,43
Беременные	3–4-кратный уровень взрослых		
Постменопауза	–	8–35	0,28–1,22

## 17.6.2. ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ МЕНСТРУАЛЬНОГО ЦИКЛА

Менструальный цикл — повторяющееся выражение деятельности системы гипоталамус–гипофиз–яичники, которое вызывает структурные и функциональные изменения репродуктивного тракта: матки, маточных труб, эндометрия, влагалища. Каждый цикл заканчивается менструальным кровотечением, 1-й день которого считают началом цикла.

Во время первой части менструального цикла (фолликулиновая фаза) ФСГ, секретиромый передней долей гипофиза, стимулирует продукцию эстрадиола гранулезными клетками яичника. ФСГ и эстрадиол вызывают пролиферацию этих клеток, и секреция эстрадиола увеличивается. Эти гормоны стимулируют ЛГ-рецепторы. Эстрадиол действует на эндометрий матки, вызывая его утолщение и васкуляризацию, тем самым готовит его к имплантации яйцеклетки. По мере созревания фолликулов в них и крови увеличивается уровень ингибина, который оказывает селективно ингибирующее действие на секрецию ФСГ.



Пик эстрадиола, приходящийся на середину менструального цикла (14-й день), запускает волну выброса ЛГ из гипофиза. ЛГ стимулирует овуляцию (выход зрелой яйцеклетки из фолликула). Оставшиеся клетки в постовуляторном фолликуле формируют желтое тело, которое начинает секретировать прогестерон и эстрадиол.

Во время второй, лютеиновой фазы, прогестерон совместно с эстрадиолом заставляет эндометрий еще больше утолщаться. Происходит усиленная васкуляризация клеток эндометрия и их дифференцировка, клетки становятся секреторными.

Приблизительно через неделю с момента образования желтого тела оно начинает обратное развитие и секреторирует меньше эстрадиола и прогестерона. К 28-му дню менструального цикла уровень яичниковых стероидов становится неадекватным для поддержания жизни утолщенного эндометрия, он «сползает» в полость матки и выводится наружу. Этот выход крови из влагалища называют менструацией. Кровотечение длится 3–5 дней. Низкие уровни эстрадиола и прогестерона в конце цикла снимают (по принципу обратной отрицательной связи) ингибирование секреции гипоталамусом ГРГ. Уровень ГРГ в гипоталамусе повышается, стимулирует секрецию ФСГ и ЛГ гипофизом, и менструальный цикл начинается вновь. Гормональная регуляция менструального цикла приведена на рис. 17.12.

### 17.6.3. ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ СПЕРМАТОГЕНЕЗА

У мужских половых желез (яичек, семенников) есть две главные функции:

- синтез и секреция мужских половых гормонов (андрогенов);
- сперматогенез, то есть образование и развитие сперматозоидов.

Андрогены необходимы не только для сперматогенеза и созревания спермы, но они также контролируют рост и функции семенных везикул и простаты. При этом достаточный уровень тестостерона представляет собой необходимое условие нормальных либидо и половой потенции мужчины.

ГРГ секреторируется эпизодически в течение дня клетками гипоталамуса. Он стимулирует переднюю долю гипофиза, которая в ответ секреторирует ЛГ и ФСГ. ЛГ действует на клетки Лейдига в яичках, стимулируя в них продукцию и секрецию тестостерона. Тестостерон проходит в сертолиевы клетки яичек, где способствует сперматогенезу в сперматогониях.

У половозрелых лиц мужского пола ФСГ способствует началу сперматогенеза. Гормон присоединяется к рецепторам плазматической

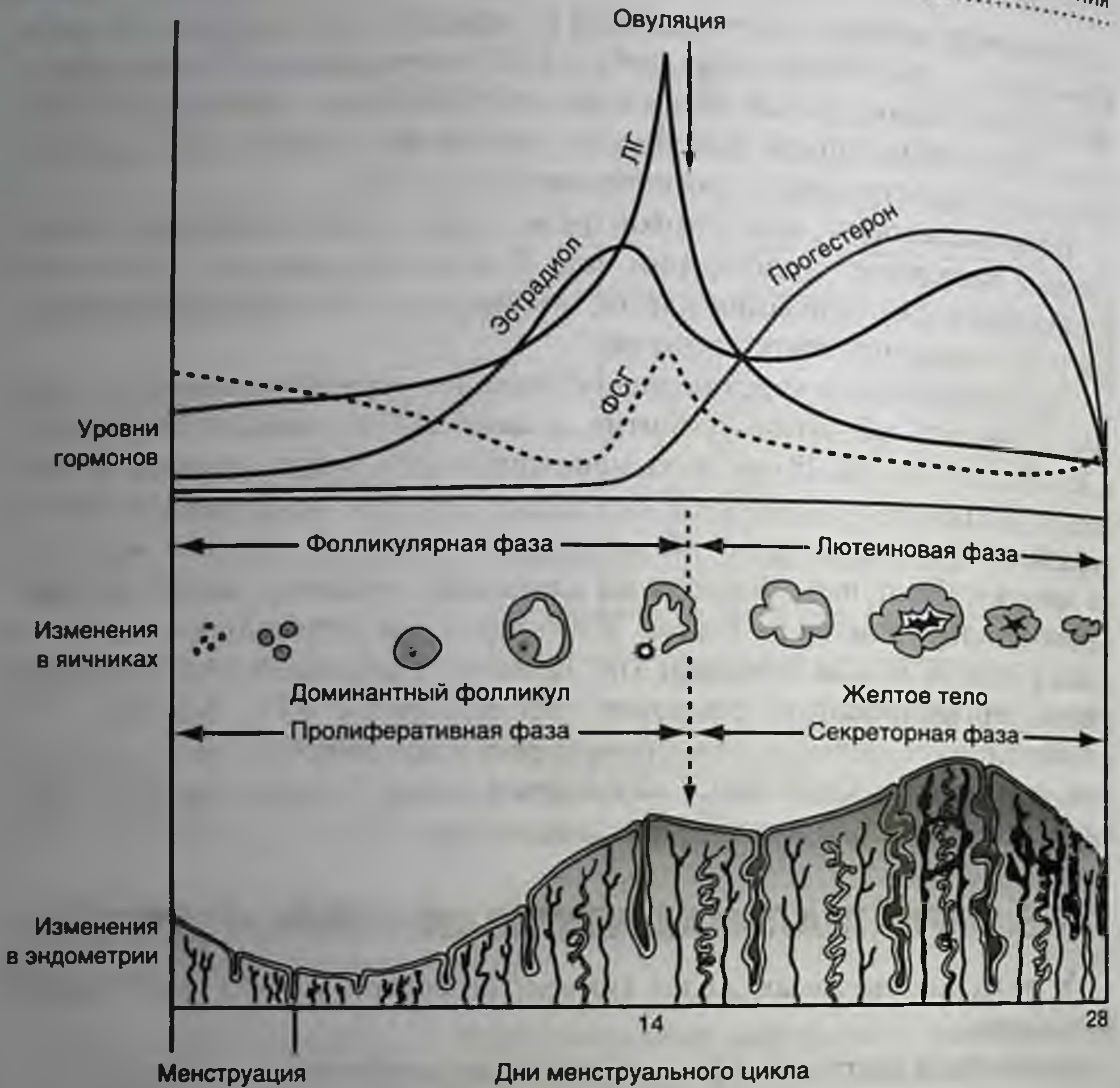


Рис. 17.12. Гормональная регуляция менструального цикла

мембраны сертолиевых клеток, которые находятся на базальной мембране семявыносящих канальцев яичек. Сертолиевы клетки отвечают на стимуляцию ФСГ продукцией белков, которые ускоряют созревание сперматогоний в канальцах. Если процесс сперматогенеза запущен, то для его поддержания достаточно одного тестостерона.

#### 17.6.4. ПРИЧИНЫ НАРУШЕНИЯ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ У ЖЕНЩИН

Аменорея — полная утрата менструаций, служит одной из основных причин нарушения репродуктивной функции у женщин. Она занимает

одно из первых мест в структуре многообразных нарушений менструального цикла. Частота ее высока и составляет 3,3% числа всех женщин репродуктивного возраста. Это наиболее тяжелая форма патологии менструального цикла.

Аменорею принято делить на первичную и вторичную. К первичной аменорее относят те случаи, когда у женщин репродуктивного возраста никогда не было самостоятельных менструаций. Отсутствие менструаций у девушек в возрасте после 15 лет следует расценивать как первичную аменорею. Ее встречают сравнительно редко, она бывает вызвана недоразвитостью или анатомическими врожденными дефектами половых органов, сниженной функцией гипофиза или щитовидной железы, гиперплазией надпочечников (адреногенитальный синдром).

Под термином «вторичная аменорея» понимают отсутствие у женщины менструации в течение 6 мес и более, в то время как до развития данного состояния они были более или менее регулярными. Прежде всего в таких случаях должны быть исключены физиологические причины аменореи — беременность, постменопауза. Патологическая вторичная аменорея в большинстве случаев имеет функциональную природу.

Причинами первичной аменореи могут быть анатомические дефекты развития яичников и органов репродуктивного тракта: матки, маточных труб, эндометрия, влагалища. В зависимости от типа анатомического дефекта развития страдает и секреция гормонов гипоталамусом, гипофизом и яичниками. Если произошла остановка развития яичников в период внутриутробного развития или возникло их повреждение вследствие лучевой, химиотерапии, хирургических операций в детском возрасте, то уровень эстрадиола в крови резко снижен или вообще не определяется. Одновременно определяют высокий уровень ФСГ, ЛГ (отсутствует тормозящее влияние эстрадиола на их продукцию). При опухолях яичников аменорея развивается вследствие повышенной секреции опухолью половых гормонов (чаще всего андрогенов). Данная форма первичной аменореи характеризуется повышенным уровнем тестостерона в крови.

Причиной первичной аменореи может быть задержка полового развития. Об этом следует говорить при отсутствии признаков полового созревания (формирование молочных желез, рост волос на лобке и в подмышечных впадинах) до 14-летнего возраста. Причиной данного состояния служат особенности конституционального развития (позднее развитие), хронические нарушения питания, а также редко встречаемые заболевания ЦНС. У таких пациенток при проведении лабораторного обследования определяют сниженный уровень ФСГ и ЛГ в крови.

Первичная яичниковая недостаточность может быть следствием хромосомных заболеваний у пациенток. Наиболее часто встречаются синдром Шерешевского–Тернера — врожденное заболевание, обусловленное отсутствием одной X-хромосомы. Больные характеризуются низкорослостью, вторичные половые признаки не развиваются, в некоторых случаях отмечают рост грудных желез и даже появление менструаций. Яичники неразвиты, содержат только соединительную ткань; изредка обнаруживают отдельные половые клетки, что объясняет частичное половое созревание. Уровень гонадотропинов в крови, особенно ФСГ, обычно выше, чем у сверстников, даже в раннем возрасте. При подозрении на синдром Шерешевского–Тернера обязательно следует провести анализ хромосом.

Причины вторичной аменореи можно классифицировать по четырем уровням (рис. 17.13):

- I — выводящий тракт (матка, шейка матки, влагалище);
- II — яичники (развитие фолликула);
- III — передняя доля гипофиза (продукция гонадотропинов, пролактина, ТТГ и их секреция);
- IV — ЦНС и гипоталамус (продукция и секреция ГРГ).

Основной причиной вторичной аменореи служат нарушения на гипоталамическом уровне. В их основе — изменение частоты и амплитуды импульсов высвобождения ГРГ, что влечет недостаточность или полное отсутствие пиков ЛГ. Гипоталамический уровень поражения при вторичной аменорее может быть обусловлен врожденной гипоплазией или дефектом гипоталамуса, следствием перенесенных нейроинфекций, травм головы, кровоизлияний.

Ведущее место среди гипофизарных причин вторичной аменореи занимает аменорея, обусловленная повышенной продукцией пролактина (гиперпролактинемическая аменорея). Под гиперпролактинемией понимают состояние, при котором уровень пролактина в сыворотке крови превышает 512 мМЕ/л. Аменорею отмечают у 30–70% больных с гиперпролактинемией. Кроме нарушений менструального цикла, которые могут иметь любую степень выраженности, включая аменорею, гиперпролактинемия в 30–60% случаев сопровождается лактореей (выделением молочной жидкости из грудных желез).

Хроническая гиперпролактинемия нарушает циклическое выделение ГРГ и, следовательно, гонадотропинов (ФСГ и ЛГ), уменьшает частоту и амплитуду секреторных пиков ЛГ, ингибирует действие гонадотропинов на яичники, что способствует формированию синдрома гипогонадизма. В результате гипофункции яичников развиваются аменорея и бесплодие.

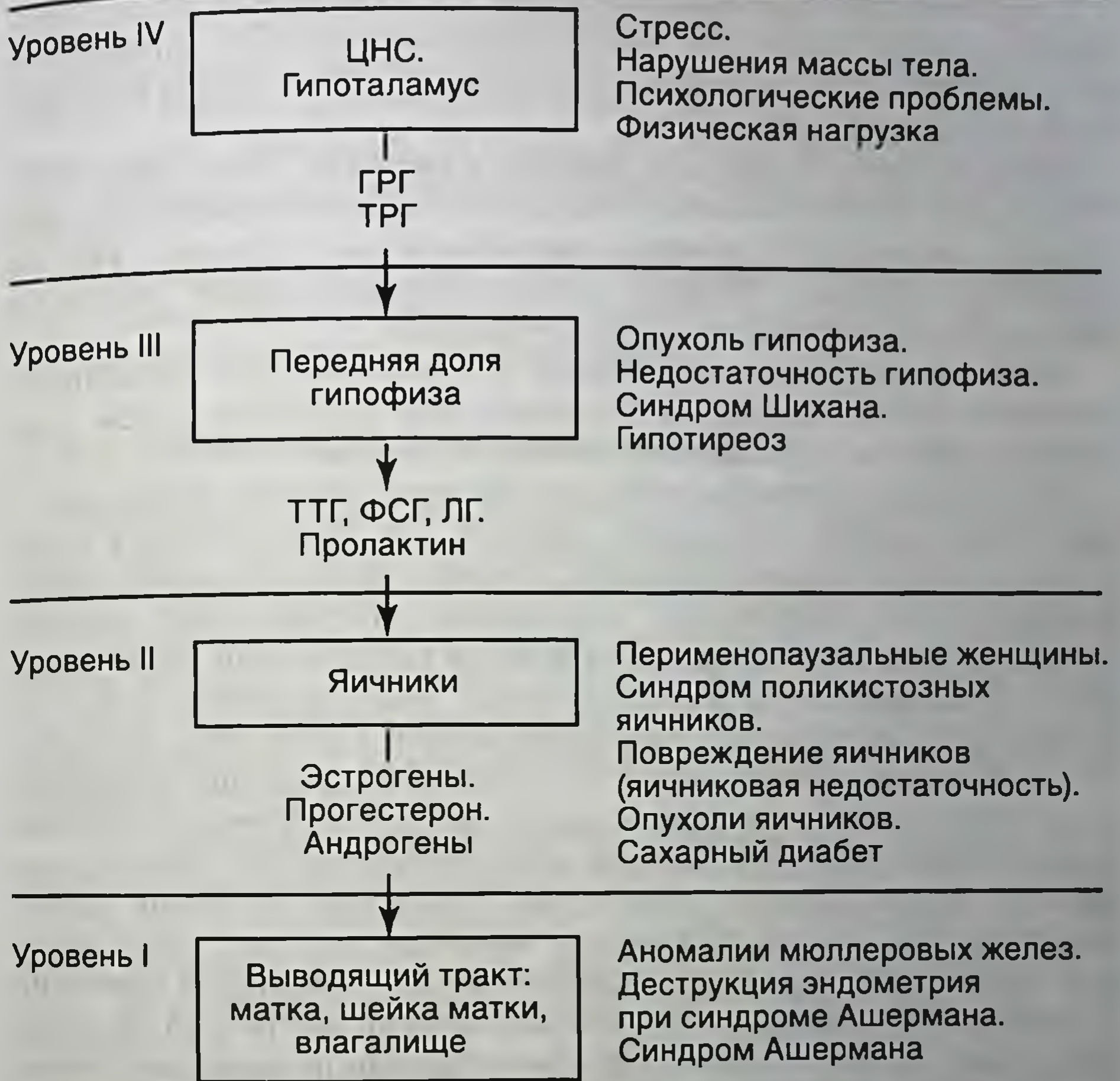


Рис. 17.13. Классификация этиологических факторов аменореи по уровням

Основным в диагностике синдрома гиперпролактинемии считают исследование уровня пролактина в крови. Для синдрома гиперпролактинемии характерно повышение его уровня. Даже небольшое его возрастание в крови (450–750 мМЕ/л) может быть причиной недостаточности яичников, ановуляторных циклов и бесплодия. Повышение уровня пролактина до 3000 мМЕ/л вызывается преимущественно «функциональными» причинами и чаще характерно для гиперпролактинемии при синдроме «пустого» турецкого седла, гормонально неактивной опухоли гипофиза. Уровень выше 3000 мМЕ/л характерен для гиперпролактинемии, обусловленной опухолью гипофиза (пролактинома).

В диагностике гиперпролактинемии при повышении уровня пролактина в крови более 3000 мМЕ/л информативно даже однократное его определение, при меньшем повышении (до 1000 мМЕ/л) рекомендуют 3–5-кратное исследование.

Недостаточность гипофиза, ведущая к аменорее, может быть следствием повреждения соседних с гипофизом тканей аневризмой сонной артерии, закупоркой Сильвиева водопровода или ишемией, как это бывает при синдроме Шихана. Синдром Шихана служит следствием послеродового сосудистого инфаркта гипофиза.

Такие эндокринные заболевания и состояния, как гипотиреоз, сахарный диабет, выраженный избыток или недостаток массы тела, нередко приводят к развитию вторичной аменореи.

Синдром поликистозных яичников (синдром Штейна–Левентала) — еще одна из причин вторичной аменореи. Его обнаруживают у 3–5% женщин репродуктивного возраста. В основе синдрома поликистозных яичников лежит первичный, генетически обусловленный дефицит ферментов яичников. Чаще всего имеется генетический дефект фермента 19-гидроксилазы. Недостаточность этого фермента блокирует превращение андрогенных предшественников в эстрогены. В результате в яичниках накапливается тестостерон, а продукция эстрогенов резко снижается. Низкая концентрация эстрадиола влечет увеличение высвобождения ЛГ в гипоталамусе, а высвобождение ФСГ блокируется высокой концентрацией тестостерона. Вследствие снижения уровня секреции ФСГ клетки фолликулов яичников получают недостаточную стимуляцию, что ведет к недостаточности эстрадиола в сочетании со стимуляцией продукции андрогенов клетками внутренней оболочки стенки фолликула, определяемой относительным повышением уровня ЛГ. Данный дисбаланс эстрадиола и андрогенов в пользу последних тормозит рост фолликулов. Повышенный уровень андрогенов провоцирует развитие прогрессирующего фиброза капсулы яичников, приводя их тем самым к состоянию поликистоза. В крови — увеличение уровня тестостерона и ЛГ. Концентрация эстрадиола в крови у больных с синдромом поликистозных яичников снижена.

Дисфункция яичников возникает у перименопаузальных женщин и характеризуется повышенным уровнем гонадотропинов в крови. Обычно у женщин перед наступлением менопаузы в крови повышен уровень ФСГ и нормальные величины ЛГ. Повышенный уровень ФСГ необходим для стимуляции немногих оставшихся фолликулов, у которых снизилась эстроген-продуцирующая способность. Дисфункция яичников почти всегда необратима. В редких случаях лечение эстрогенами позволяет восстановить активность яичников.

Яичниковая недостаточность при редком синдроме резистентных яичников обусловлена нечувствительностью рецепторов на клетках яичников к гонадотропным гормонам. В основе синдрома лежат генетические дефекты рецепторов ЛГ и ФСГ либо появление аутоантител, блокирующих рецепторы. В крови определяют высокие концентрации гонадотропинов, которые необходимы, чтобы вызвать рост фолликулов.

Преждевременная недостаточность яичников возникает как следствие инфекции, облучения, химиотерапии или наличия аутоантител к антигенам стероидных клеток яичников.

### 17.6.5. КЛИМАКТЕРИЧЕСКИЙ СИНДРОМ

Менопауза — период жизни, когда вслед за утратой функции яичников полностью прекращаются менструации. Перименопауза представляет собой период непосредственно до наступления менопаузы и после него. Климактерий — более широкое понятие, обозначающее период, в течение которого женщина утрачивает свои репродуктивные способности и вступает в период постменопаузы, когда прекращают функционировать яичники. Средний возраст наступления менопаузы у женщин — 50–52 года.

После утраты регулярности менструальных циклов в конце неполноценной лютеиновой фазы или после пика эстрадиола в крови появляются вагинальные кровотечения, но при этом не происходит овуляции и формирования желтого тела. Наступление менопаузы свидетельствует об отсутствии фолликулов в яичниках. Уровень ФСГ при этом повышается в 10–20 раз, ЛГ — в 3 раза, достигая максимума через 1–3 года после наступления менопаузы. В дальнейшем содержание обоих гонадотропинов начинает постепенно, но неуклонно снижаться. Повышение уровня ФСГ и ЛГ в сыворотке крови после наступления менопаузы свидетельствует о неспособности яичников синтезировать адекватные количества половых гормонов. Уровень эстрадиола в крови после наступления менопаузы снижен. В конечном итоге это приводит к тому, что из-за недостатка эстрогенов утрачиваются вторичные половые признаки.

Понимание закономерностей изменения секреции половых гормонов имеет большое практическое значение в плане подбора адекватной гормонотерапии для устранения негативных последствий гормональной недостаточности.

Наиболее ярким проявлением гормональных изменений, происходящих в организме женщины, служит климактерический синдром.

Климактерический синдром — своеобразный клинический комплекс симптомов, осложняющий течение климактерического периода и проявляющийся нейропсихическими, обменно-эндокринными и вегетативными нарушениями.

Исследование гормонального статуса у пациенток с климактерическим синдромом играет очень важную роль, так как специфическими для данной возрастной группы становятся проблемы, включающие надежную контрацепцию и борьбу с остеопорозом. Возникновение последнего обусловлено эстрогенной недостаточностью (встречают примерно у 30% женщин в возрасте старше 60 лет), а также нарушениями липидного обмена, характеризуемыми снижением уровня холестерина ЛПВП и подъемом уровня холестерина ЛПНП, что способно ускорить развитие атеросклероза, приводя к увеличению риска возникновения ИМ и инсульта. Критический уровень эстрадиола в сыворотке крови, необходимый для поддержания нормального состояния костной ткани, равен 40–50 пг/мл (146–184 фмоль/л). Благодаря своевременному назначению эстрогенов число переломов лучевой и бедренной кости можно снизить на 50–60%.

При назначении заместительной терапии эстрогенами необходим мониторинг уровня эстрадиола. При правильно подобранной дозе лекарственного средства его уровень в сыворотке крови должен быть в пределах 40–100 пг/мл (150–370 пмоль/л). Уровень ФСГ в крови не может служить ориентиром при мониторинге дозировок эстрогена.

### 17.6.6. ПРИЧИНЫ НАРУШЕНИЯ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ У МУЖЧИН

На долю эндокринных нарушений, которые могут возникать на различных уровнях гормональной системы, регулирующей сперматогенез, приходится 15–30% случаев мужского бесплодия. Следствие эндокринных нарушений — мужской гипогонадизм (тестикулярная недостаточность), который обусловлен снижением уровня андрогенов в крови с одновременным, в большинстве случаев, нарушением сперматогенеза. Клинически гипогонадизм может проявляться недоразвитием внутренних или наружных половых органов и вторичных половых признаков, а также нарушением фертильности (способности к деторождению) различной степени выраженности или бесплодием. В зависимости от того, на каком уровне нарушается функционирование оси гипоталамус–гипофиз–гонады, выделяют первичный и вторичный мужской гипогонадизм.



Первичный гипогонадизм — первичное поражение гонад (яичек), сопровождается снижением секреции тестостерона и повышением уровня ФСГ и ЛГ в крови.

Вторичный гипогонадизм — первичное повреждение гипоталамо-гипофизарной системы со снижением секреции ФСГ и ЛГ и, как следствие, нарушение продукции андрогенов и сперматогенеза.

Первичный и вторичный гипогонадизм по своему происхождению может быть врожденным или приобретенным.

Первичный врожденный гипогонадизм чаще всего обусловлен анатомическими нарушениями развития семенных канальцев, отсутствием или недоразвитием яичек, аплазией семявыводящих протоков, нарушением дифференцировки половых органов (мужской псевдогермафродизм), а также врожденной недостаточностью ферментов, обеспечивающих синтез андрогенов (тестостерона).

Вторичный врожденный гипогонадизм встречаются редко, обусловлен анатомическим недоразвитием гипоталамической области мозга. Такие аномалии сопровождаются нарушением секреции ЛГ и ФСГ и, как следствие, отсутствием их стимулирующего влияния на яички — вторичным гипогонадизмом.

Первичный приобретенный гипогонадизм связан с повреждением яичек бактериальными и вирусными инфекциями (наиболее частая причина — орхит после эпидемического паротита). Травма, облучение яичек — также нередкая причина развития их недостаточности.

Воспалительные процессы в ЦНС, травмы с переломом основания черепа, сосудистые аневризмы, синдром гиперпролактинемии — наиболее частые причины вторичной приобретенной недостаточности яичек. В ее основе лежит нарушение секреции гипоталамусом и гипофизом гонадотропных гормонов (ФСГ и ЛГ). Низкая концентрация в крови ФСГ и ЛГ не в состоянии обеспечить адекватную стимуляцию синтеза андрогенов (тестостерона) яичками, что в большинстве случаев приводит к нарушению сперматогенеза.

Гиперпролактинемия занимает одно из важных мест при половых расстройствах у мужчин. Частота встречаемости ее у мужчин с нарушением половых функций (снижение либидо и потенции) составляет от 16 до 40%, при бесплодии — от 1 до 30%. Это обусловлено тем, что пролактин служит гормоном широкого действия, в том числе и регулятором половой функции у мужчин. Однако механизм действия и патогенез симптомов при гиперпролактинемии у мужчин до сих пор неизвестны. Среди причин гиперпролактинемии у мужчин 1-е место занимают пролактиномы, затем следуют различные опухоли, которые деформируют ножку гипофиза и вызывают функциональную гипер-

пролактинемию (так называемый эффект пересеченной ножки гипофиза) — псевдопролактиномы. Идиопатическая (неустановленного характера) гиперпролактинемия занимает 3-е место.

Вторичный приобретенный гипогонадизм может развиваться у пациентов с хроническими системными заболеваниями и интоксикациями (например, уремической интоксикацией).

Гормональные исследования у мужчин при подозрении на нарушение у них репродуктивных функций назначают обычно только после получения у пациента патологической спермограммы. Целью гормональных исследований служит дифференциальная диагностика между гипогонадизмом, который обусловлен гипоталамо-гипофизарной недостаточностью, и гипогонадизмом, связанным с недостаточностью яичек. Базовая гормональная диагностика включает определение ФСГ, ЛГ, пролактина и тестостерона.

## 17.7. ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ АНАЛИЗАТОРЫ

В своей работе все иммунохимические анализаторы используют методы анализа, основанные на реакции антиген–антитело как с применением химических и физических меток и последующим измерением фотометрических величин светового потока при его прохождении через растворы реакционной смеси, так и без меток и последующей визуальной оценки. Все эти методы можно объединить понятием «иммунологические методы». Эти методы применяют в целях:

- диагностики инфекционных заболеваний (выявление различных специфических антител к инфекционным агентам и их антигенов);
- выявления и определения уровня гормонов и лекарственных препаратов в биологических пробах;
- выявления иммунных комплексов;
- определения общего IgE и специфических IgE-антител;
- определения изотипов (IgG, IgM и др.) антител против конкретного антигена;
- определения специфических белков в сыворотке крови (тропонин, ферритин, фибронектин, D-димер и др.);
- выявления онкомаркеров;
- определения антигенов на поверхности или внутри клетки с помощью моноклональных антител (иммуногистохимический анализ);
- определения цитокинов в биологических жидкостях.

Такая революция стала возможна благодаря методам генной инженерии, которые позволили синтезировать и получать как чистые белки, так и моноклональные антитела к ним, а технологическая возможность присоединения к комплексам антиген–антитело различных химических и физических меток сопровождалось небывалым расцветом лабораторных технологий. В практику КДЛ пришли методы иммуотурбидиметрии, иммуноферментного анализа, иммунохемилюминесценции, иммунофлюоресценции, радиоиммунного анализа и др. Основные методы иммунного анализа приведены в табл. 17.9.

Таблица 17.9. Методы иммунного анализа

Метод	Метка	Сущность сигнала
Иммуотурбидиметрия	Антитела. Латекс. Золото	Агрегация и рассеивание света. Рассеивание света. Абсорбция
Иммуноферментный анализ	Щелочная фосфатаза. β-Галактозидаза. Пероксидаза хрена. Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	Фотометрия
Иммунофлюоресценция	Флюорофор: прямая маркировка; β-галактозидаза; пероксидаза хрена. Ферменты: щелочная фосфатаза; β-галактозидаза; пероксидаза хрена	Флуоресценция
Иммунолюминесценция	Щелочная фосфатаза. β-Галактозидаза. Пероксидаза хрена. Люцифераза	Фотометрия
Иммунохемилюминесценция	Прямая маркировка: люминол. Ферменты: щелочная фосфатаза; β-галактозидаза; пероксидаза хрена; люцифераза; аквеорин; хелат рутения	Фотометрия
Радиоиммунный	<sup>14</sup> C (β-лучи). <sup>3</sup> H (β-лучи). <sup>125</sup> I (γ-лучи)	Фотоны. Фотоны. γ-Лучи

Иммунотурбидиметрия — это количественное измерение концентрации специфических белков, по изменению мутности раствора при реакции антиген—антитело. Этот метод характеризуется достаточно высокой чувствительностью, которую можно повысить за счет использования латексных частиц, а также широкой возможностью автоматизации на биохимических анализаторах. Метод широко используется в практике КДЛ для определения уровня аполипопротеинов А1 и В,  $\alpha$ -1-антитрипсина,  $\alpha$ -2-макроглобулина,  $\alpha$ -1-кислого гликопротеина, антитромбина III, церулоплазмина, С-1-эстеразы, компонентов комплемент С3 и С4, гаптоглобина, иммуноглобулинов (IgG, IgA, IgM), компонентов иммуноглобулинов каппа (легкие цепи Ig) и ламбда (легкие цепи Ig), преальбумина, трансферрина, ферритина.

Иммунотурбидиметрия служит основным методом для исследования гликозилированного гемоглобина (HbA1c). Этот двустадийный метод основан на конкурентном связывании общего гемоглобина и HbA1c со специфическими латексными частицами пропорционально их концентрации. Затем происходит связывание гликогемоглобина и специфических мышинных моноклональных антител, которые, в свою очередь, взаимодействуют с козьими поликлональными антителами к IgG мыши, вызывая агглютинацию латексных частиц. Степень агглютинации зависит от количества связанного с латексными частицами гликогемоглобина HbA1c. Увеличение мутности смеси измеряется фотометрически.

Метод ИФА основан на высокоспецифической иммунологической реакции антигена с соответствующим антителом с образованием иммунного комплекса. При этом один из компонентов конъюгирован с ферментом. В результате реакции фермента с хромогенным субстратом образуется окрашенный продукт, количество которого можно определить фотометрически. Этот метод наиболее широко используется в практике лабораторий для серологической диагностики вирусных, бактериальных, грибковых и других инфекций, определения гормонов и онкомаркеров, специфических белков. Детально метод ИФА рассмотрен в предыдущей главе.

Хемилюминесценция — это процесс излучения фотонов при переходе электронно-возбужденных продуктов окислительных химических реакций в исходное энергетическое состояние. На этом физико-химическом феномене базируется метод иммунохемилюминесцентного анализа (ИХЛА). В ИХЛА, так же как в ИФА, используется иммунологическая реакция, с участием ферментов и антител, а в качестве субстрата присоединяются люминофоры — вещества, светящиеся в ультрафиолете (люмогенный субстрат). Уровень све-

чения измеряется на специальных приборах — люминометрах. Хемилюминесцентные реакции основаны на способности люминола светиться при окислении перекисью водорода. Для усиления сигнала используются различные соединения, например, люциферин, фенолы, в этом случае интенсивность люминесценции усиливается в 10–100 раз, в отдельных вариантах в 500 раз (усиленный хемилюминесцентный анализ). Люминесцентный сигнал очень стабилен, его уровень достигает максимума за 30 с (для сравнения: цветная реакция с использованием пероксидазы хрена и О-фенилендиаминдигидрохлорида в качестве индикатора в ИФА полностью развивается лишь за 30 мин).

Методы ИХЛА делят на биолюминесценцию и хемолюминесценцию. Сущность биолюминесцентного иммуноанализа состоит в том, что в реакционную систему входят кофакторы (АТФ или NAD), субстрат (люциферин) и фермент (люциферазы светлячков или бактерий). В хемилюминесцентном иммуноанализе в реакционную систему добавляют субстрат, окислитель, фермент-катализатор. В зависимости от используемой метки выделяют разновидности хемилюминесцентного иммуноанализа:

- 1) в одних методах в качестве метки используют фермент-катализатор [пероксидаза, микропероксидаза (фрагмент цитохрома С)]; в настоящее время наибольшее распространение получил иммунохемилюминесцентный анализ с двумя субстратами (люминол+люциферин) и пероксидазой в качестве метки; чувствительность метода оценивается в  $10^{-13}$  М антигена;
- 2) в других методах в качестве метки применяют молекулы субстрата (изолюминол, эфиры акридина); метод обладает высокой чувствительностью ( $10^{-12}$  М или до 0,2 пг антигена для изолюминола, до  $10^{-18}$  М антигена для эфиров акридина);
- 3) в третьих методах в качестве метки для конъюгата антител вместо фермента используется ион металла рутения (Ru); вблизи платинового электрода двухвалентный рутений ( $Ru^{+2}$ ) окисляется в трехвалентное состояние ( $Ru^{+3}$ ); в реакции в качестве поддержки используется трипропиламин (ТРА), который окисляется в ТРА<sup>+</sup>-радикал, теряя при этом протон; Этот радикал передает электрон  $Ru^{+3}$ , создавая электронно возбужденный  $Ru^{+2}$ , который возвращается в базовое состояние, испуская фотон; данная разновидность хемилюминесцентного иммуноанализа известна под названием электрохемилюминесцентный анализ и широко представлена в практике КДЛ в виде иммунохимических анализаторов Elecsys фирмы Roche Diagnostics.

Во всех иммунологических методах реакция антиген—антитело происходит на твердой поверхности стенок пробирок, поверхности микропланшетов или сферических бусинках, которые имеют относительно небольшую реакционную поверхность, что ограничивает чувствительность метода. Кроме того, продолжительность диффузии слишком велика для того, чтобы антиген (или антитело) достиг равновесия связывания, что является проблемой, особенно для больших молекул белков-антигенов. Для преодоления этих ограничений стали применять микрочастицы. Данная технология в полной мере воплощена в анализаторах на основе метода биолюминесцентного и хемилюминесцентного анализа. Микрочастицы имеют размеры от 0,8 до 100 нм. Они представляют намного большую поверхность для реакции антиген—антитело на единицу массы. В результате длительность диффузии существенно уменьшается и возрастает скорость реакции, соответственно, время получения результата анализа сокращается. Однако дисперсная фаза микрочастиц требует применения устройств для разделения связанной и свободной фракций. В современных иммунохимических анализаторах эта проблема решена за счет использования магнитных частиц, поскольку они могут быть отделены из раствора (свободной фазы) применением магнитов. Магнитные частицы могут быть сферической и неправильной формы. У последних площадь поверхности больше до 10 раз по сравнению со сферическими. Поэтому метод ИХЛА обладает большей аналитической специфичностью и чувствительностью по сравнению с традиционным ИФА на планшетах и занимает меньше времени в КДЛ.

Иммунофлюоресцентный анализ основан на связывании антител, меченных флюорохромом (например, флюоресцеина изотиоцианатом), с антигенами. Концентрация вещества оценивается по интенсивности излучения в ультрафиолетовых лучах, возбуждающих свечение флюорохрома. Для измерения результатов иммунофлюоресцентного анализа в лабораториях используют анализаторы (флуориметры) или оценивают визуально с помощью флюоресцентной микроскопии (светящиеся комплексы антиген—антитело хорошо видны при микроскопии). Реакцию иммунофлюоресценции используют для изучения клеточных антигенов (наиболее часто при системных заболеваниях соединительной ткани), выявления вируса в зараженных клетках и обнаружения бактерий и риккетсий в мазках.

Во всех этих иммунологических методах, за исключением иммунотурбидиметрии и радиоиммунного анализа, помимо высокоспецифической иммунологической реакции антигена с соответствующим антителом с образованием иммунного комплекса, происходит

химическая реакция с образованием окрашенного продукта, свечения или электронного возбуждения продукта реакции. Поэтому анализаторы, используемые для измерения продуктов этих реакций, получили название — иммунохимические анализаторы.

Иммунохимический анализатор — это сложная диагностическая система, включающая в себя программное обеспечение, наборы диагностических реагентов для проведения высокоспецифической иммунологической реакции антигена с соответствующим антителом с образованием иммунного комплекса, блоки автоматизации процедур анализа, регистрирующее устройство для измерения продуктов реакции и расходные материалы. Однако в процессе разных иммунохимических реакций образуются различные продукты, для измерения которых необходим специфический регистратор. В зависимости от типа иммунохимических реакций и методов регистрации продуктов этих реакций выделяют следующие виды иммунохимических анализаторов:

- 1) иммуноферментные;
- 2) иммунохемилюминесцентные;
- 3) иммунолюминесцентные;
- 4) иммунофлуоресцентные.

По степени автоматизации выполнения операций проведения исследований иммунохимические анализаторы делятся на автоматические фотометры (спектрофотометры), полуавтоматические и автоматические анализаторы.

В лабораториях наиболее широко применяются все 3 типа иммуноферментных анализаторов. В автоматических спектрофотометрах (вертикальный фотометр, ридер) внесение проб и реагентов в лунки планшетов (кювет) и управление процессом фотометрирования производится специалистом лаборатории, и только измерение результатов анализа автоматизировано (рис. 17.14). Спектрофотометры отличаются от фотометров возможностью выбора регистрируемых длин волн. В фотометрах это различные светофильтры с дискретными длинами волн: 230, 340, 405, 414, 415, 450, 492, 505, 545, 595, 600, 620, 630, 650, 655, 690, 700, 750, 980 нм. Спектрофотометры позволяют проводить измерения при любой длине волны от ультрафиолетового диапазона до видимой области спектра. Между собой спектрофотометры различаются по наличию (или отсутствию) ряда дополнительных возможностей, таких как термостатирование пробы, встряхивание планшетов, вывод результатов анализа на дисплей или печатающее устройство и др. Спектрофотометры подразделяют на одно- (встречаются редко) и многоканальные системы измерения результатов. В многоканальных системах измерение результатов проводится одновременно во всех

лунках планшета или количество считываемых лунок задается специалистом лаборатории.



**Рис. 17.14.** Автоматический спектрофотометр StatFax 2100

Полуавтоматические иммуноферментные анализаторы представляют собой комплекс оборудования, который обычно включает автоматический спектрофотометр и планшеточный промыватель (вошер). Промывка планшетов — самая частая процедура иммуноферментного анализа. Использование планшеточного промывателя (рис. 17.15) позволяет автоматизировать эту процедуру. Планшеточные промыватели могут сильно отличаться друг от друга по своим функциональным возможностям. Одни способны проводить одновременно промывку только одной лунки, другие — 8-12-, треть — 96- и 384-луночные планшеты.



**Рис. 17.15.** Планшеточный промыватель STAT FAX 2600



Автоматические иммуноферментные анализаторы представляют собой роботизированные станции, в которых кроме измерения оптической абсорбции проводится предварительное разведение проб, внесение реагентов и проб в лунки планшета, перемешивание, инкубация и промывка планшетов. Автоматические анализаторы иммуноферментных реакций требуют минимального участия специалиста лаборатории. Они отличаются по своей производительности и возможностям одновременной работы с 1, 2, 8, 16 планшетами.

Иммунохемилюминесцентные, иммунолюминесцентные и иммунофлуоресцентные анализаторы в большинстве случаев представлены в лабораториях как полностью автоматизированные системы. Автоматические иммунохимические анализаторы выполняют большой спектр операций: отбор материалов и реагентов, их смешивание и инкубацию, анализ, обработку и печать полученной информации, автоматическое промывание анализатора, калибровку и контроль качества. В отдельных случаях в лабораториях применяют полуавтоматические иммунохимические анализаторы (люминометры, флуориметры). Полуавтоматические анализаторы, требуют участия в работе с ними специалиста лаборатории, но сводят его функции к минимуму. Специалист лаборатории смешивает реагенты и готовит пробы (например, наносит на слайд или тестовую полоску исследуемую сыворотку), но помещение их в измерительное устройство осуществляет сам анализатор.



данный возбудитель, иои места, где он выявлен (*Neisseria* — названа в честь немецкого врача Альберта Нейссера, открывшего возбудителя, *Shigella* — возбудитель описан в японском г. Шига во время эпидемии, *Escherichia* — названа в честь немецкого педиатра Т. Эшериха, описавшего возбудителя, *Rickettsia* — названа по имени американского врача Х. Риккетса, впервые описавшего лихорадку Скалистых гор, *Gardnerella* — названа в честь американского бактериолога Г. Гарднера, открывшего возбудителя).

Видовое название часто связано с наименованием основного вызываемого этим микроорганизмом заболевания (*Vibrio cholerae* — холеры, *Shigella dysenteriae* — дизентерии, *Mycobacterium tuberculosis* — туберкулеза) или с основным местом обитания (*Escherichia coli* — кишечная палочка). Если видовую принадлежность микроорганизма при анализе определить не удастся и определена только принадлежность к роду, то употребляют термин *species* (разновидность).

Исторически сложилось так, что в нашей стране используют соответствующие русифицированные названия бактерий (например, вместо *Staphylococcus epidermidis* — эпидермальнй стафилококк, *Staphylococcus aureus* — золотистый стафилококк и др.).

В практическом плане все микроорганизмы можно разделить на три группы:

- I — микроорганизмы-сапрофиты, не обладающие патогенностью для человека;
- II — микроорганизмы, способные вызывать заболевания у человека;
- III — микроорганизмы, оказывающие благоприятное действие на здоровье человека (например, микроорганизмы молочнокислого брожения, обитающие в кишечнике человека).

Бактериологические исследования наиболее часто проводят при подозрении на гнойно-воспалительные заболевания. Основная цель этих исследований — установление этиологии (вида возбудителя) заболевания и определение чувствительности возбудителей к антибактериальным препаратам. Результаты бактериологических анализов способствуют выбору наиболее эффективного лекарственного средства для антибактериальной терапии, своевременному проведению мероприятий для профилактики внутрибольничных инфекций.

Возбудителями гнойно-воспалительных заболеваний служат истинно-патогенные бактерии, но наиболее часто — условно-патогенные микроорганизмы, входящие в состав естественной микрофлоры человека или попадающие в организм извне. Истинно-патогенные бактерии в большинстве случаев способствуют развитию инфекционного

заболевания у любого здорового человека. Условно-патогенные микроорганизмы вызывают заболевания преимущественно у людей с нарушенным иммунитетом.

Бактериологические исследования при заболеваниях, вызванных истинно-патогенными микроорганизмами, направлены на поиск определенного возбудителя. Если заболевание вызывают условно-патогенные микроорганизмы, то целью бактериологических исследований считают выделение всех микроорганизмов, находящихся в патологическом материале.

Для получения адекватных результатов бактериологического исследования при гнойно-воспалительных заболеваниях особенно важно соблюдать ряд требований при взятии проб биологического материала для анализа, его транспортировке в лабораторию, проведении исследования и оценки его результатов.

В клинической практике чаще всего осуществляют сбор (взятие) биологического материала для бактериологического исследования крови на гемокультуру, посева мокроты, мочи, кала и отделяемого мочеполовых органов.

## 18.1. ПОСЕВ КРОВИ (ГЕМОКУЛЬТУРА)

Посев крови с целью выделения гемокультуры микроорганизмов используют в клинической практике, чтобы подтвердить или исключить наличие в крови бактерий (бактериемии). Посев крови полезен в 3 клинических ситуациях.

- При подозрении на наличие у пациента сепсиса.
- Для диагностики некоторых инфекционных заболеваний, при которых возбудители (микроорганизмы) болезни распространяются с током крови; к таким заболеваниям относят бактериальный эндокардит (инфекция клапанов сердца), остеомиелит (инфекция костей) и инфекционный артрит (инфекция суставов). Кроме того, посев проб крови показан пациентам с пневмонией средней и тяжелой степени тяжести.
- У пациентов с лихорадкой неясного генеза (лихорадку неясного генеза определяют как повышение температуры тела в течение более 10 дней без видимой причины).

В норме кровь человека стерильна (не содержит бактерий). Однако повседневная жизнь связана с постоянным риском контакта циркулирующей крови с бактериями. И даже у здорового человека время от времени может возникать преходящая бактериемия. Повреждения

кожи или слизистых оболочек облегчают доступ в кровоток бактерий, колонизирующих эти покровы. Полость рта содержит большое количество микроорганизмов, которые почти всегда попадают в кровоток во время стоматологических манипуляций или после них. Многие хирургические вмешательства, несмотря на асептическую технику, сопровождаются попаданием в кровь небольших количеств бактерий с кожного покрова или, например, из кишечника при операции на нем. В кровоток бактерии могут попасть при ряде заболеваний и переливании крови. Врожденные и приобретенные механизмы иммунной защиты поддерживают стерильность крови и предупреждают переход транзиторной (преходящей) бактериемии в сепсис, который время от времени развивается у ряда пациентов.

### 18.1.1. СЕПСИС

Длительное время сепсис рассматривали как генерализованный инфекционный процесс, развивающийся на фоне сниженного иммунитета, основополагающим признаком которого считали присутствие бактерий в крови. В настоящее время установлено, что инфекция сама по себе не является непосредственной причиной многочисленных патологических сдвигов, характерных для сепсиса. Скорее всего, они возникают как результат ответной реакции иммунной системы организма на инфекцию. Именно поэтому в настоящее время сепсис рассматривают как результат неконтролируемого генерализованного (системного) воспалительного ответа на присутствие инфекции или как жизнеугрожающую острую органную дисфункцию, возникающую в результате нарушения регуляции ответа макроорганизма на инфекцию. При сепсисе регулирующие системы организма больного не способны контролировать иммунные реакции, в результате чего начинают доминировать повреждающие эффекты медиаторов воспаления этой системы, что способствует нарушению проницаемости и функций эндотелия сосудов, формированию отдаленных очагов генерализованного воспаления, развитию моно- и полиорганной недостаточности.

Бактериемия всегда приводит к развитию генерализованного воспалительного ответа, при котором включаются ответные иммунные реакции организма. Однако если при нормальном течении инфекционного процесса подобные реакции можно расценивать как реакции приспособления или адаптации, то при сепсисе в силу ряда причин их активность носит избыточный и повреждающий характер в отношении многих органов и систем организма больного.

Современное представление о сепсисе требует понимания новой стандартизованной терминологии, характеризующей течение септического процесса. В настоящее время используют приведенную ниже терминологию в отношении сепсиса.

**Клинические понятия, используемые при характеристике септических состояний**

- **Колонизация** — микробиологическое событие (МБС).
- **Инфекция** — микробиологическое событие + местная воспалительная реакция (МВР).
- **Сепсис** — микробиологическое событие + генерализованная воспалительная реакция (ГВР).
- **Тяжелый сепсис** — микробиологическое событие + генерализованная воспалительная реакция + синдром полиорганной недостаточности (СПОН).
- **Септический шок** — микробиологическое событие + генерализованная воспалительная реакция + синдром полиорганной недостаточности + гипотензия (снижение величины АД).

В свою очередь, микробиологическое событие характеризуют нижеприведенные признаки:

- рост микрофлоры из крови или нормально стерильных локусов (мест) либо очагов;
- клинические признаки проникновения инфекции в нормально стерильные среды организма;
- лабораторные и инструментальные признаки инфекционного заболевания (лейкоциты в стерильной жидкости, рентгенографические признаки пневмонии).

О наличии генерализованной воспалительной реакции у больного свидетельствуют:

- температура тела выше 38 или ниже 36 °С;
- число сердечных сокращений (пульс) более 90/мин;
- число дыханий более 20/мин или больному проводят искусственную вентиляцию легких;
- лейкоцитоз в крови выше  $12,0 \times 10^9/\text{л}$  или ниже  $4,0 \times 10^9/\text{л}$ ;
- наличие в лейкоцитарной формуле крови более 10% незрелых форм нейтрофилов (миелоцитов, метамиелоцитов).

Критерии синдрома полиорганной недостаточности при тяжелом сепсисе:

- нарушение сознания;
- лабораторные признаки гипоксемии — парциальное давление кислорода ( $pO_2$ ) в артериальной крови ниже  $<75$  мм рт.ст.;
- наличие метаболического ацидоза — рН артериальной крови ниже 7,3;

- снижение диуреза (олигурия) — мочи менее 30 мл/ч;
- лабораторные признаки нарушения свертывания крови — снижение количества тромбоцитов на 50% нижней границы нормы, увеличение ПВ или АЧТВ на 20% и уровень D-димера более 500 нг/мл.

Диагноз сепсиса не вызывает сомнений при наличии трех критериев:

- инфекционного очага (микробиологическое событие), определяющего природу патологического процесса;
- признаков генерализованной воспалительной реакции;
- признаков организменной дисфункции — синдрома полиорганной недостаточности.

Этот алгоритм должен служить основой для постановки диагноза «сепсис» в повседневной практике.

Несмотря на то что выделение бактерий из крови не является обязательным критерием диагностики сепсиса, тем не менее установление возбудителя и его чувствительности к антибиотикам по-прежнему считают важнейшим моментом в определении прогноза и эффективности лечения больного.

### 18.1.1.1. ЭТИОЛОГИЯ СЕПСИСА

Возбудителями сепсиса могут быть почти все существующие патогенные и условно-патогенные бактерии. Наиболее распространенные возбудители — стафилококки, стрептококки, синегнойная палочка, протейные бактерии, анаэробная флора и бактероиды.

Грамположительные бактерии составляют около 50% всех микроорганизмов, выделяемых из крови больных сепсисом. На долю стафилококков приходится около 55% в общей структуре возбудителей сепсиса. Среди стафилококков наиболее часто выделяют *Staphylococcus aureus* — грамположительный кокк, обычно присутствующий в носовой полости у 20–30% и на коже у 5–10% здоровых людей. Он часто служит причиной хирургической и раневой инфекции, может вызывать инфекционные заболевания кожи, такие как фурункулы и карбункулы. Очагами инфекции при сепсисе чаще всего служат инфицированные раны и внутривенные катетеры.

*Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter cloacae* являются грамотрицательными палочками, в норме обитают в кишечнике и служат наиболее частой причиной инфекции мочевыводящих путей. Первичный очаг инфекции в случае, когда возбудителем является один из этих микроорганизмов, находится обычно в мочевом тракте или причиной служит инфицированный мочевого катетер.

В каждом конкретном случае сепсиса возбудителем является единственный вид бактерий. Очень редко (менее чем в 8% случаев) обнаруживают микроорганизмы более чем одного вида.

### 18.1.1.2. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА СЕПСИСА

Диагностика сепсиса включает выявление этиологического фактора — определение возбудителя и изучение его чувствительности к антибактериальным лекарственным средствам (АБС), так как именно использование соответствующих антибиотиков служит, при прочих равных условиях, залогом окончательного излечения больного.

Как только при осмотре больного заподозрен сепсис, необходимо принять все меры для немедленного бактериологического исследования и посева крови, мочи и отделяемого первичного очага.

При взятии проб крови для бактериологического исследования важно соблюдать технику взятия и определенные правила.

**Техника взятия проб крови.** Необходимо придерживаться асептической техники, чтобы исключить бактериальное загрязнение культуры. При правильном взятии проб в культуре крови присутствует только тот микроорганизм, который находится в крови пациента.

- Кровь следует брать из периферической вены. Нельзя использовать для этого постоянный катетер, который может быть загрязнен бактериями.
- Взятие крови проводят в стерильных перчатках. Место венепункции обрабатывают 2% раствором йода или другим антисептиком. Через 1–2 мин йод удаляют 70% раствором этанола (Этилового спирта<sup>\*</sup>). Необходимо убедиться, что кожа сухая. Крышку флаконов с культуральной средой, куда вносят образец крови, тоже необходимо продезинфицировать 70% раствором этанола (Этилового спирта<sup>\*</sup>).
- Кровь следует брать стерильным шприцем и иглой, стараясь не прикасаться руками к месту венепункции.
- Обязательно сменить иглу на шприце перед введением взятой пробы крови из шприца во флакон с культуральной средой через закрывающую его резиновую пробку. Это предупреждает попадание в культуру бактерий, которые могли попасть на иглу с кожи пациента. Никогда не снимать пробку с флакона с культуральной средой, так как это может привести к ее загрязнению бактериями из окружающей среды.



- Флаконы с культурой крови должны быть снабжены этикеткой с данными о пациенте и вместе с бланком-заявкой немедленно отправлены в лабораторию. Если кровь берут, когда лаборатория закончила работу, флаконы следует поместить в термостат при температуре 37 °С, чтобы мог начаться рост бактерий. В бланке-заявке на бактериологическое исследование крови важно указать клинические данные о пациенте (диагноз) и сведения о лечении антибиотиками.

Помимо техники для успешного обнаружения специфического возбудителя сепсиса, важно соблюдать определенные правила взятия проб крови для получения гемокультуры.

- Многократный в течение суток бактериологический посев крови (обычно не менее 3–5 раз/сут, кровь берут на фоне повышения температуры тела у пациента за 2–3 ч до ее максимального подъема в 2 флакона — для аэробов и анаэробов); при однократном посеве крови на гемокультуру максимально удается получить 80% положительных результатов, при двукратном — 90% и троекратном — 99%.
- Большинство методов, используемых в бактериологических лабораториях, дают положительный результат исследования гемокультуры при количестве бактерий от 10 до 15 в 1 мл крови; увеличение количества крови, взятой для исследования на гемокультуру с 2 до 20 мл, повышает вероятность получения положительного результата с 30 до 50% (за исключением новорожденных).
- У детей с сепсисом количество бактерий в 1 мл крови выше, чем у взрослых, поэтому объем взятия крови рассчитывают следующим образом: у детей до 10 лет — 1 мл крови на каждый год жизни, старше 10 лет — 20 мл.
- Оптимальное соотношение между количеством взятой крови для исследования и культуральной средой должно составлять 1:10.
- Не следует откладывать начало лечения антибиотиками для того, чтобы получить несколько проб крови в течение большого промежутка времени (с целью повысить вероятность положительного результата исследования гемокультуры).

Обнаружение источника сепсиса — непростая задача. Септический очаг при сепсисе может быть связан с предшествующим хирургическим вмешательством и последующими осложнениями в области операции, а может иметь ятрогенное происхождение, например, как следствие постинъекционного абсцесса.

В ряде случаев септическим очагом могут быть пневмония, легочное нагноение или эмпиема плевральной полости, гнойники кожи.

Около 60% пациентов с сепсисом приобретают его, находясь в больнице. — тяжелый вариант внутрибольничной инфекции. Это обусловлено тем, что все большее значение в лечении неотложных состояний приобретает широкое внедрение инвазивных пособий, необходимых для интенсивной терапии: длительная интубация трахеи, трахеостомия, при которых трахея неизбежно превращается в гнойную рану и может стать местом локализации септического очага.

Нередко развитие сепсиса связано с очагом инфекции в подкожной клетчатке или других соединительнотканых образованиях (костный мозг, суставы, забрюшинная клетчатка при панкреонекрозе и др.).

Вмешательство на мочевых путях, их постоянная катетеризация или мочевые свищи могут стать источником сепсиса, который обычно протекает с выраженной клинической картиной.

Очень часто септическим очагом становится брюшина при локализованном (внутрибрюшной абсцесс) или разлитом гнойном перитоните. Следует помнить, что септическим очагом могут служить желчевыводящие пути. Развитие сепсиса в таких случаях обусловлено бактериальным ангиохолитом и нарушением оттока инфицированной желчи. Кишечная микрофлора при любом сепсисе играет важную роль в формировании синдрома генерализованной воспалительной реакции. Однако не следует забывать, что развитие сепсиса может исходно определяться наличием тяжелого дисбактериоза и антибиотико-ассоциированного псевдомембранозного колита.

В последние годы септический очаг инфекции все чаще локализуется в различных отделах сердечно-сосудистой системы. Наиболее частой причиной такой формы сепсиса в настоящее время служат не столько гнойные тромбозы, сколько установка внутрисосудистых катетеров для длительной инфузионной терапии (один из вариантов такой ятрогении назван «катетерный сепсис»).

Отсутствие видимого источника инфекции или задержка раневого отделяемого при наличии катетера в крупных венозных сосудах требует тщательного осмотра места его введения. При сомнениях в асептичности и отсутствии других предполагаемых входных ворот обязательно удаление данного катетера с отсечением и посевом его кончика, а при необходимости — введение катетера для продолжения инфузионной терапии в другой сосуд.

У 25% больных с сепсисом не удается обнаружить источник инфекции; в этой ситуации показано назначение антибиотиков широкого спектра действия против как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий.

### 18.1.1.3. ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ КРОВИ

При посеве крови на гемокультуру бактериологическая лаборатория обычно ежедневно выдает промежуточные заключения о наличии или отсутствии роста бактерий на питательных средах. Окончательный ответ включает идентифицированный вид бактерий, выделенных из культуры, вместе со сведениями о чувствительности или устойчивости этого вида к антибиотикам.

Результаты посева крови распределяют на следующие три группы:

- нет роста бактерий;
- рост монокультуры (единственного вида бактерий) или чистой культуры;
- смешанный рост (выделено более одного вида бактерий).

Отсутствие роста бактерий может быть достоверным результатом в том случае, если кровь пациента действительно стерильна. Окончательный отрицательный результат лаборатория выдает, если через 10 дней после посева крови роста бактерий на культуральных средах не обнаружено. Однако следует учесть возможность того, что такой результат является ложноотрицательным, то есть у пациента есть бактериемия, но ее не удалось обнаружить. Возможные причины ложноотрицательного результата:

- содержание микроорганизмов в крови низкое, взятого количества крови недостаточно для получения роста культуры;
- до взятия крови больному было начато лечение антибиотиками (антибиотики, содержащиеся в крови взятой пробы, угнетают рост бактерий);
- времени, в течение которого проводили исследование, недостаточно для получения роста редких медленно растущих видов бактерий.

При получении монокультуры или смешанного роста оценка результата зависит от вида выделенных микроорганизмов и массивности роста.

Выделение патогенных видов бактерий с несомненностью свидетельствует об их этиологической роли в заболевании. В том случае, когда из крови выделены условно-патогенные микроорганизмы, иногда трудно решить: является ли полученный вид бактерий результатом бактериального загрязнения (ложноположительный результат) или отражает наличие сепсиса (положительный результат). Выделение одного вида микроорганизмов в чистой культуре из крови более веро-

ятно отражает наличие бактериемии, чем бактериальное загрязнение пробы, если:

- у больного из какого-либо другого очага инфекции был выделен тот же вид бактерий;
- при повторном взятии пробы крови был выделен тот же вид бактерий.

Смешанный рост указывает на то, что из культуры крови было выделено более одного вида бактерий. При сепсисе такой результат встречается редко, поэтому в большинстве случаев свидетельствует о загрязнении культуральной среды, особенно, если выделенные бактерии служат частью нормальной микрофлоры кожи.

Вместе с тем при оценке результатов бактериологических исследований необходимо понимать, что рост микрофлоры в крови — важный диагностический признак сепсиса, но только при наличии соответствующей клинической картины заболевания.

## 18.2. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МОЧИ

Бактериологический посев мочи — один из наиболее востребованных видов исследования. Обычно его назначают, чтобы подтвердить или исключить диагноз инфекции мочевых путей.

### 18.2.1. СТРОЕНИЕ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ МОЧЕВОЙ СИСТЕМЫ

Мочевая система состоит из почек и собственно мочевыводящих путей — мочеточников, мочевого пузыря и уретры (рис. 18.1).

Напомним, что моча образуется в структурной единице почки — нефроне. Кровь поступает в почку по почечной артерии и фильтруется в клубочке каждого нефрона. В результате процессов фильтрации образуется ультрафильтрат. В канальцевой системе нефрона (благодаря процессам реабсорбции и секреции) объем и состав ультрафильтрата меняются. При выходе из нефрона в нем остаются ненужные продукты обмена веществ, растворенные в небольшом количестве воды — это моча.

Выведение мочи наружу проходит по мочевым путям. Мочевая система состоит из почек и собственно мочевыводящих путей — мочеточников, мочевого пузыря и уретры. Окончательная моча изливается

в малые чашечки, представляющие выросты лоханки, которые охватывают сосочек почки. Чашечки малые (2–3) сливаются в большие, а они, в свою очередь, образуют лоханку почки. Лоханка переходит в мочеточник. Мочеточники соединяются с основанием мочевого пузыря, основная функция которого состоит в накоплении мочи и выводе ее при мочеиспускании через мочеиспускательный канал (уретру) из организма.

Нижняя полая вена,  
ведущая к сердцу

Почечная лоханка —  
полость для скопле-  
ния мочи

Правая почка

Корковое и  
мозговое ве-  
щества, содер-  
жащие около  
1 млн нефро-  
нов в каждой  
почке

Тазовый  
пояс

Мочевой  
пузырь

Мочеиспус-  
кательный канал

Аорта

Левая  
почка

Мочеточник

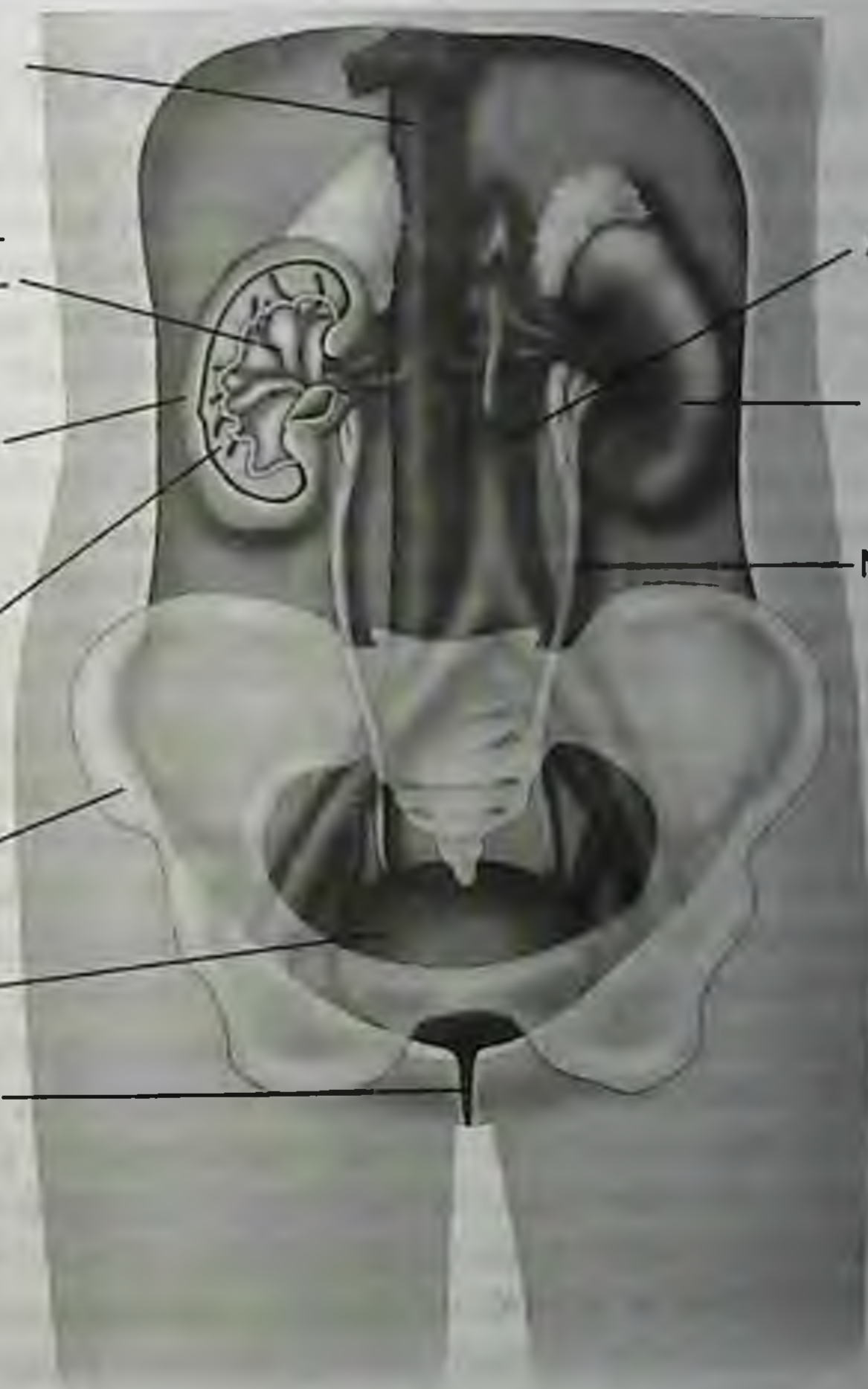


Рис. 18.1. Строение мочевыделительной системы

В норме мочевыводящие пути от почек до последней трети уретры не содержат бактерий, поэтому моча в мочевом пузыре у здоровых людей стерильна. Однако на коже промежности и в кале присутствуют бактерии, которые могут легко попадать в уретру. В связи с этим они

почти всегда присутствуют в нижней трети уретры, не вызывая каких-либо симптомов и заболеваний. Это обусловлено наличием ряда механизмов (иммунные и неиммунные), контролирующих бактериальное загрязнение уретры. Основной из неиммунных механизмов — механический очищающий эффект стерильной мочи, проходящей через уретру при мочеиспускании. Именно поэтому в норме моча стерильная или содержит очень малое количество бактерий.

## 18.2.2. ИНФЕКЦИИ МОЧЕВЫВОДЯЩИХ ПУТЕЙ

Инфекция мочевыводящих путей — одно из наиболее распространенных инфекционных заболеваний пациентов, как амбулаторных, так и госпитализированных. Инфицирование мочевыводящих путей и развитие в дальнейшем воспалительного заболевания чаще всего служит результатом проникновения в нее бактерий, в норме присутствующих в кишечнике или на коже. Выделяясь с калом при дефекации, бактерии кишечника попадают на кожу промежности, а с нее в уретру и мочевой пузырь. Помимо этого кожа промежности и сама по себе содержит бактерии, которые проникают в мочевыводящие пути. Бактерии женских половых путей (вагиналы) также инфицируют мочевой тракт, но значительно реже.

Инфекция мочевыводящих путей — термин, обозначающий инфекцию во всем мочевом тракте человека. Однако всегда необходимо стремиться более точно установить локализацию инфекции, от чего будет зависеть не только вид лечения, но и прогноз заболевания. Именно поэтому по локализации принято подразделять инфекцию верхних и нижних мочевыводящих путей. Инфицирование, а затем развитие воспалительного процесса в мочевом пузыре называют циститом (инфекция нижних мочевыводящих путей). Это наиболее частая инфекция мочевых путей. В случае восходящего распространения инфекции далее по мочевым путям (мочеточникам) в воспалительный процесс могут быть вовлечены лоханки и почечная паренхима. Воспаление лоханок и почек называют пиелонефритом (инфекция верхних мочевыводящих путей). Его встречают реже (в 30% случаев всех инфекций мочевого тракта), но он представляет для больного большую опасность, чем цистит. В ряде случаев пиелонефрит может стать источником проникновения бактерий в кровь и развития сепсиса. Хронический пиелонефрит при длительном течении может привести к развитию почечной недостаточности.

Восходящий путь инфицирования мочевых путей в клинической практике встречаются наиболее часто. Однако в ряде случаев бактерии,

присутствующие в крови, могут вызвать нисходящую инфекцию мочевого тракта, поражая сначала почки, а затем уже мочевые пути.

Инфицированию мочевого тракта способствуют следующие факторы.

- Пол — женщины болеют чаще, чем мужчины. Это обусловлено анатомическими особенностями строения уретры: у женщин она короткая и широкая, а также расположена близко к влагалищу и прямой кишке.
- Нарушение оттока мочи из мочевого пузыря (застой мочи) вследствие закупорки мочевыводящих путей камнем, опухолью, при заболеваниях предстательной железы (отсутствует очищающий эффект стерильной мочи).
- Госпитализация в стационар; около трети внутрибольничных инфекций — инфекции мочевыводящих путей.
- Беременность. Пиелонефрит — нередкое заболевание у беременных, поэтому все должны обследоваться на наличие инфекции мочевыводящих путей.
- Роды.
- У женщин в большинстве случаев инфекция мочевых путей связана с половой жизнью (соблюдение гигиены половой жизни и опорожнение мочевого пузыря до полового акта и после него уменьшают вероятность инфицирования).
- Сахарный диабет. Больные СД более подвержены инфекциям вследствие глюкозурии (моча, содержащая глюкозу, хорошая среда для роста), а также снижения иммунитета. Периодическое бактериологическое исследование мочи показано пациентам с СД.
- Пузырно-мочеточниковый рефлюкс — патологическое состояние, при котором инфицированная моча забрасывается из мочевого пузыря в мочеточники. Данную патологию наиболее часто встречают у маленьких детей, она представляет для них серьезную опасность. Постоянно присутствующий пузырно-мочеточниковый рефлюкс способствует проникновению инфекции в почки, развитию пиелонефрита, а в дальнейшем — сморщиванию почки.
- Воспаление половых органов при урогенитальных инфекциях.
- Охлаждение, запор, употребление веществ, раздражающих слизистую оболочку мочевого пузыря [метенамин (Гексаметилентетрамин\*, Уротропин\*)], облучение мочевого пузыря при лучевой терапии опухолей органов малого таза.

**Этиология.** Наиболее частыми возбудителями воспалительных заболеваний мочевого тракта служат грамотрицательные бактерии: *Escherichia coli*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas aeruginosa*,

*Streptococcus* группы D. Возбудителями также могут быть *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, *Mycoplasma* и др. Наиболее частым возбудителем воспалительных заболеваний мочевого тракта является *Escherichia coli*, которую во всем мире выделяют более чем у 80% амбулаторных пациентов.

**Клинические проявления** воспалительных заболеваний верхнего и нижнего отдела мочевого тракта существенно отличаются.

**Клинические симптомы цистита** включают:

- частые позывы к мочеиспусканию, даже при наличии небольшого количества мочи в мочевом пузыре;
- жгучая боль в процессе и сразу после мочеиспускания;
- иногда лихорадка.

При инфекции верхнего отдела мочевого тракта (пиелонефрит) больные чувствуют себя значительно хуже, чем при цистите.

**Основные клинические проявления пиелонефрита:**

- лихорадка и озноб;
- общее недомогание, иногда с тошнотой;
- боль в спине;
- иногда возможны симптомы цистита.

Для диагностики инфекций мочевого тракта проводят общий анализ мочи, стаканные пробы и бактериологический посев мочи.

### 18.2.3. ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ МОЧИ

Бактериоскопическое исследование мочи (исследование осадка из пробы мочи под микроскопом) дает минимальную клиническую информацию для диагностики инфекций мочевыводящих путей, поэтому в клинической практике его не используют.

Гарантированное подтверждение наличия или отсутствия бактерий и их идентификация возможны только при бактериологическом исследовании мочи (посев и выделение культуры). Однако моча в норме может содержать небольшое количество бактерий, происходящих из нижней трети уретры, поэтому только установление факта (рост колоний при посеве мочи на специальных средах) присутствия бактерий (бактериурии) недостаточно для постановки диагноза инфекции мочевыводящих путей.

Достоинство бактериологического исследования в том, что оно, помимо установления вида микроорганизма, позволяет определить и количество бактерий. Рост любых бактерий на культуральной среде в чашке Петри проявляется в виде образования колоний на поверхно-



сти среды. Каждая колония содержит тысячи микроорганизмов, произошедших от одной единственной бактерии, находившейся в моче. Число колоний прямо отражает число бактерий в моче. Подсчитав количество колоний (колониобразующих единиц — КОЕ), выросших при посеве известного объема мочи, можно определить начальную концентрацию бактерий в исследуемой моче. Если моча стерильна, то колоний может не быть.

Основная задача при интерпретации полученных результатов бактериологического исследования — доказательство этиологической роли микроорганизмов, выделенных из мочи с заболеванием. При этом должны учитывать целый комплекс факторов:

- степень бактериурии;
- вид выделенного микроорганизма;
- повторность его выделения в процессе заболевания;
- присутствие в моче монокультуры или ассоциации микроорганизмов.

Рост более 100 000 КОЕ/мл (более  $1 \times 10^5$  КОЕ/мл) в свежесвыделенной моче позволяет поставить диагноз инфекции мочевыводящих путей. Однако в настоящее время доказано, что инфекция мочевыводящей системы может возникать и при количестве бактерий меньшем даже чем  $1 \times 10^3$  КОЕ/мл, тем не менее значение более  $1 \times 10^5$  КОЕ/мл остается главным ориентиром в диагностике инфекций.

Клинически значимой бактериурией (то есть бактериурией, которая свидетельствует об инфекции мочевого тракта) у взрослых считают:

- $\geq 10^3$  бактерий/мл средней порции мочи у женщин с острым циститом;
- $\geq 10^4$  бактерий/мл средней порции мочи у женщин с острым пиелонефритом;
- $\geq 10^5$  бактерий/мл средней порции мочи у женщин или  $\geq 10^4$  уропатогенов/мл средней порции мочи у мужчин (или в моче, полученной с помощью катетера у женщин) с осложненной инфекцией мочевыводящих путей (острый цистит и пиелонефрит);
- любое количество бактерий в моче, полученной путем надлобковой пункции мочевого пузыря.

Асимптоматической бактериурией (то есть бактериурией, которую определяют у пациентов, не предъявляющих каких-либо жалоб) считают обнаружение  $\geq 10^5$  одного и того же вида бактерий в 1 мл мочи в 2 последовательных анализах, взятых с интервалом более 24 ч. Выделение данной формы бактериурии важно с практической точки зрения. Большинство исследователей не рекомендуют лечение асимптоматической бактериурии.

У детей диагноз инфекции мочевыводящих путей устанавливают на основании следующих критериев бактериологического исследования мочи.

- При посеве мочи из мочеприемника значимым считают только отрицательный результат.
- Обнаружение любого количества бактерий в моче, полученной с помощью надлобковой пункции мочевого пузыря.
- Обнаружение в моче коагулазонегативных стафилококков в концентрации  $\geq 300$  КОЕ/мл.
- Обнаружение в моче, полученной с помощью катетера, бактерий в концентрации  $10^4$ – $10^5$  КОЕ/мл.
- При исследовании средней порции мочи: обнаружение бактерий в концентрации  $10^4$  КОЕ/мл с симптомами инфекции мочевыводящих путей или  $10^5$  КОЕ/мл в 2 образцах мочи, взятых с интервалом более 24 ч у детей без симптомов инфекции мочевыводящих путей.
- Значимая пиурия: обнаружение 10 лейкоцитов/мл в сочетании с концентрацией бактерий  $10^4$ – $10^5$  КОЕ/мл, полученной с помощью катетера, у детей с лихорадкой позволяют провести дифференциальную диагностику между инфекцией и контаминацией (обсеменением), пиелонефритом и асимптоматической бактериурии.

**Особенности бактериологического обследования различных категорий пациентов.** Бактериологическое исследование мочи не считают обязательным методом исследования у женщин с циститом. Оно показано при сохранении у женщин симптомов цистита или их рецидивах в течение 2 нед. Бактериологическое исследование мочи необходимо выполнять всем пациентам с острым пиелонефритом.

Бактериологическая диагностика инфекций мочевыводящих путей у беременных имеет свои особенности. У большинства женщин бактериурия возникает еще до беременности. У 20–40% женщин с асимптоматической бактериурией ( $\geq 10^5$  бактерий одного и того же вида в 1 мл средней порции мочи в 2 последовательных анализах, взятых с интервалом 24 ч) во время беременности развивается острый пиелонефрит. Частота ложноположительных результатов однократного культурального исследования средней порции мочи может достигать 40%. В связи с этим всем женщинам с положительным результатом бактериологического исследования необходимо проводить повторный посев мочи через 1–2 нед, уделив особое внимание туалету наружных половых органов перед мочеиспусканием. После завершения лечения бактериологическое исследование мочи проводят спустя 1–4 нед, а также повторно перед родами.

## 18.3. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КАЛА ПРИ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЯХ

Возбудители, которые выделяют при воспалительных процессах в кишечнике, могут быть истинно патогенными (возбудители дизентерии — палочки рода *Shigella*, возбудители брюшного тифа, паратифов и токсикоинфекций — бактерии рода *Salmonella*), но в основном служат представителями нормальной микрофлоры кишечника.

Бактериологическое исследование кала на наличие возбудителей кишечных инфекций проводят с целью:

- установления этиологии заболевания;
- контроля перед выпиской из лечебного учреждения для обнаружения бактериовыделителей среди выздоравливающих;
- обследования лиц, подозрительных на хроническое заболевание;
- обследования лиц, подозрительных как источник инфекции при вспышках заболевания;
- обследования работников объектов питания, лечебных и детских учреждений;
- обследования здоровых лиц в окружении больного с кишечной инфекцией.

Среди кишечных инфекций можно выделить три основные группы, которые имеют наибольшее значение для клинической практики:

- группа кишечных инфекций сальмонеллезной этиологии, к которой относят брюшной тиф, паратиф А и В, а также токсикоинфекции;
- дизентерия, вызываемая бактериями рода *Shigella*;
- колиэнтериты, вызываемые кишечной палочкой (*E. coli*).

Не все виды микроорганизмов рода *Salmonella* играют активную роль в патологии человека. Именно поэтому для клинической практики очень важно определение вида сальмонелл. Бактериологическое исследование считают единственным методом установления вида сальмонелл и, соответственно, их этиологической роли в формировании заболевания.

В отношении дизентерии задачи диагностики несколько проще. В настоящее время общепризнанно, что дизентерия вызывается бактериями рода шигелл (*Shigella*), поэтому выделение в чистой культуре из кала палочек рода *Shigella* будет свидетельствовать именно об этой этиологии заболевания.

Среди кишечных палочек (*E. coli*) встречаются такие, которые способны вызывать энтериты и колиты, проявляющиеся клинически

большой вариабельностью от умеренной диареи до тяжелого холероподобного заболевания. В основном заболевания возникают у маленьких детей в возрасте 1–2 года. Однако эти бактерии способны вызывать заболевания также у детей старшего возраста и взрослых. Иногда эти заболевания клинически протекают как дизентерия. Именно поэтому при обследовании больных с кишечными инфекциями, помимо поиска сальмонелл и шигелл, нужно исследовать биоматериал (кал) на кишечную палочку. При этом бактериологическая лаборатория должна установить штамм *E. coli*, который позволит отнести его к энтеропатогенным (например, штамм O124), то есть считать этиологическим фактором заболевания.

В кишечнике обитает большое количество бактерий, которые являются нормальной микрофлорой, участвующей в переваривании пищи, синтезе ряда витаминов. Среди этих микроорганизмов существуют установившиеся качественные и количественные соотношения. Однако при ряде ситуаций, например, длительном приеме пациентом антибиотиков для лечения инфекции мочевых путей, установившиеся качественные и количественные соотношения между микроорганизмами могут существенно изменяться, что приводит к возникновению различных кишечных расстройств — кишечного дисбактериоза. Для суждения об этиологической роли возникших нарушений в соотношении микроорганизмов при этих расстройствах проводят бактериологическое исследование кала на дисбактериоз.

### 18.3.1. САЛЬМОНЕЛЛЕЗНАЯ ИНФЕКЦИЯ

Обнаружение возбудителей брюшного тифа, паратифа А и В и токсикоинфекции занимает в клинической практике значительное место. Это имеет не только диагностическое, но и большое эпидемиологическое значение. Своевременно установленный диагноз брюшного тифа позволяет быстро госпитализировать больного, что уменьшает тяжесть и длительность заболевания, и провести все необходимые противоэпидемические мероприятия. Тщательный контроль перед выпиской пациента обеспечивает выявление бактерионосителей, которые в дальнейшем требуют наблюдения и бактериологического контроля в профилактических целях.

Бактериологическое исследование считают единственным методом определения вида сальмонелл. Еще большую роль бактериологические исследования играют при стертых и неясных формах заболевания.

Для этиологической диагностики сальмонеллезной инфекции важно не упустить возможность обнаружения тифозных и паратифозных бактерий у больных. Для этого прежде всего необходимо в каждый период течения заболевания исследовать соответствующий биологический материал.

Учитывая закономерности развития сальмонеллезной инфекции, для повышения вероятности обнаружения сальмонелл необходимо придерживаться следующих правил исследования биоматериала:

- из крови легче всего выделить бактерии на 1–2-й неделе заболевания (бактериемия);
- из кала — начиная со 2–3-й недели заболевания, а также у бактерионосителей [при пищевом отравлении (токсикоинфекция) бактерии можно выделить из кала в первые дни заболевания];
- из мочи — с конца 2-й недели заболевания, а также у некоторых бактерионосителей;
- из желчи (дуоденальное содержимое) — в течение всего заболевания, а также у бактерионосителей.

### 18.3.2. ДИСБАКТЕРИОЗ КИШЕЧНИКА

Организм человека и его микрофлора — единая экологическая система, находящаяся в состоянии динамического равновесия. Состав микрофлоры здоровых людей относительно постоянен, несмотря на влияние различных факторов внешней среды. Микрофлора кишечника представляет собой высокочувствительную индикаторную систему, которая реагирует количественными и качественными сдвигами на изменения состояния здоровья организма, с другой стороны — может влиять на состояние здоровья человека.

Под дисбактериозом следует понимать, с одной стороны, качественное и количественное изменение под влиянием ряда экзо- и эндогенных факторов нормальной микрофлоры кишечника, нарушение ее функций и биологических свойств. Кроме того, возможно размножение различных условно-патогенных бактерий, которые в норме совсем отсутствуют или составляют незначительную часть микрофлоры. Необходимо учитывать, что дисбактериоз кишечника — не самостоятельное заболевание, а нарушение равновесия в качественном и количественном составе микрофлоры кишечника. В тех случаях, когда изменения микрофлоры кишечника приводит к нарушению ее основных функций, развивается клиническая симптоматика дисбактериоза, которая, однако, не имеет специфических проявлений.

Основные функции нормальной микрофлоры кишечника:

- защитная — создание иммунологического барьера для патогенных микроорганизмов;
- участие в процессе пищеварения (окончательное переваривание пищи);
- синтез витаминов и ферментов;
- участие в регуляции моторики желудочно-кишечного тракта;
- поддержание постоянства биохимической среды желудочно-кишечного тракта;
- иммуномодулирующая.

Дисбаланс этих функций определяет клинические проявления кишечного дисбактериоза. Нарушения количественного или качественного состава микрофлоры кишечника чаще проявляются неустойчивым аппетитом, снижением массы тела, избыточным газообразованием, изменением частоты и характера стула, развитием железовитаминно-дефицитной анемии. Тяжелые формы дисбактериоза кишечника приводят к нарушению иммунного статуса и развитию инфекционных осложнений, в том числе сепсиса.

Несмотря на то что патогенетическое значение дисбактериоза кишечника в развитии кишечных расстройств у человека известно давно, ему стали уделять серьезное внимание лишь в последние десятилетия. Это объясняют тем, что антибиотики и химиопрепараты все шире применяют в клинической практике, и накапливается все больше данных, свидетельствующих об отрицательном влиянии этих лекарственных средств на микрофлору кишечника. Это способствует повышенной встречаемости дисбактериоза.

Бактериологическая диагностика кишечного дисбактериоза основана на количественной и качественной оценке содержания различных видов бактерий, которые обитают в кишечнике. При дисбактериозе резко нарушается равновесие в составе микрофлоры. Для оценки нарушений качественного и количественного состава микрофлоры кишечника необходимо располагать сведениями о составе микрофлоры здоровых людей. Нормальное содержание основных видов бактерий в кале приведено в табл. 18.1.

Основными показателями нормальной микрофлоры кишечника служат кишечная палочка (преобладание) и особенно бифидо- и лактобактерии.

У здоровых грудных детей микрофлора кишечника отличается однообразием, ее основой являются бифидобактерии, которые составляют до 98% всей микрофлоры, их обнаруживают в кале количеством до  $10^8-10^{12}$ .

Таблица 18.1. Нормальное содержание основных видов бактерий в кале

Показатели и виды бактерий	Нормальные значения
Общее количество кишечной палочки ( <i>E. coli</i> ), из них:	$10^{7-8}$
ферментирующие лактозу	$\geq 90\%$
лактозонегативные	$< 5\%$
с гемолитической активностью	Нет
Бактерии рода <i>Proteus</i>	$< 10^2$
Другие условно-патогенные энтеробактерии	$< 10^4$
Неферментирующие бактерии	$10^4$
Бактерии <i>Enterobacter</i> (энтерококк)	$10^{5-8}$
Стафилококки гемолитические ( <i>S. aureus</i> и др.)	Нет
Стафилококки ( <i>Staphylococcus epidermidis</i> и др.)	$10^4$
Бифидобактерии	$10^{9-10}$
Лактобактерии	$10^{7-8}$
Бактероиды	$10^7$
Клостридии	$< 10^5$
Дрожжевые грибы	$< 10^3$

Патологические отклонения в составе микрофлоры кишечника могут существенно варьировать. В большом проценте случаев находят атипичные разновидности кишечной палочки, которые обладают выраженной гемолитической активностью. Нередко отмечают развитие гнилостных микроорганизмов рода *Proteus* (протей), а также грибов *Candida*, увеличение числа кокковых форм, в том числе пиогенного гемолизирующего стафилококка.

Количественное содержание бактерий, не характерных для нормальной микрофлоры кишечника, при дисбактериозе значительно повышается. Количественные сдвиги особенно относятся к бифидобактериям. Более чем в 80% случаев при дисбактериозе бифидобактерии отсутствуют, в остальных случаях их содержание не превышает  $10^7$ . Резкое снижение количества бифидобактерий, даже при отсутствии других сдвигов, следует всегда расценивать как проявление дисбактериоза. В значительно меньшем числе случаев дисбактериоз характеризуется резким снижением числа кишечной палочки.

Вместе с тем необходимо придерживаться следующего правила: для констатации состояния дисбактериоза кишечника важно повторное его выявление, то есть необходимо в течение 10–14 дней повторить исследование кала для подтверждения диагноза.

## 18.4. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ОТДЕЛЯЕМОГО ЖЕНСКИХ ПОЛОВЫХ ОРГАНОВ

Воспалительные заболевания женских половых органов занимают 1-е место (55–70%) в структуре гинекологической заболеваемости. Значительная доля среди них приходится на инфекции влагалища и шейки матки. У женщин репродуктивного возраста вагиниты (воспаление влагалища) обусловлены наличием бактериального инфицирования (40–50%), развитием кандидоза (20–25%) и трихомониаза (10–15%).

Бактериологическое исследование влагалищного отделяемого играет важную роль в диагностике воспалительных заболеваний нижнего отдела половых органов. Главное достоинство метода в том, что он позволяет не только обнаружить общие признаки воспалительного процесса (наличие в отделяемом влагалища лейкоцитов и макрофагов), но и установить инфекционный агент, вызвавший воспалительный процесс.

Наиболее часто для диагностики характера воспалительного процесса во влагалище в клинической практике проводят бактериоскопию мазков, полученных из влагалища и цервикального канала, и лишь в отдельных случаях бактериологический посев отделяемого.

### 18.4.1. НОРМАЛЬНАЯ МИКРОФЛОРА ВЛАГАЛИЩА И ШЕЙКИ МАТКИ

В диагностике воспалительных процессов половых путей женщины важнейшую роль играет изучение микрофлоры отделяемого. Влагалище и шейку матки рассматривают как экологические ниши микроорганизмов. Условия обитания микроорганизмов во влагалище и шейке матки отличаются особенностями рН среды, свойствами эпителия, выстилающего поверхность этих анатомических образований. При рождении влагалище стерильно, но уже на 1-й неделе жизни оно заселяется микроорганизмами, преимущественно грамположительной флорой, состоящей из анаэробных бактерий, стафилококков, стрептококков, дифтероидов, рН среды влагалища составляет 7,0. В период полового созревания эпителий утолщается, в нем возрастает уровень гликогена и микрофлора начинает меняться с преобладанием лактобацилл, а реакция влагалищного отделяемого становится кислой, рН 4,4.

Лактобациллы (влагалищные палочки, палочки Дедерлейна) — нормальные обитатели влагалища у женщин детородного возраста. Для



влагалища женщины репродуктивного возраста в норме характерно (табл. 18.2):

- небольшое число микроорганизмов, 95% из которых составляют лактобациллы;
- концентрация лактобацилл, составляющая  $10^5$ – $10^7$  КОЕ/мл;
- низкая концентрация других микроорганизмов (условно-патогенная флора).

Таблица 18.2. Видовой состав нормальной микрофлоры влагалища

Микроорганизмы	Содержание, частота обнаружения
Общее количество микроорганизмов	$10^5$ – $10^7$ /мл
Факультативные (облигатные) лактобациллы	>90%
Другие микроорганизмы, из них:	<10%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	36,6%
Бифидобактерии	50%
<i>Candida albicans</i>	25% (у беременных до 40%)
<i>Gardnerella vaginalis</i>	40–50%
<i>Ureaplasma hominis</i>	70%
Кишечная палочка	В небольшом количестве
Стафилококки и стрептококки	
Анаэробная микрофлора (бактероиды, пепто-стрептококки, клостридии)	

В состав нормальной микрофлоры входят также единичные кокки и мелкие палочки. В небольших количествах в норме может присутствовать условно-патогенная микрофлора: *Gardnerella vaginalis*, кишечная палочка, *Ureaplasma hominis*, *Mycoplasma hominis*, стафилококки и стрептококки, бактероиды, клостридии и др. Микрофлора у каждой женщины индивидуальна, сравнительно постоянна и несколько изменяется в различные периоды менструального цикла. Сочетания микроорганизмов могут быть самыми разнообразными. Состав бактериальной флоры зависит от гормональных факторов, приема медикаментов и сексуальных контактов.

У женщин в постменопаузе лактобациллы постепенно уступают место коккам, грамположительным диплококкам, мелким палочкам. Бактериальная флора в постменопаузе обычно бывает скудной.

Содержимое цервикального канала в норме стерильно. Лишь у наружного зева матки в слизистой пробке могут быть обнаружены микроорганизмы (преимущественно лактобациллы) как результат контаминации (загрязнения) микрофлорой влагалища.

Микроорганизмы, составляющие нормальную микрофлору влагалища, находятся между собой в разнообразных взаимоотношениях (нейтрализм, конкуренция, синергизм, паразитизм и др.). На фоне преобладания кислотопродуцирующих микроорганизмов (лактобацилл) создается оптимально кислая среда в шейке матки и влагалище, что и обуславливает равновесие между различными видами бактерий, колонизирующих женские половые пути. Нормальная бактериальная флора выполняет защитную роль, препятствуя инвазии патогенных микроорганизмов, а любая инвазия в здоровый эпителий почти всегда сопровождается изменениями микрофлоры влагалища. Изменение численности того или иного вида микроорганизмов или появление не свойственных данному месту обитания бактерий служит одной из важных причин развития воспалительных заболеваний влагалища и шейки матки.

Для оценки состояния микрофлоры влагалища в клинической практике длительное время использовали бактериологическую классификацию, в которой выделяют 4 степени чистоты с учетом количества лактобацилл, наличия условно-патогенных бактерий, лейкоцитов, эпителиальных клеток.

**Степень I.** В мазках эпителиальные клетки и чистая культура лактобацилл. Реакция влагалищного содержимого кислая (рН 4,0–4,5).

**Степень II.** Небольшое количество лейкоцитов, лактобацилл меньше, имеются другие сапрофиты, преимущественно грамположительные диплококки, реакция содержимого остается кислой (рН 5,0–5,5).

**Степень III.** Большое количество клеток эпителия, лейкоциты. Лактобациллы в незначительном количестве, разнообразная кокковая флора; реакция содержимого слабокислая или основная (рН 6,0–7,2).

**Степень IV.** Клетки эпителия, много лейкоцитов, разнообразная гноеродная флора при полном отсутствии влагалищной палочки, реакция основная (рН выше 7,2).

В настоящее время очевидна условность данной классификации и недостаточная ее информативность. В ней не учитывают многообразие видов нормальной микрофлоры, их взаимоотношения, а также возможное присутствие патогенных возбудителей, таких как гонококки, трихомонады, грибы, хламидии и др. Именно поэтому данная классификация утрачивает свое практическое значение.

## 18.4.2. ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ ВЛАГАЛИЩА И ШЕЙКИ МАТКИ

Нарушение соотношения количественного уровня различных видов микроорганизмов или видового состава ассоциаций бактерий влагалища приводит к возникновению воспалительных процессов в последнем.

Все воспалительные процессы гениталий делят на неспецифические и специфические, вызванные инфекцией, передающейся половым путем.

Неспецифические воспалительные процессы вызываются условно-патогенной флорой и имеют две клинические формы — неспецифические вагиниты и бактериальный вагиноз.

**Неспецифические вагиниты** — инфекционно-воспалительные заболевания влагалища, обусловленные действием условно-патогенных микроорганизмов (кишечная палочка, стрепто-, стафилококки и др.). При неспецифических вагинитах в мазках обнаруживают большое количество лейкоцитов (от 30 до 60 в поле зрения и более), ключевые клетки отсутствуют, но достаточно много клеток слущенного эпителия влагалища. Как правило, обнаруживают несколько видов микроорганизмов. В целом микроскопическая картина характерна для воспалительного экссудата.

**Бактериальный вагиноз** — неспецифический (похожий на воспалительный) процесс, при котором во влагалищном отделяемом не обнаруживают патогенных возбудителей (на его долю приходится 40—50% всех инфекционных вагинитов). В настоящее время бактериальный вагиноз рассматривают как дисбактериоз влагалища, в основе которого лежит нарушение количественного уровня различных видов микроорганизмов или их видового состава.

Наиболее информативным лабораторным методом диагностики бактериального вагиноза считают обнаружение в мазках, окрашенных по Граму, ключевых клеток (слущенных клеток влагалища, покрытых большим количеством мелких грамтрицательных бактерий). Эти клетки определяют у 95% пациенток, в то время как у здоровых женщин их нет. Кроме ключевых клеток, в пользу бактериального вагиноза при бактериоскопии свидетельствует наличие мелких бактерий при отсутствии лактобацилл.

Концентрация различных факультативных (*Gardnerella vaginalis*) и анаэробных (бактероиды) бактерий при бактериальном вагинозе выше, чем у здоровых женщин. Фактически общая концентрация бактерий во влагалище возрастает до  $10^{11}$  КОЕ/мл. Большие концентрации этих бактерий влекут изменения в состоянии влагалища. Уменьшение количества лактобацилл приводит к снижению образования молочной

кислоты и повышению рН. У больных бактериальным вагинозом рН влагалища находится в пределах 5,0–7,5.

*Gardnerella vaginalis* (выявляют у 71–92% больных, составляет более 5% всех представителей микрофлоры) и другие анаэробы способствуют интенсификации процессов отторжения эпителиальных клеток, особенно в условиях алкалоза, что приводит к образованию патогномичных (характерных для данной патологии) ключевых клеток.

Вследствие увеличения количества факультативных анаэробов при бактериальном вагинозе возрастает продукция аномальных аминов (продукты метаболизма бактерий, содержащие азот). Амины при увеличении вагинального рН становятся летучими, обуславливая типичный «рыбный запах» влагалищного отделяемого. Для его выявления проводят амино-тест. При добавлении 10% раствора КОН к капле влагалищного секрета появляется этот специфический запах (тест положительный).

Наличие большого количества лейкоцитов (признак воспаления) в мазках из влагалища не характерно для бактериального вагиноза.

Критерии постановки диагноза бактериального вагиноза:

- клинические симптомы — жалобы на выделения из влагалища, часто с неприятным запахом, усиливающиеся после менструации и полового контакта, зуд, жжение в области гениталий;
- положительный амино-тест;
- рН вагинального отделяемого  $>4,5$ ;
- ключевые клетки в мазках, окрашенных по Граму;
- отсутствие в мазках лактобацилл;
- отсутствие в мазках признаков воспаления (нет лейкоцитов или их мало).

Для установления диагноза необходимо наличие не менее двух из перечисленных критериев.

Специфические воспалительные процессы половых органов вызываются патогенными микроорганизмами. Наиболее часто специфические (инфекционные) вагиниты обусловлены хламидиями, гонококками, трихомонадами и грибами рода *Candida*.

**Хламидиоз.** Возбудитель хламидиоза — хламидии, облигатные внутриклеточные паразиты (то есть присутствуют только в клетках тканей). Их можно рассматривать как грамотрицательные бактерии, которые утратили способность синтезировать АТФ и ряд других ферментных систем, иными словами, утратили способность выработки метаболической энергии. Этот дефект обуславливает их внутриклеточный рост, из-за которого они имеют доступ к богатым энергией промежуточным продуктам метаболизма клеток хозяина.

У женщин хламидии вызывают цервициты, сальпингиты, воспалительные заболевания органов малого таза, уретрит, перигепатит. В результате у женщин может развиваться бесплодие. Считается, что около 80% трубного бесплодия вызвано хламидиями. При любой локализации инфекции может развиваться соответствующая симптоматика заболевания. В то же время болезнь может протекать бессимптомно (примерно в 50% случаев у женщин), но передаваться половым путем партнерам.

В настоящее время диагностика хламидийных инфекций основана на выделении возбудителя в культуре клеток («золотой стандарт»). Бактериологический метод считают одним из наиболее чувствительных и специфичных для диагностики хламидиоза. Однако он требует специальной методики (выращивание на культуре ткани), которая не всем доступна. Именно поэтому используют методы, позволяющие обнаружить антиген *Chlamydia trachomatis* в исследуемом материале (метод флуоресцирующих антител, ИФА, ПЦР).

**Гонорея.** Возбудитель гонореи — гонококк. При исследовании влагалищных мазков для гонореи характерны внутриклеточное расположение гонококков (в лейкоцитах), их бобовидная форма и отрицательная окраска по Граму. Для окончательного подтверждения диагноза проводят бактериологический посев отделяемого влагалища, выделение гонококков в чистой культуре и их идентификацию. Однако выделить культуру гонококков довольно трудно. Это обусловлено их слабой природной жизнеспособностью, которая не позволяет широко использовать бактериологический метод (дает положительные результаты в 20–30% случаев). Именно поэтому используют методы, позволяющие обнаружить антиген гонококков (ИФА, ПЦР).

**Трихомониаз** относят к специфическим воспалительным заболеваниям женских половых органов (на его долю приходится 15–20% всех инфекционных вагинитов). Заболевание вызывается *Trichomonas vaginalis* — микроорганизмом, относящимся к простейшим. Трихомонады способны вызывать выраженную воспалительную реакцию с некрозом слизистой оболочки шейки матки и образованием эрозий. Диагностика трихомониаза основана на бактериоскопическом обнаружении влагалищных трихомонад. Следует отметить, что не всегда при микроскопическом исследовании сразу удается выявить трихомонады (только в 40–80%). Именно поэтому необходимо брать материал для исследования повторно.

Диспансерное наблюдение с исследованием мочи и отделяемого из влагалища у женщин, перенесших трихомониаз, следует проводить в течение не менее двух менструальных циклов.

Кандидоз половых органов вызывается дрожжеподобными грибами рода *Candida* (на его долю приходится 20–25% всех инфекционных вагинитов). Для диагностики кандидоза проводят микроскопическое исследование взятого из очага поражения материала (результаты исследования положительны в 40–60% случаев). При кандидозе половых органов в острый период заболевания во влагалищном отделяемом обнаруживают в незначительном количестве лактобациллы, или они отсутствуют (в среднем составляют 16,6% всей микрофлоры). У 75% больных рН влагалища находится в пределах 5–5,5, что весьма информативно для диагностики кандидоза. Присутствие мицелия и спор во влажных мазках, обработанных 10% раствором КОН, подтверждает диагноз.

### 18.4.3. ОСОБЕННОСТИ ВЗЯТИЯ ОТДЕЛЯЕМОГО ЖЕНСКИХ ПОЛОВЫХ ОРГАНОВ ДЛЯ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Взятие биологического материала для бактериоскопического и бактериологического (посев) исследования из влагалища и шейки матки проводит врач-гинеколог. Тем не менее медицинская сестра оказывает врачу помощь при выполнении этой процедуры и должна знать особенности взятия и приготовления биоматериала к исследованию.

После введения зеркала и подъемника во влагалище биоматериал для исследования берут стерильным ватным тампоном из заднего свода или с патологически измененных участков слизистой оболочки влагалища. Тампон погружают в стерильную пробирку и закрывают стерильной пробкой. Биоматериал для бактериологического посева должен быть взят до проведения мануального исследования.

После обнажения шейки матки в зеркалах влагалищную часть ее обрабатывают стерильным ватным тампоном, смоченным стерильным 0,9% раствором натрия хлорида или водой. После этого тонким ватным тампоном (стерильным), осторожно введенным в шейный канал (не касаясь стенок влагалища), берут материал для исследования. Тампон погружают в стерильную пробирку и закрывают стерильной пробкой.

Одновременно со взятием биологического материала на посев следует приготовить мазки на стекле (не менее двух) для бактериоскопии. Биоматериал для мазков берут другим ватным тампоном (стерильным) и переносят на чистое предметное стекло. При их приготовлении необходимо равномерно распределить материал по предметному стеклу мягкими движениями, не применяя грубого втирания и резких штрихо-

вых движений тампоном. Такая техника выполнения мазка позволяет клеткам распределяться слоями, не повреждая их, сохраняя истинное распределение и количественное соотношение компонентов взятого биоматериала, наблюдать под микроскопом внутриклеточное расположение бактерий (например, гонококков). После высушивания при комнатной температуре мазки покрывают чистым предметным стеклом (или помещают в чашку Петри), четко маркируют с указанием данных пациента и места взятия биоматериала, и отправляют в лабораторию. Хранение влажного мазка, сдавленного между двумя предметными стеклами, недопустимо.

Взятый биологический материал должен быть доставлен в лабораторию в ближайшие 1–2 ч. При невозможности выполнить эти требования тампоны с биоматериалом для бактериологического посева необходимо поместить в специальную транспортную среду (обеспечивает сохранность биоматериала в течение 24 ч). Хранить взятые пробы нужно в холодильнике.

## 18.5. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МОКРОТЫ

Сбор мокроты для бактериологического исследования применяют в клинической практике для установления этиологии гнойно-воспалительных заболеваний нижних дыхательных путей (пневмония, бронхит, плеврит, бронхоэктатическая болезнь, абсцесс легкого и др.). Своевременная идентификация инфекционного возбудителя очень важна и для правильного выбора антибактериального препарата для лечения больного.

Возбудителями гнойно-воспалительных процессов нижних дыхательных путей могут быть бактерии, микоплазмы, риккетсии, грибы и простейшие. Наиболее частыми возбудителями среди бактерий являются *Staphylococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* и др.

Для бактериологического исследования мокроту следует собирать до начала антибактериальной терапии или через определенный промежуток времени после введения препарата, необходимый для его выведения из организма больного (перед введением очередной дозы препарата). Собирают утреннюю порцию мокроты и немедленно отправляют в лабораторию. Можно хранить мокроту до отправки в лабораторию в холодильнике при 4 °С не более 2–3 ч.

Бактериологическое исследование мокроты включает приготовление и бактериоскопию мазка мокроты и бактериологический посев для получения чистой культуры.

Окраска мазка мокроты по Граму — наиболее распространенный метод окраски всех видов материала, полученного от больного с заболелением нижних дыхательных путей (мокрота, бронхоальвеолярный смыв и др.), для быстрого и ориентировочного установления инфекционного агента. С помощью бактериоскопии мазка мокроты, окрашенного по Граму, проводят предварительную оценку возможного этиологического агента. Окрашенный по Граму мазок мокроты исследуют до посева ее на питательные среды также и с целью оценки пригодности для культивирования и идентификации вероятного возбудителя. Мокроту считают пригодной, если в мазке, окрашенном по Граму, при малом увеличении микроскопа обнаруживают более 25 лейкоцитов и менее 10 эпителиальных клеток в поле зрения. Признаками качественного образца мокроты, который можно использовать для культивирования, считают преобладание в ней лейкоцитов над эпителиальными клетками, а также наличие бактерий одного вида, которые располагаются внутри лейкоцитов или вокруг них. Грамположительные бактерии в препарате имеют темно-синюю окраску, а грамотрицательные — розовую. Возбудители атипичных пневмоний (микоплазмы, легионеллы, риккетсии и хламидии) не окрашиваются по Граму, поэтому для их выявления в основном используют серологические методы.

Посев мокроты производят на ряд питательных сред, которые инкубируют при температуре 37 °С в течение 18–24 ч. Из выросших колоний выделяют чистую культуру, идентифицируют их и определяют чувствительность к антибактериальным препаратам.

Окраску мазков мокроты по Цилю–Нильсену используют для идентификации кислотоустойчивых бацилл, в первую очередь микобактерий туберкулеза. Препарат готовят из гнойных частиц мокроты, которые выбирают из 4–6 разных мест. Отобранные частицы тщательно растирают между 2 предметными стеклами до гомогенной массы. Высушивают на воздухе, фиксируют над пламенем горелки. Окрашивают по Цилю–Нильсену. Микобактерии туберкулеза окрашиваются в красный цвет, все остальные элементы мокроты и бактерии — в синий. Микобактерии туберкулеза имеют вид тонких, слегка изогнутых палочек различной длины, с утолщениями на концах или посередине, располагаются они группами и поодиночке. Обнаружение микобактерий туберкулеза служит наиболее достоверным признаком туберкулеза легких. Метод окраски мазков по Цилю–Нильсену при активных формах туберкулеза легких обладает чувствительностью 50% и специфичностью 80–85%.



Бактериологический посев мокроты на микобактерии туберкулеза используют для подтверждения этиологии заболевания легких. Это достаточно длительное исследование, так как микобактерии растут медленно, и окончательный результат бактериологического исследования лаборатория выдает примерно через 45 дней.

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ

1. На какие царства разделяют микроорганизмы?
2. Перечислите основные группы микроорганизмов.
3. В каких клинических ситуациях проводят посев крови на гемокультуру?
4. Что такое бактериемия?
5. Чем сепсис отличается от бактериемии?
6. Каковы основные причины сепсиса?
7. Опишите клиническое состояние больных сепсисом.
8. Перечислите основные особенности посева крови на гемокультуру при сепсисе.
9. Стерильна ли моча у здорового человека?
10. Какие факторы способствуют инфицированию мочевыводящих путей?
11. Перечислите клинические симптомы цистита.
12. Чем бактериоскопическое исследование мочи отличается от бактериологического?
13. Какое количество бактерий в моче свидетельствует об инфекции мочевого тракта?
14. Перечислите основные группы кишечных инфекций.
15. Перечислите основные функции нормальной микрофлоры кишечника.
16. Что такое дисбактериоз кишечника?
17. Какие виды микроорганизмов типичны для влагалища женщины репродуктивного возраста в норме?
18. Какие степени чистоты используют в клинической практике для оценки состояния микрофлоры влагалища?
19. Что такое вагиноз?
20. Чем вагинит отличается от вагиноза?
21. Какие бактерии являются наиболее частыми возбудителями гнойно-воспалительных процессов нижних дыхательных путей?
22. Для чего используют окраску мазков по Цилю–Нильсену?

## 18.6. ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для идентификации вида возбудителя гнойно-воспалительных заболеваний и определения чувствительности к АБС бактериологические лаборатории используют комплекс методов. Они включают микроскопическое исследование мазка (бактериоскопия) из доставленного биологического материала, выращивание культуры микроорганизмов (культивирование), идентификацию бактерий, определение чувствительности к антимикробным лекарственным средствам и оценку результатов исследования.

### 18.6.1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ, ФИКСАЦИЯ И ОКРАСКА МАЗКОВ-ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ БАКТЕРИОСКОПИИ

Для обнаружения микроорганизмов, грибов и вирусов в лаборатории исследуют выделения, жидкости и ткани организма больного, содержащие наибольшее количество возбудителей: кровь, СМЖ, содержимое кожных высыпаний, носоглоточное отделяемое, испражнения, мочу и прочие биологические материалы. В первую очередь эти пробы биологического материала подвергают микроскопическому исследованию — бактериоскопии.

Бактериоскопия — лабораторный метод исследования, в основе которого лежит изучение свойств и структур микроорганизмов под микроскопом.

Для изучения производят микроскопирование как живых, так и убитых микроорганизмов в неокрашенном и окрашенном виде. Микроскопический препарат готовят на предметном стекле с хорошо отшлифованными краями. Предметные стекла, употребляемые при микробиологическом исследовании, должны быть кристально чисты и абсолютно обезжирены. На поверхности обезжиренного стекла вода легко расплывается и не образует капель шаровидной формы. Исследование бактерий в окрашенном препарате позволяет не только изучить их морфологию, но и получить представление о некоторых особенностях их химического строения.

Приготовление мазков-препаратов для бактериоскопии состоит из нескольких последовательных операций: приготовление мазка, высушивание, фиксация и окраска.

### 18.6.1.1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ И МАЗКОВ

Исследование микроорганизмов в живом состоянии применяют главным образом для изучения формы и подвижности бактерий. Для проведения бактериоскопии готовят два варианта нативного препарата (препарат на предметном стекле, покрытый покровным стеклом): висячая и раздавленная капля.

Для приготовления висячей капли используют предметное стекло с лункой (рис. 18.2). Из доставленной пробы биологического материала или с жидкой питательной среды маленькую каплю материала переносят на чистое обезжиренное покровное стекло; если используют плотный биологический материал или культуру микроорганизмов с плотной питательной среды, то на покровное стекло предварительно наносят маленькую каплю стерильного 0,9% раствора натрия хлорида, затем бактериологической петлей прикасаются к пробе (культуре) и приставшие к ней бактерии размещают на покровном стекле в приготовленной капле. В том и другом случае на покровное стекло накладывают предметное стекло с лункой посередине, края которой предварительно смазаны вазелином. Предметное стекло слегка прижимают к покровному, в результате оба стекла склеиваются. После этого препарат переворачивают покровным стеклом кверху. Получается герметически закрытая камера, в которой капля долго не высыхает.

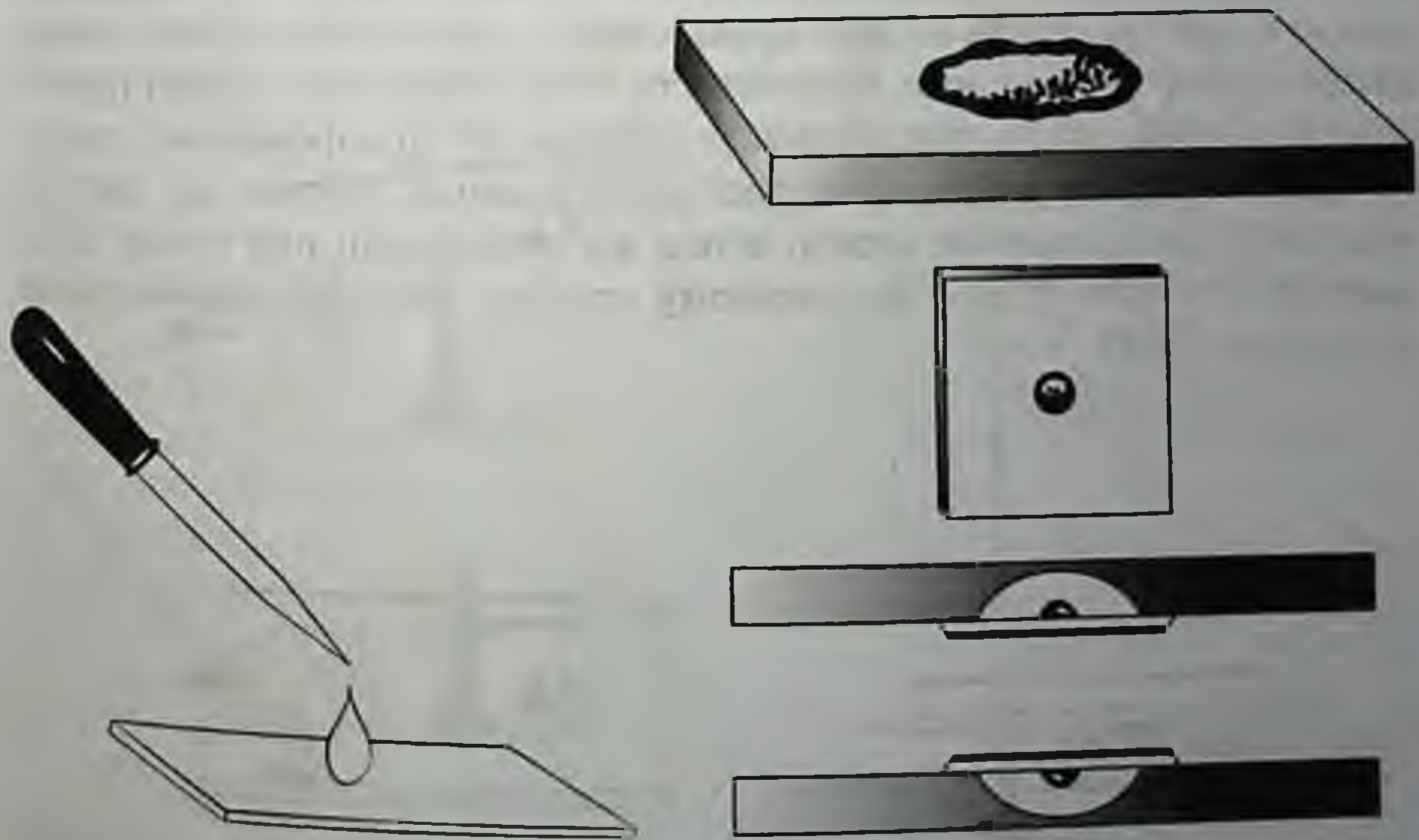


Рис. 18.2. Приготовление препарата висячей капли

При приготовлении раздавленной капли материала наносят на предметное стекло и сверху накладывают покровное. Каплю материала надо брать такой величины, чтобы она заполняла все пространство между покровным и предметным стеклом и не выступала за края покровного.

Технология приготовления мазков, которые в дальнейшем будут окрашиваться, может существенно отличаться. Следует четко понимать, что материалом для приготовления мазков для бактериоскопии могут быть пробы биологического материала, доставленные в лабораторию, а также культуры микроорганизмов, выращенные в лаборатории после посева проб биологического материала на питательные среды (жидкие и твердые).

Из материала, взятого у больного (гной, мокрота), удобно делать мазки следующим образом: материал прокаленным и остуженным пинцетом или петлей наносят на середину предметного стекла, затем плотно прикрывают его другим предметным стеклом, помещая его так, чтобы осталась свободная левая треть нижнего стекла и правая треть верхнего стекла (рис. 18.3). Взяв за свободные концы оба стекла, раздвигают их в стороны обеими руками: получаются два равномерных больших мазка.

Для приготовления мазка крови из флакона с пробой (кровью), поступившего в лабораторию, с соблюдением условий асептики с помощью стерильной иглы небольшую каплю крови наносят на предметное стекло и быстро, чтобы не дать крови свернуться, делают мазок: стекло кладут на горизонтальную поверхность и придерживают левой рукой; правой рукой к капле придвигают под углом  $45^\circ$  шлифованное стекло, по краю которого равномерно растекается капля. Тотчас же, плотно прижимая шлифованное стекло в том же положении под углом, продвигают его налево по предметному стеклу, получая равномерный мазок (рис. 18.4).

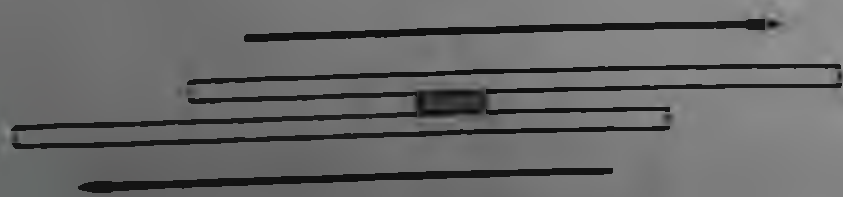


Рис. 18.3. Приготовление мазка из гноя

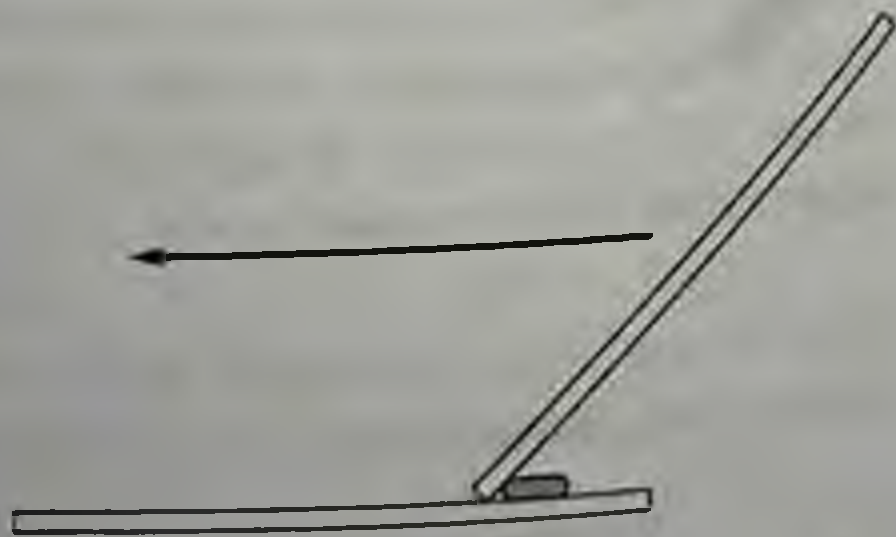


Рис. 18.4. Приготовление мазка крови

Для приготовления препаратов, которые в дальнейшем будут окрашивать, из жидкой пробы биологического материала или культур, выращенных на жидких питательных средах, берут каплю пробы или культуры петлей или пастеровской пипеткой и, поместив каплю на середину сухого чистого предметного стекла, равномерно распределяют ее в форме мазка. При приготовлении мазка очень важно соблюдать правила взятия бактериальной пробы или культуры (рис. 18.5).

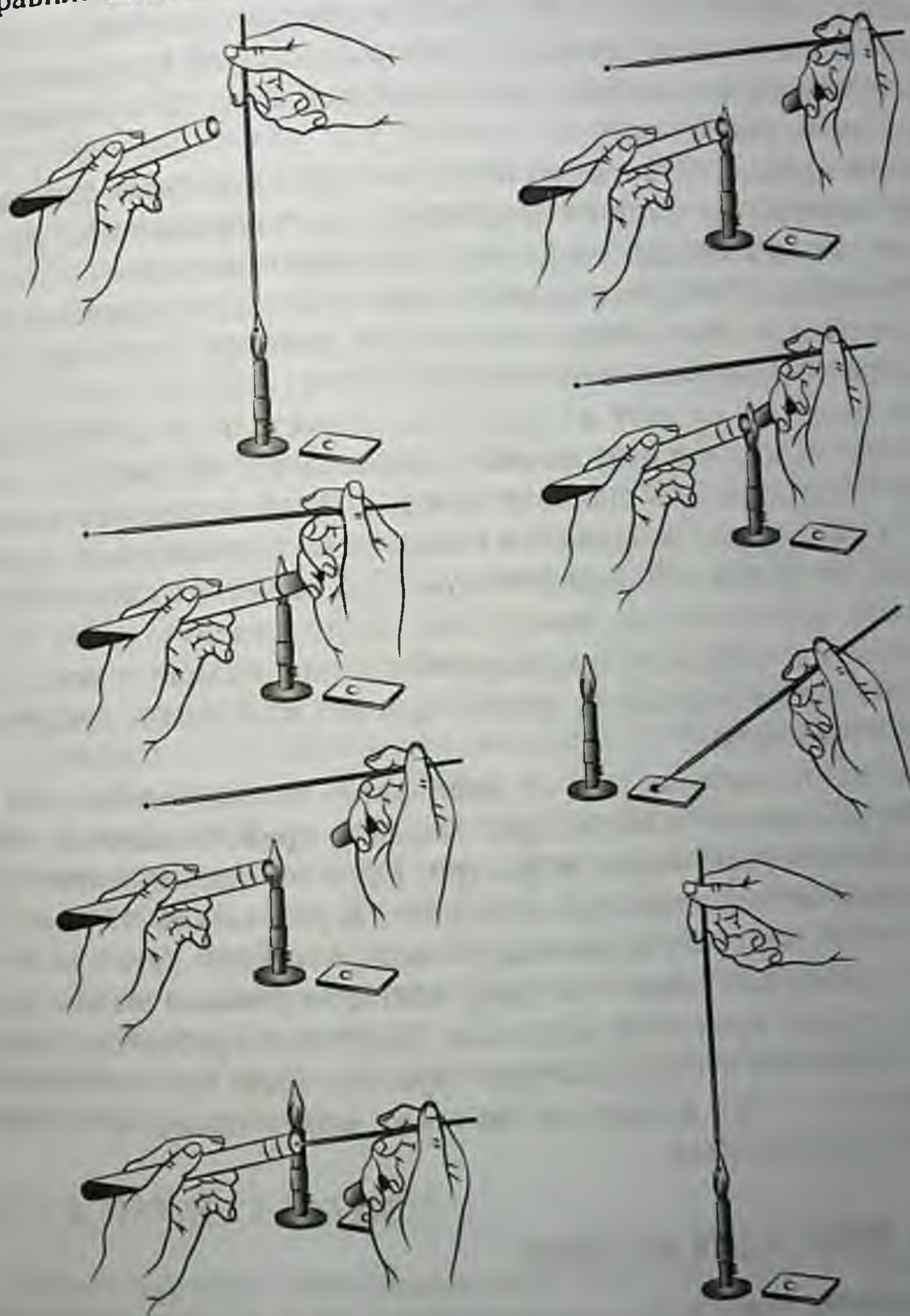


Рис. 18.5. Приготовление мазка-препарата

- Нагревают до покраснения бактериальную петлю в пламени горелки.
- Берут пробирку с исследуемой пробой или культурой в левую руку так, чтобы видеть поверхность среды. Вращательным движением вынимают пробку из пробирки, прижимая ее мизинцем и безымянным пальцем правой руки к ладони.
- Обжигают край пробирки, осторожно вводят петлю и берут исследуемый материал.
- Вынимают петлю, обжигают край пробирки и закрывают пробкой.
- Взятый материал осторожно распределяют по предметному стеклу тонким слоем, после чего бактериальную петлю стерилизуют в пламени спиртовки.
- Если препарат готовят из бактериальной культуры, выращенной на плотной среде, то на предметное стекло предварительно наносят каплю стерильного физиологического раствора.
- После приготовления мазка петлю тотчас же, не выпуская из рук, стерилизуют в пламени горелки, а пипетку опускают в сосуд с дезинфицирующим раствором.

Если препарат готовят из культуры, выросшей на плотной среде, то предварительно наносят каплю стерильного 0,9% раствора натрия хлорида на предметное стекло и далее, соблюдая правила асептики, берут петлей немного материала и часть его погружают в каплю раствора, слегка растирая в ней, а остаток культуры на петле сжигают в пламени горелки. Остудив петлю, приступают к изготовлению мазка: сначала краем петли культуру равномерно размещивают в капле, а затем, положив петлю всей плоскостью, равномерными круговыми движениями распределяют каплю.

После приготовления мазков-препаратов их высушивают на воздухе при комнатной температуре. Хорошо приготовленный тонкий мазок высыхает равномерно и быстро. Если же высушивание препарата замедлено, то препарат подогревают, держа стекло мазком вверх, в струе теплого воздуха высоко над пламенем горелки. Это нужно производить крайне осторожно, не допуская перегревания мазка, так как при этом может произойти слишком быстрое и грубое свертывание микробных белков, что нарушит их структуру. Если препарат высушен не полностью, то при фиксации это также может привести к нарушению структуры бактерий.

### 18.6.1.2. ФИКСАЦИЯ МАЗКОВ

Высушенные мазки подвергают фиксации, в результате которой бактерии погибают и плотно прикрепляются к поверхности

стекла. Существует два способа фиксации мазков — термический и химический.

Наиболее простым, пригодным почти для всех объектов и самым распространенным в микробиологии служит фиксация жаром — нагреванием мазка в пламени горелки. Большим и указательным пальцем (или пинцетом) препарат берут за край стекла мазком вверх и несколько раз помещают в верхнюю, наиболее горячую часть пламени горелки. Вся манипуляция занимает 5–6 с, причем препарат подвергают действию пламени не более 2 с. Быстроту и кратность проведения препарата через пламя регулируют ощущением жжения: если препарат хорошо зафиксирован, то стекло при легком прикосновении им к тыльной поверхности левой руки тотчас по окончании фиксации слегка обжигает кожу. При излишнем перегревании мазок портится вследствие сильного изменения структуры клеток; недостаточная же фиксация не достигает цели, так как мазок смывается при последующей окраске. В ряде случаев (например, при исследовании мазка крови, изучении тонких структур клетки простейших и спирохет) фиксацию жаром применять нельзя.

При химическом методе фиксации мазков в качестве фиксаторов используют растворы формалина, спирты, ацетон, пары осмиевой кислоты и др. В лабораторной практике используют следующие вещества:

- 95% раствор этанола (Этиловый спирт<sup>4</sup>), время фиксации — 10–15 мин;
- метиловый спирт, время фиксации — 2–3 мин;
- ацетон, время фиксации — 5 мин;
- смесь равных объемов этилового спирта и эфира (по Никифорову), время фиксации — 10–15 мин.

Для проведения фиксации предметное стекло с высушенным мазком погружают в стеклянную или пластиковую емкость с фиксирующим веществом на срок 10–15 мин и затем высушивают на воздухе. В качестве приспособлений для фиксации и окраски мазков могут быть использованы описанные при окраске мазков крови рельс-штативы, кюветы и различные ванночки.

Высушенные и фиксированные мазки должны быть сразу же подвержены окрашиванию.

### 18.6.1.3. ОКРАСКА МАЗКОВ

Методы окраски микроорганизмов разнообразны и многочисленны. Наиболее широкое распространение получили методы окраски мазков по Граму и Цилю–Нильсену.

### 18.6.1.3.1. Окраска мазков по Граму

Окрашивание по Граму широко распространено в микробиологии. Метод был разработан датским ученым Гансом Кристианом Грамом в 1884 г. Бактериоскопическое исследование мазков по Граму почти всегда применяют в качестве первого шага при диагностике бактериальных инфекций, так как это один из самых простых и быстрых способов дифференциации бактерий в зависимости от состава их клеточной стенки. Окрашивание по Граму позволяет выявить, к грамположительным или грамотрицательным относятся те или иные бактерии, что позволяет провести предварительную оценку этиологического агента инфекционного заболевания.

Деление бактерий на Грам(+) и Грам(-) осуществляют в соответствии со строением их клеточной стенки. Клеточная стенка в наибольшем количестве содержит сложное вещество — пептидогликан, которое обеспечивает поддержание формы бактериальной клетки, осмотическую защиту, а также антигенные функции. У различных бактерий толщина слоя пептидогликана не одинакова. У бактерий, которые относят к грамположительным, она составляет от 15 до 80 нм, в то время как у грамотрицательных — от 2 до 8 нм. В то же время у грамотрицательных бактерий под слоем пептидогликана есть особая структура, которой нет у грамположительных бактерий — периплазматическое пространство. Оно заполнено гидролитическими ферментами —  $\beta$ -лактамазой, рибонуклеазой 1, фосфатазой. Именно эти ферменты ответственны за резистентность грамотрицательных бактерий в отношении многих антибиотиков. Кроме того, у грамотрицательных бактерий поверх клеточной стенки имеется дополнительная мембрана, препятствующая проникновению ненужных веществ.

Различное строение клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий приводит к тому, что грамотрицательные бактерии хуже воспринимают краситель из-за более сложного строения клеточной стенки и выглядят под микроскопом как окрашенные в розовый цвет, а грамположительные более активно накапливают краситель, поэтому окрашиваются в синий или фиолетовый цвет.

Окраску по Граму относят к сложному способу окраски, когда на мазок воздействуют двумя красителями, из которых один является основным, а другой — дополнительным. Кроме красящих веществ при сложных способах окраски применяют обесцвечивающие вещества: спирты, кислоты и др. Для выполнения окраски по Граму необходимо использовать готовые или приготовить следующие реактивы.



- Карболовый раствор генцианового фиолетового (генцианвиолет): красителя 1 г, 96% раствора этанола (Этилового спирта<sup>♦</sup>) 10 мл, кристаллической карболовой кислоты 2 г, дистиллированной воды 100 мл. В фарфоровой ступке растирают краситель с карболовой кислотой до консистенции кашицы, прибавляют небольшими порциями этанол (Этиловый спирт<sup>♦</sup>) и окончательно разводят водой, сливают в бутылку, оставляют на сутки, затем фильтруют.
- Раствор Люголя: йодит калия 2 г, дистиллированной воды 10 мл, йод кристаллический 1 г. Смесь хорошо укупоривают, оставляют на сутки, после чего добавляют 300 мл дистиллированной воды.

Окрашивание производят на штатив-рельсах в несколько этапов (рис. 18.6).



Рис. 18.6. Этапы окраски мазков по Граму

- На фиксированный мазок накладывают небольшие кусочки фильтровальной бумаги и наливают раствор генцианового фиолетового (основной краситель); генцианвиолет обладает высокой проницаемостью сквозь бактериальные оболочки.
- Окраска длится 1–2 мин, после чего генцианвиолет сливают и снимают окрашенную фильтровальную бумагу.
- Мазок заливают раствором Люголя на 1 мин; раствор Люголя — соединение йода с йодидом калия, что придает ему хорошую водорастворимость. Соединяясь с генцианвиолетом, который проник в клеточные стенки бактерий после первого этапа окрашивания, йод образует прочное соединение сине-фиолетового цвета, при этом мазок темнеет.

- Сливают раствор Люголя.
- Мазок несколько раз погружают в сосуд с 96% раствором этанола (Этилового спирта<sup>4</sup>) или ацетоном до тех пор, пока стекающие с мазка капли не сравняются по цвету со спиртом в стакане. Этот этап окраски позволяет провести дифференциацию, то есть разделение грамположительных и грамотрицательных бактерий, так как синеватый комплекс вымывается спиртом из стенок грамотрицательных бактерий, оставаясь только в стенках грамположительных.
- Мазок промывают дистиллированной водой.
- Чтобы грамотрицательные бактерии не казались бесцветными при бактериоскопии, мазок дополнительно окрашивают водным раствором фуксина в течение 1–2 мин. Поскольку в стенке грамположительных бактерий уже есть краситель, они фуксином не окрашиваются, а грамотрицательные бактерии приобретают розовый цвет.
- Мазок окончательно промывают водой, высушивают, и препарат готов к микроскопированию.

### 18.6.1.3.2. Окраска мазков по Цилю–Нильсену

Окраску мазков по Цилю–Нильсену применяют для дифференциации кислотоустойчивых бактерий (возбудителей туберкулеза и лепры) от некислотоустойчивых. Кислотоустойчивые бактерии характеризуются, прежде всего, медленной скоростью роста, общими морфологическими особенностями, а также устойчивостью к кислотам и некоторым другим химическим веществам. Из-за последнего свойства такие бактерии плохо поддаются окраске обычными разведенными красителями. Метод назван по именам немецких исследователей — микробиолога Франца Циля и патологоанатома Фридриха Нильсена, разработавших его в 1882–1883 гг. В настоящее время исследование мазка мокроты, окрашенного по Цилю–Нильсену, — один из наиболее широко используемых методов диагностики туберкулеза легких.

Сущность метода окраски по Цилю–Нильсену в том, что клеточная стенка кислотоустойчивых бактерий отличается высоким содержанием липидов. Они с трудом окрашиваются, но затем удерживают основной краситель при обесцвечивании кислотой. Некислотоустойчивые бактерии легко окрашиваются, а затем легко обесцвечиваются кислотой и окрашиваются дополнительным красителем.

Материалом для приготовления мазков и их окраски по Цилю–Нильсену служат: отделяемое зева и носа, мокрота, содержащее бронхов, полученное при бронхоскопии или при отсасывании через трахеостому, экссудаты; резецированные ткани, СМЖ и др.

Самым простым методом обнаружения микобактерий туберкулеза в выделениях больных служит микроскопия мазка, приготовленного из мокроты. Для приготовления мазка из мокроты выбирают частицы из 4–6 разных мест, распределяют по предметному стеклу (на 2/3 его поверхности) с помощью другого предметного стекла до получения достаточно тонкой ажурной сеточки.

Если материалом для исследования служит СМЖ, то мазки готовят из осадка ликвора после центрифугирования и фибринозной пленки, образовавшейся при свертывании фибрина, в которую захватываются микобактерии туберкулеза. Техника приготовления аналогична подготовке мазка крови: на край предметного стекла наносят каплю СМЖ, шлифованным краем другого стекла (или пластикового шпателя) под углом 45° выравнивают каплю по стеклу и затем быстрым движением с небольшим нажимом распределяют по стеклу, не доходя до его края на 1–1,5 см.

Полученные мазки тщательно высушивают и затем фиксируют сухим жаром. Фиксации достигают посредством несильного нагревания (примерно до 70 °С) предметного стекла, которое для этого трижды проводят над пламенем спиртовки мазком вверх. Можно фиксировать мазки и в 96% растворе этанола (Этилового спирта\*) в течение 10–15 мин.

Для проведения окраски мазков по методу Циля–Нильсена необходимы следующие реактивы.

- Насыщенный спиртовой раствор фуксина: 3 г основного фуксина растворяют в 100 мл 96% раствора этанола (Этилового спирта\*).
- Рабочий раствор фуксина: 5 г кристаллов фенола медленно нагревают до расплавления, доливают 90 мл дистиллированной воды, затем в полученный раствор фенола добавляют 10 мл насыщенного раствора фуксина.
- Серной кислоты 25% раствор: к 75 мл дистиллированной воды осторожно долить 25 мл концентрированной серной кислоты, постепенно наслаивая ее по стенкам сосуда, а затем смешать. Манипуляцию следует проводить с крайней осторожностью.
- Метиленовый синий 0,3% раствор: 0,3 г метиленового синего растворяют в 100 мл дистиллированной воды.

Для окраски мазков по Цилю–Нильсену лучше использовать готовые наборы реактивов в составе:

- реагент 1 — карболовый фуксин Циля 1 флакон (100 мл);
- реагент 2 — солянокислый спирт (концентрат) 1 флакон (10 мл);
- реагент 3 — метиленовый синий 1 флакон (100 мл).

Окрашивание по методу Циля–Нильсена состоит из следующих этапов:

- на мазок, находящийся на предметном стекле, накладывают фильтровальную бумагу;
- затем на фильтровальную бумагу наносят 1,5–2,0 мл фуксина Циля;
- предметное стекло с мазком нагревают на пламени спиртовки или газовой горелки до появления пара (1–2 мин), не доводя до кипения;
- после появления пара предметному стеклу нужно дать остыть до комнатной температуры;
- повторяют процедуру нагревания еще 2 раза, а затем дают подогретому мазку остыть;
- смывают фуксин с предметного стекла дистиллированной водой, предварительно убрав бумагу;
- мазок помещают в раствор серной кислоты или наносят 2 мл кислоты на мазок до полного обесцвечивания (1–3 мин);
- на обесцвеченный мазок наносят раствор метиленового синего на 1–2 мин;
- мазок промыть дистиллированной водой и высушить для дальнейшего исследования под микроскопом.

В целом при окраске мазков по методу Циля–Нильсена можно выделить четыре этапа.

- Этап I — под действием фуксина Циля мазок окрашивается в красный цвет; обычными методами споры и микобактерии окрасить невозможно — вследствие особенностей своего химического состава они не воспринимают анилиновые красители при обычном режиме окраски. Чтобы их окрасить, необходимо использовать сочетанное действие трех факторов: повышенной концентрации краски, обработки кислотой и повышенной температуры (так называемое термокислотное протравливание).
- Этап II — мазок обязательно нужно выдержать некоторое время на воздухе для охлаждения, иначе стекло на следующем этапе может лопнуть.
- Этап III — обесцвечивание мазка кислотой: споры и микобактерии не обесцвечиваются (свойство кислотоустойчивости) и остаются красными; все остальное — обесцвечивается.
- Этап IV — окрашивание мазка метиленовой синькой: споры и микобактерии эту краску не воспринимают и остаются красными, а другие клетки, вегетативная часть пробы исследуемого материала и все бактерии (за исключением микобактерий) окрасятся в синий цвет.

### 18.6.1.3.3. Аппараты, устройства и приспособления для окраски мазков

Для окраски мазков для бактериоскопии используют различные автоматические устройства и станции, которые позволяют стандартизировать эти операции и повысить качество мазков. Наиболее простым вариантом автоматического устройства для окраски мазков по Граму и Цилю–Нильсену служит аппарат для окраски мазков АОМ-1 российского производства (рис. 18.7).



Рис. 18.7. Аппарат для окраски мазков АОМ-1

Данный автоматический прибор позволяет проводить окраску до 25 мазков в одном штативе, осуществляет промывку мазков в ванночках с проточной водой и сушку образцов потоком воздуха с предустановленной аппаратом температурой.

Прибор для автоматического окрашивания мазков по Граму PREVI Color Gram фирмы БиоМерье (рис. 18.8) позволяет стандартизировать окраску мазков по Граму, обладает высокой производительностью (30 мазков за 5 мин), прост и надежен в работе.



Рис. 18.8. Автоматизированная система PREVI Color Gram

## 18.6.2. МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МАЗКА

Окрашенный мазок подвергают микроскопическому исследованию. Результаты микроскопии позволяют предположительно судить о характере микрофлоры, ее количественном содержании и соотношении различных видов микроорганизмов в биологическом материале.

При микроскопии в мазках можно обнаружить бактерии, грибы (при кандидозе), простейшие (при трихомониазе). Важным моментом при проведении исследования служит оценка морфологии, то есть формы бактерий, их размеров и расположения. Важным также считают количество (от скудного до массивного) и отношение к красителям (грамположительные и грамотрицательные клетки).

Отдельным видам бактерий с достаточным постоянством присущи определенные формы и размер. Выделяют три основные формы бактерий (рис. 18.9):

- шаровидные;
- палочковидные;
- извитые.

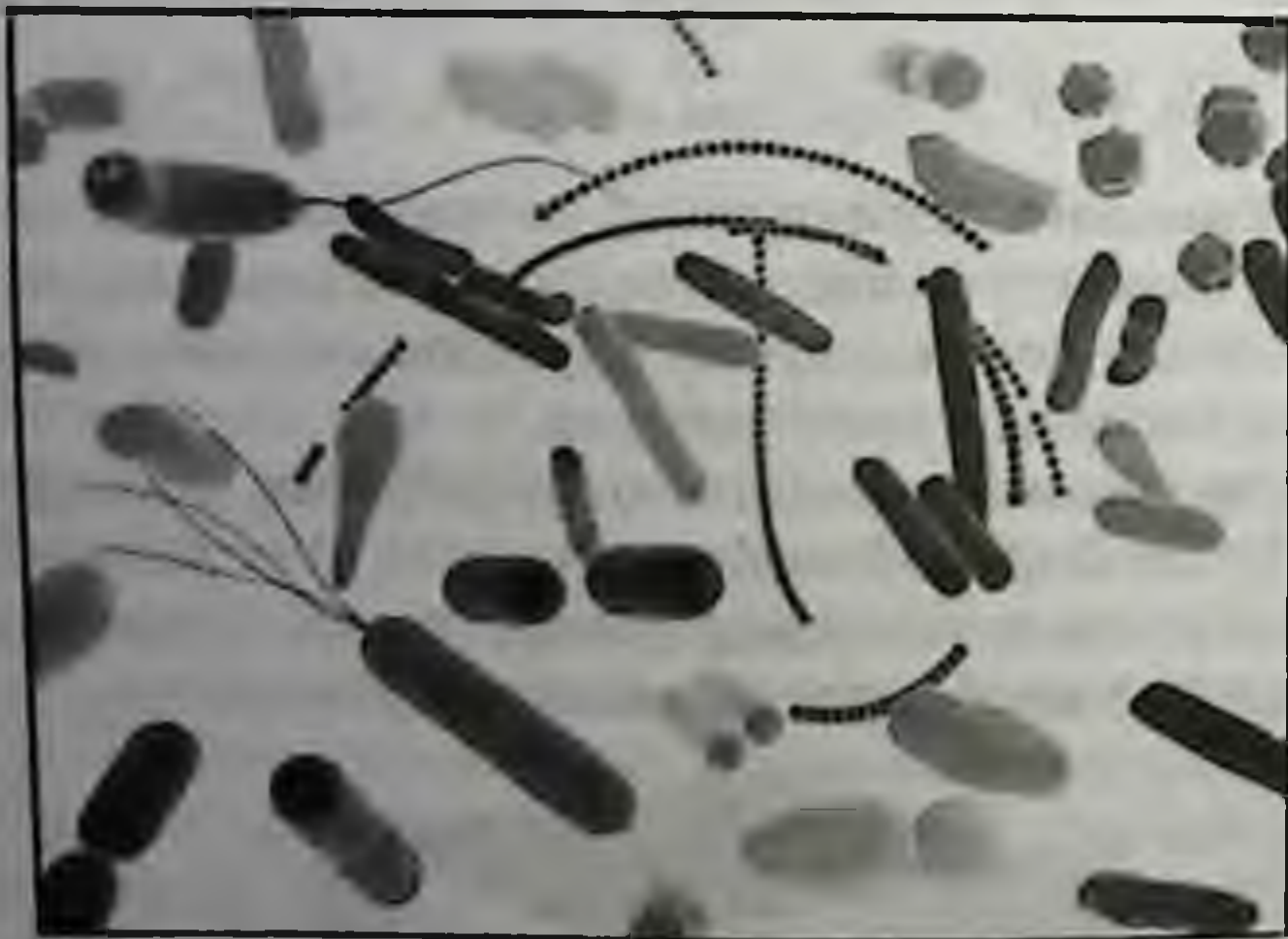


Рис. 18.9. Формы бактерий

Шаровидные бактерии, или кокки, имеют шаровидную либо овальную форму. По характеру расположения клеток в мазках выделяют:

- микрококки — отдельно расположенные клетки;
- диплококки — располагаются парами;
- стрептококки — клетки округлой или вытянутой формы, составляющие цепочку;

- сарцины — располагаются в виде «пакетов» из 8 кокков и более;
- стафилококки — кокки, расположенные в виде грозди винограда.

Палочковидные бактерии имеют форму палочек, концы которых могут быть заостренными (у фузобактерий), закругленными (у сальмонелл, псевдомонад), утолщенными (у коринебактерий), обрубленными (у бацилл), расщепленными, расширенными. Палочки могут быть правильной (например, энтеробактерии, псевдомонады) и неправильной (например, коринебактерии) формы, в том числе ветвящиеся, например, у актиномицетов. По характеру расположения клеток в мазках выделяют:

- монобактерии — расположены отдельными клетками;
- диплобактерии — расположены по две клетки;
- стрептобактерии — после деления образуют цепочки клеток.

Палочковидные бактерии могут образовывать споры, например бациллы и клостридии.

Извитые бактерии имеют изогнутое тело в один или несколько оборотов:

- вибрионы — изогнутость тела не превышает одного оборота;
- спирохеты — изгибы тела в один или несколько оборотов.

Размер бактерий измеряют в микро- и нанометрах. Средние размеры бактерий составляет  $2-3 \times 0,3-0,8$  мкм. Форма и размер — важные диагностические признаки. Способность бактерий изменять свою форму и величину называют полиморфизмом.

Тело бактерии состоит из цитоплазмы (с различными включениями) и цитоплазматической мембраны, окруженных клеточной стенкой. Цитоплазма занимает основной объем бактериальной клетки. Важнейшим компонентом ее служит нуклеотид, который считают эквивалентом ядра, он расположен в центральной зоне бактерии. Кроме нуклеотида, в цитоплазме находятся плазмиды, служащие факторами наследственности (их может быть от 1 до 200). Цитоплазматическая мембрана ограничивает цитоплазму (участвует в транспорте питательных веществ). Между клеточной стенкой и цитоплазматической мембраной находится пространство — периплазма, содержащая ферменты. Клеточная стенка — прочная структура, придающая бактерии определенную форму. По типу строения клеточной стенки бактерии подразделяют на грамположительные с толстой клеточной стенкой и грамотрицательные — с тонкой.

Клетки бактерий в процессе жизнедеятельности образуют защитные органеллы — капсулы и споры. Капсула — внешний уплотненный слизистый слой, примыкающий к клеточной стенке. Это защитный орган, который появляется у некоторых бактерий при попадании

их в организм человека или животных. Капсула предохраняет бактерии от защитных факторов организма (препятствуют захвату бактерий фагоцитами). Спора — форма грамположительных бактерий, образующаяся при неблагоприятных условиях существования клетки (высушивание, дефицит питательных веществ, изменение температуры и др.). Образование спор способствует сохранению вида и не имеет отношения к размножению бактерий. Спорообразующие аэробные бактерии называют бациллами, а анаэробные — клостридиями.

На основании микроскопического изучения этих характеристик бактерий можно с определенной долей вероятности предполагать наличие в исследуемой пробе тех или иных микроорганизмов. Место взятия пробы биологического материала дает дополнительную информацию о характере микрофлоры.

Нормальной флорой при исследовании гинекологических мазков служат грамположительные палочки, которых в результате описывают как лактоморфотипы. При бактериальном вагинозе микробная флора представлена обильной мелкой коккобациллярной грамвариабельной флорой и характеризуется снижением лактоморфотипов. При гонорее в мазке присутствуют грамотрицательные кокки бобовидной формы, расположенные парами внутри и внеклеточно. При других гнойно-воспалительных состояниях (неспецифических) можно встретить грамположительные кокки, грамотрицательные палочки. В мазках учитывают также наличие эпителия, присутствие ключевых клеток и количество лейкоцитов.

В мокроте имеют значение грамположительные кокки, слегка вытянутые, в капсуле, расположенные парами, морфологически сходные с пневмококками, или мелкие неодинаковой формы грамотрицательные палочки, сходные с гемофилами, а также грамотрицательные кокки, расположенные поодиночке, что может свидетельствовать в пользу наличия бранхамелл.

В мазках из ран чаще всего встречаются грамположительные кокки.

На рис. 18.10 представлен вид некоторых бактерий при окраске по Граму при бактериоскопии.

Иногда микроскопия позволяет выявить микроорганизмы, плохо растущие на питательных средах. Данные микроскопии позволяют осуществить правильный выбор питательных сред для выращивания микроорганизмов, обнаруженных в мазке.

Однако с помощью микроскопического исследования нет возможности дать заключение о названии бактерий. Для определения рода и вида бактерий требуется проведение бактериологического посева, выделение чистой культуры и ее идентификация.





Рис. 18.10. Бактериоскопическая картина мазков, окрашенных по Граму: 1 — стрептококки; 2 — стафилококки; 3 — диплобактерии Фридлендера; 4 — пневмококки

### 18.6.3. ПОСЕВ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Для выделения чистых культур микроорганизмов, установления их вида и определения чувствительности к АБС проводят посев исследуемого биоматериала на питательные среды. Цель посева — получение культуры бактерий в виде однородной популяции, что позволяет более точно установить вид микроорганизмов.

Выращивание микроорганизмов на питательных средах называют культивированием, а развившиеся в таких средах микроорганизмы — культурой. В лабораторных условиях микроорганизмы выращивают на твердых и жидких питательных средах в пробирках, колбах или чашках Петри.

Внесение микроорганизмов или какого-либо исследуемого биологического материала (моча, мокрота, отделяемое раны) в стерильную питательную среду для получения чистой или накопительной культуры называют посевом. Пересев — перенос выращенной культуры микроорганизмов на питательной среде на другую свежую питательную среду. Посев (и пересев) микроорганизмов проводят при соблюдении определенных правил стерильности, которые необходимо выполнять, чтобы предохранить исследуемую культуру от загрязнения посторонними организмами и не загрязнять окружающую среду исследуемыми культурами микроорганизмов.

Чистой называют культуру, состоящую из микроорганизмов одного вида. Чистую культуру микроорганизмов, которая является потомством одной единственной клетки, называют клоном. Выделение чистой культуры предполагает проведение трех этапов:

- получение накопительной культуры;
- выделение чистой культуры;
- определение чистоты выделенной культуры.

### 18.6.3.1. ТЕХНИКА ПРОВЕДЕНИЯ ПОСЕВОВ

Выращивают микроорганизмы в стеклянной посуде — пробирках, колбах или чашках Петри. Для проведения посевов используют специальные бактериологические иглы и шпатели из платиновой проволоки, которую закрепляют в специальных металлических держателях или впаивают в стеклянные палочки. Толщина игл и петель не должна превышать 0,5 мм, толщина шпателя может быть 1,5 мм и более. Шпатели используют и для взятия микроорганизмов из колоний, растущих в субстрат. Суспензии микроорганизмов берут петлей.

Посевы на жидкие и твердые питательные среды проводят несколькими способами.

**Посев в пробирку с жидкой питательной средой.** Посев производят петлей или градуированной пипеткой. В первом случае посевной материал стерильной бактериологической петлей осторожно вносят в пробирку и легко встряхивают в верхнем слое питательной среды или растирают по стенке, смывая его жидкой средой. Во втором случае стерильную пипетку обжигают в пламени горелки, опускают в пробирку с пробой биологического материала, отбирают определенное количество материала и переносят его в пробирку со свежей питательной средой, выпуская жидкость по стенке пробирки, или вносят пипетку вглубь среды и выдувают содержащийся в ней материал.

**Посев в пробирку со скошенным агаром** (рис. 18.11). Пробирки с пробой и со скошенным питательным агаром берут в левую руку

и держат в наклонном положении. В правую руку берут бактериологическую иглу и прокалывают ее в пламени спиртовки до покраснения, затем проносят сквозь пламя иглодержатель. Мизинцем правой руки из обеих пробирок вынимают пробки, обжигают края пробирок. Петлю вводят в пробирку с пробой, охлаждают ее о края пробирки и осторожно снимают небольшое количество пробы биологического материала. Петлю с посевным материалом быстро переносят в пробирку со стерильной средой и опускают почти до дна, где скапливается небольшое количество конденсационной влаги. В дальнейшем можно применять 3 способа внесения материала в среду:

- слегка касаясь агара, проводят зигзагообразную линию (посев штрихом), при этом петлю не отрывают от поверхности питательной среды;
- проводят петлей прямую линию снизу вверх посередине поверхности питательной среды (посев прямой чертой);
- распределяют материал круговыми движениями петли по всей поверхности среды (сплошной посев).



Рис. 18.11. Посев микроорганизмов штрихом на скошенный агар

После посева петлю вынимают из пробирки и обжигают вместе с остатками посевного материала. Затем обжигают края пробирок и внутренние концы пробок, после чего пробирки закрывают. На наружной поверхности пробирки пишут дату посева.

**Посев уколом** (рис. 18.12). Данную технику посева используют для культивирования организмов анаэробных или растущих при низкой концентрации кислорода (микроаэрофилов). Благодаря небольшой поверхности и достаточно большой глубине агара в пробирке по сравнению с чашкой доступ кислорода внутрь агара ограничен. Посев

производят прямой проволоочкой (без петли) или бактериологической иглой. Кончиком обожженной в пламени горелки бактериологической иглой берут небольшое количество твердой или жидкой исследуемой пробы (культуры). Пробирку со столбиком питательной среды берут в правую руку, переворачивают вверх дном, вынимают из нее пробку, прижимая ее мизинцем к ладони. Подняв пробирку на уровень глаз, в центре столбика прокалывают плотную среду иглой снизу вверх на всю глубину. Затем иглу извлекают и обжигают вместе с остатками посевного материала. Пробирку закрывают пробкой, подписывают и помещают в термостат для выращивания. Культура растет в агаре во все стороны от линии прокола.



Рис. 18.12. Посев уколом на плотную питательную среду

При проведении посева пробы биологического материала или пересеве выращенной культуры в пробирки необходимо соблюдать следующую последовательность действий (рис. 18.13):

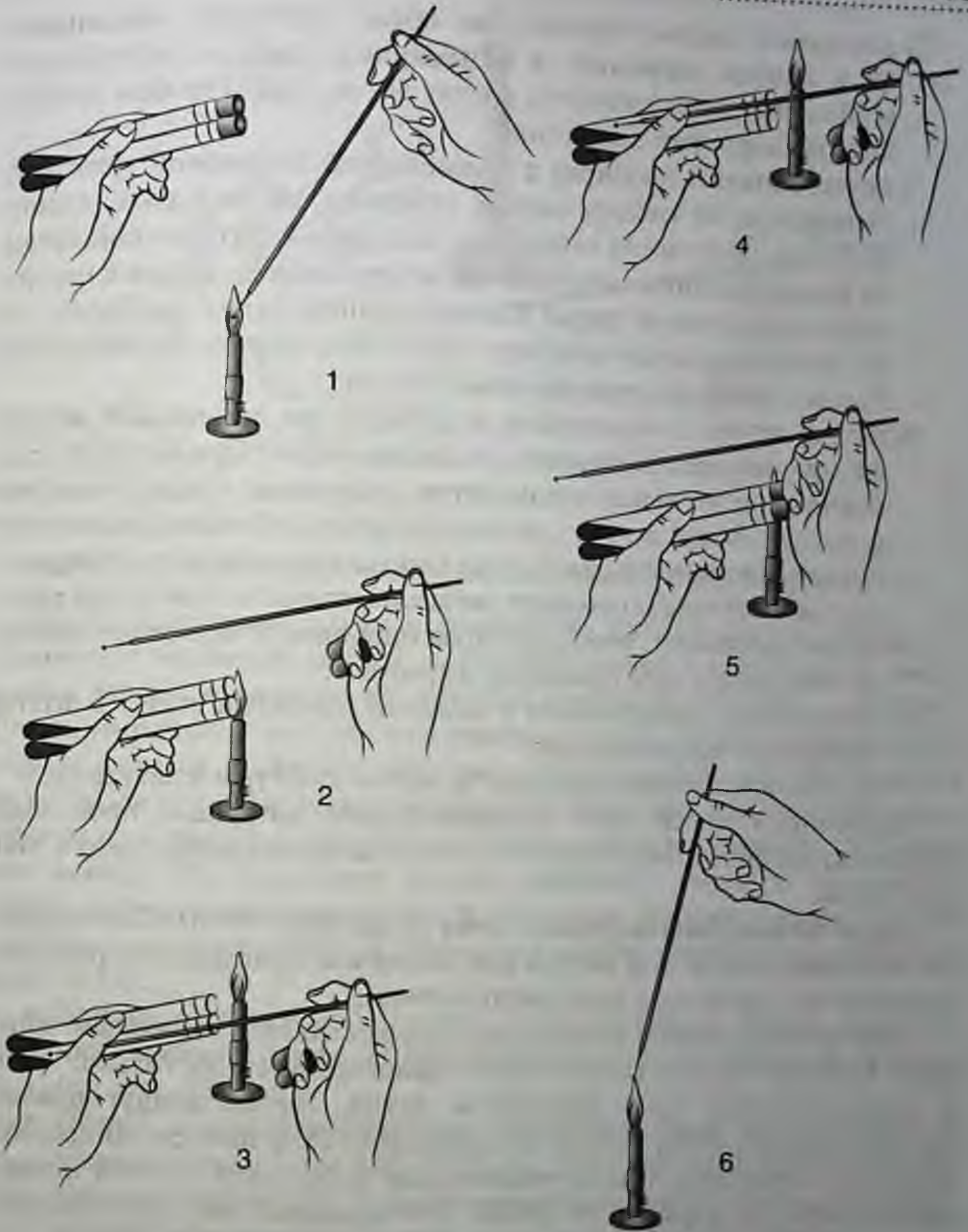


Рис. 18.13. Посев и пересев микроорганизмов в пробирки: 1–6 – описание в тексте

1) в левую руку берут две пробирки [одну со стерильной средой, другую — с пробой (культурой)] и держат в наклонном положении; в правой руке большим и указательным пальцем держат бактериальную петлю и стерилизуют в пламени горелки;

- 2) вынимают ватные пробки из обеих пробирок, прижимают их к ладони мизинцем и безымянным пальцем правой руки и обжигают края пробирок; следят за тем, чтобы пробки не касались посторонних предметов;
- 3) петлю вводят в пробирку с пересеваемой микробной культурой. Осторожно, не касаясь стенок, отбирают каплю жидкой культуры. Если производят пересев со скошенной питательной среды, то для охлаждения петли вначале следует прикоснуться к поверхности питательной среды или внутренней стенки пробирки, где нет культуры, после чего берут небольшое количество микробной массы с плотной среды на кольцо петли;
- 4) вводят петлю с материалом в пробирку со стерильной жидкой средой, стараясь не задевать стенок пробирки. При посеве на скошенные питательные среды петлю с клетками микроорганизмов опускают почти до дна, где скапливается небольшое количество конденсационной воды. Слегка касаясь кольцом петли поверхности плотной среды проводят зигзагообразную линию от дна вверх;
- 5) петлю вынимают, обжигают края пробирок и внутренние концы пробок, после чего пробирки закрывают;
- 6) петлю вновь прокалывают в пламени горелки и ставят в штатив или стакан вверх кольцом;
- 7) на пробирке делают надпись: название культуры и дату посева.

Первичный посев проб биологического материала производят несколькими способами обычно на плотную питательную среду в чашках Петри.

**Посев на поверхность среды в чашку Петри** (рис. 18.14). Посев проводят бактериологической петлей или шпателем Дригальского (стеклянная палочка, согнутая в виде треугольника).

При использовании петли посев осуществляют штриховым методом. Крышку чашки Петри слегка приоткрывают настолько, чтобы в образующуюся щель проходила петля. Петлю кладут плашмя на питательную среду, чтобы не поцарапать ее, и наносят микробную культуру зигзагообразными движениями (штрихом) по всей поверхности агара, не отрывая от среды, что позволяет получить изолированные колонии.

Существует и другие методы посева штрихом в чашки Петри с твердыми средами.

**Посев на чашку Петри петлей на секторы** — удобный метод посева штрихом в чашки для получения отдельных колоний. Метод применяют в микробиологической практике для выделения чистой культуры.



Рис. 18.14. Посев петлей на плотную питательную среду в чашки Петри

Чашку со стороны дна расчерчивают на сектора, затем небольшое количество посевного материала втирают петлей в поверхность среды у края чашки, несколько раз проведя петлей из стороны в сторону. После этого места агара, где закончились штрихи, прокалывают петлей, снимая избыток посевного материала (сброс материала). Оставшийся на петле посевной материал зигзагообразными движениями распределяют от края чашки к центру так, чтобы штрихи не заходили на соседний сектор. По окончании посева закрывают чашку и прожигают петлю. При использовании метода посева на сектора в чашку Петри необходимо придерживаться следующей последовательности действий (рис. 18.15).

- Для маркировки на обратной стороне чашки Петри карандашом наносят букву Т, разделяющую дно чашки на 3 сектора (см. рис. 18.15, а).
- Петлей с культурой зигзагом наносят штрихи на поверхности агара в секторе 1 (см. рис. 18.15, б). Для этого крышку чашки сначала приподнимают, а после нанесения штриха сразу закрывают, петлю стерилизуют в пламени горелки и дают ей остыть (15 с).
- Проводят петлей по поверхности среды в секторе 1, затем немедленно наносят ею зигзагом штрихи на поверхности среды в секторе 2 (см. рис. 18.15, в). Прогревают петлю в пламени и дают ей остыть.
- Проводят петлей по поверхности среды в секторе 2, затем наносят ею зигзагом штрихи на поверхности среды в секторе 3 (см. рис. 18.15, г).

а



б



в



г



д



Рис. 18.15. Посев на чашку Петри петлей на сектора (описание в тексте)

В дальнейшем в термостах инкубируют опрокинутые вверх дном чашки, чтобы конденсирующаяся вода с крышки не попала на поверхность агара. В секторе 1 вырастает большое число колоний, тогда как в секторе 2 и 3 появляются отдельные хорошо изолированные колонии (см. рис. 18.15, д).

**Дробный посев на чашку Петри петлей** (рис. 18.16). Петлей с посевным материалом несколько раз делают параллельные штрихи в одном секторе чашки Петри, петлю прожигают в пламени горелки, дают остыть и часть материала из первого сектора (А) распределяют во втором секторе (В) аналогичным способом, затем в третьем (С) и четвертом секторах (D).

**Посевы «газоном»** производят шпателем (рис. 18.17). Для этого, приоткрыв левой рукой крышку чашки Петри, петлей или пипеткой наносят посевной материал на поверхность питательного агара. Затем проводят шпатель сквозь пламя горелки, остужают его о внутреннюю сторону крышки и растирают материал по всей поверхности среды. После посева шпатель вынимают и обжигают вместе с остатками посевного материала. После инкубации посевов в чашке появляется равномерный газон выросшей культуры.



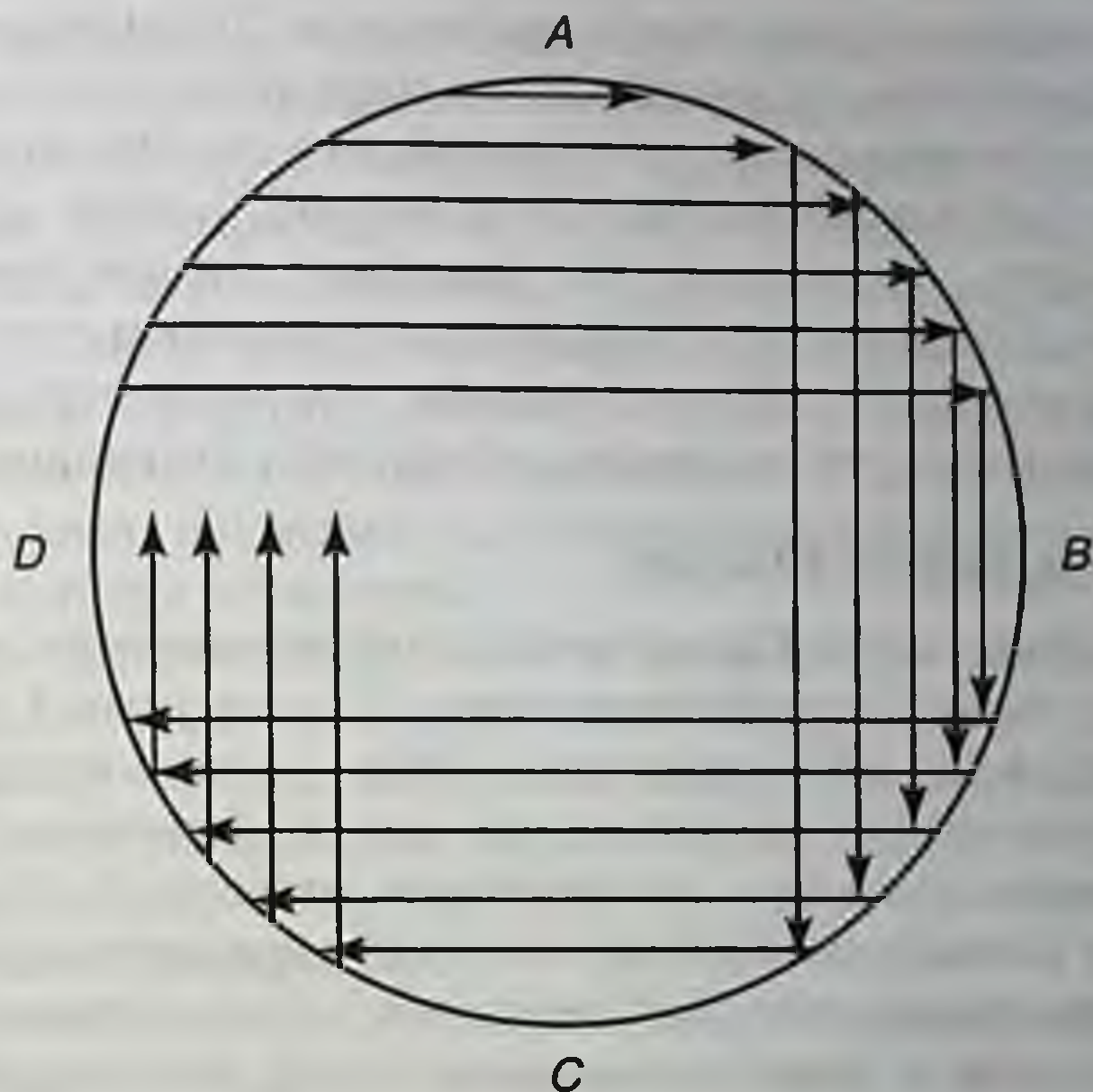


Рис. 18.16. Дробный посев на чашку Петри петлей (описание в тексте)



Рис. 18.17. Посев шпателем на плотную питательную среду в чашки Петри

**Посев тампоном.** Тампон с исследуемым материалом вносят в чашку и круговыми движениями втирают его содержимое в поверхность среды, одновременно вращая тампон и чашку.

**Глубинный посев в чашку Петри.** Определенное количество подготовленного к посеву исследуемого материала (1,0 мл или 0,1 см<sup>3</sup>) вносят пипеткой в пустую чашку Петри. Из пробирки или колбы с расплавленной и остуженной до 45 °С питательной средой вынимают пробку, обжигают края в пламени горелки и, слегка приоткрыв крышку, выливают на дно чашки Петри.

После проведения посева пробирки и чашки Петри помещают в термостат с температурой, оптимальной для конкретного микроорганизма.

Посевы всегда проводят около пламени горелки. Около специалиста лаборатории, работающего с чистой культурой, нельзя делать резких движений, ходить, кашлять и тому подобное, так как движение воздуха увеличивает опасность попадания посторонних микроорганизмов в пробирку с культурой. Именно поэтому посевы и пересевы микроорганизмов рекомендуют проводить в боксе или ламинарном шкафу.

### 18.6.3.2. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ

После посева чашки Петри необходимо перевернуть вверх дном и поставить в термостат при температуре, благоприятной для данного вида бактерий, а для ряда микроорганизмов — в термостаты со специальным газовым режимом (например, для выращивания анаэробов создают условия с низким содержанием кислорода). Большинство патогенных и условно-патогенных бактерий выращивают на питательных средах при температуре 37 °С в течение 1–2 сут. Однако некоторые из них нуждаются в более длительных сроках. Например, бактерии коклюша — в течение 2–4 сут, а микобактерии туберкулеза — 3–4 нед. В результате на поверхности среды вырастают колонии микроорганизмов. Культуру микроорганизмов, выделенную из определенного источника (организма или объекта окружающей среды), называют штаммом. Выросшие колонии сначала рассматривают невооруженным глазом, а затем — с помощью помощи лупы или при малом увеличении микроскопа.

Количественную обсемененность доставленного биоматериала микрофлорой определяют по числу КОЕ в 1 мл или 1 мг исследуемого образца (показатель количества жизнеспособных микроорганизмов в единице объема). При просмотре чашек Петри определяют некоторые особенности изменения цвета среды, ее просветления в процессе роста культуры. Многие группы бактерий образуют характерные формы колоний, выделяют пигменты, которые окрашивают колонии или среду вокруг них. Из каждой колонии делают мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют с целью изучения особенностей строения бактерий (форма, размер, наличие спор или других включений, капсулы, расположение бактерий) и отношения к окраске по Граму. Вся эта информация служит важнейшей составляющей для выбора сред и получения в дальнейшем чистой культуры каждого микроорганизма.

В клинической бактериологической диагностике идентификацию проводят только «чистых культур» бактерий, выделенных из исследуемого материала, который получен от больного. Перед выделени-

ем чистой культуры из различных проб биологического материала, в которых находятся множество микроорганизмов, вначале получают накопительные культуры, проводя культивирование в условиях, способствующих развитию одной культуры и ограничивающих развитие сопутствующих микроорганизмов. Накопительные культуры состоят преимущественно из клеток микроорганизмов одного вида. Получают накопительные культуры микроорганизмов, используя различные методы. К ним относят способы обогащения, метод нагревания исследуемого материала для выделения спорообразующих бактерий, выделения подвижных форм бактерий.

Сущность метода обогащения в том, что для увеличения численности выделяемого вида микроорганизмов вначале делают посев исследуемого материала с низким содержанием выделяемых микроорганизмов в накопительные питательные среды, которые содержат вещества, стимулирующие их рост и угнетающие или задерживающие размножение сопутствующей микрофлоры.

Метод нагревания применяют для выделения чистых культур споровых форм бактерий (бацилл, клостридий). В этом случае перед посевом исследуемый материал прогревают на водяной бане при температуре 75–85 °С в течение 20–30 мин. Вегетативные формы бактерий погибают во время прогревания, а их споры остаются живыми и при последующих посевах на плотную среду прорастают, формируя колонии.

Метод выделения подвижных форм бактерий состоит в посеве исследуемого материала в конденсационную воду скошенного мясопептонного агара (МПА). При размножении подвижные формы микроорганизмов из конденсационной воды распространяются по агару, как бы вползая на его поверхность.

Для отсева выращенных колоний используют плотные, жидкие, полужидкие питательные среды, оптимальные для культивирования определенного вида бактерий. В конечном итоге выделяют чистые культуры микроорганизмов, которые подвергают дальнейшему изучению с использованием диагностических тестов.

#### 18.6.4. ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Идентификация бактерий — комплекс бактериологических методов изучения микроорганизма, позволяющий определить его вид.

Для подтверждения этиологической значимости выделенных бактерий для данного заболевания, обязательным для бактериологической лаборатории считают определение рода и вида, к которому их относят. Оно должно быть отражено на бланке результата исследования в виде

наименования микроорганизма или его рода, например, *Streptococcus pneumoniae* (пневмококк) или *Escherichia coli* (кишечная палочка).

При идентификации культур проводят определение их родовой и видовой принадлежности, а при необходимости — и внутривидовое типирование. Результат получают по совокупности следующих данных.

- Морфологических, основанных на выявлении характерных особенностей ультраструктуры возбудителя и их тинкториальных свойств (чаще окраска по Граму).
- Культуральных, основанных на выделении чистой культуры микроорганизмов на плотной питательной среде, с изучением особенностей выросших колоний.
- Биохимической активности культур, в том числе оксидазной и каталазной активности, способности ферментировать углеводы (глюкоза, лактоза, сахароза, мальтоза, маннит и др.), образовывать индол, аммиак и сероводород, которые служат продуктами протеолитической активности бактерий. Реже используют тесты ассимиляции азота, определение активности уреазы и отдельных специфических ферментов.
- Иммунологических, основанных на выявлении антигенов возбудителя или антител к ним. Идентификацию возбудителей по их антигенным свойствам проводят в реакциях ориентировочной агглютинации, латексной агглютинации, преципитации или иммунофлуоресценции. Антитела к возбудителю определяют в серологических реакциях: прямой и непрямой агглютинации, преципитации, связывания комплемента, ИФА и радиоиммунном методом и др.
- Масс-спектрометрического анализа белковых молекул микроорганизмов (бактерий, грибов).
- Молекулярно-генетических, основанных на определении специфических нуклеотидных последовательностей в цепи ДНК при помощи короткой эталонной цепи ДНК (праймера). С этой целью используют ПЦР, метод генетических зондов, сэндвич-гибридизацию и др.

Морфологическая характеристика бактерий включает такие признаки, как форма и размеры клеток, их подвижность, наличие жгутиков и тип жгутикования, способность к спорообразованию. Дополнительную информацию может предоставить выявление в клетках характерных мембранных систем (хлоросом, карбоксисом, газовых вакуолей и др.), присущих отдельным группам бактерий, а также включений (параспоральных телец, гранул волютина, полисахаридов и др.). Первостепенное значение для идентификации бактерий придают окраске клеток по Граму и строению их клеточных стенок.

### 18.6.4.1. КУЛЬТУРАЛЬНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ

К культуральным, или макроморфологическим, свойствам относят характерные особенности роста микроорганизмов на плотных и жидких питательных средах.

На поверхности плотных питательных сред в зависимости от посева микроорганизмы могут расти в виде колонии, штриха или сплошного газона. Колония — изолированное скопление клеток одного вида, выросшее в большинстве случаев из одной клетки. Если колония развилась из одной родительской клетки, то потомство называют клоном. Культура — вся совокупность микроорганизмов одного вида, выросших на плотной или жидкой питательной среде.

В микробиологии часто используют и другие термины для характеристики микроорганизмов. Например, штамм — любой конкретный образец (изолят) данного вида микроорганизмов. Штаммы одного вида, различаемые по антигенным характеристикам, называют серотипами (серовариантами, сокращенно — сероварами), по чувствительности к специфическим фагам — фаготипами, биохимическим свойствам — хемоварами, по биологическим свойствам — биоварами и т.д.

В зависимости от того, где развивались бактерии (на поверхности плотной питательной среды, в толще ее или на дне сосуда), различают поверхностные, глубинные и донные колонии.

Образование поверхностных колоний — наиболее существенная особенность роста многих микроорганизмов на плотной среде. Такие колонии отличаются большим разнообразием. При их описании учитывают следующие признаки.

- Профиль: плоский, выпуклый, кратерообразный, конусовидный и т.д. (рис. 18.18).

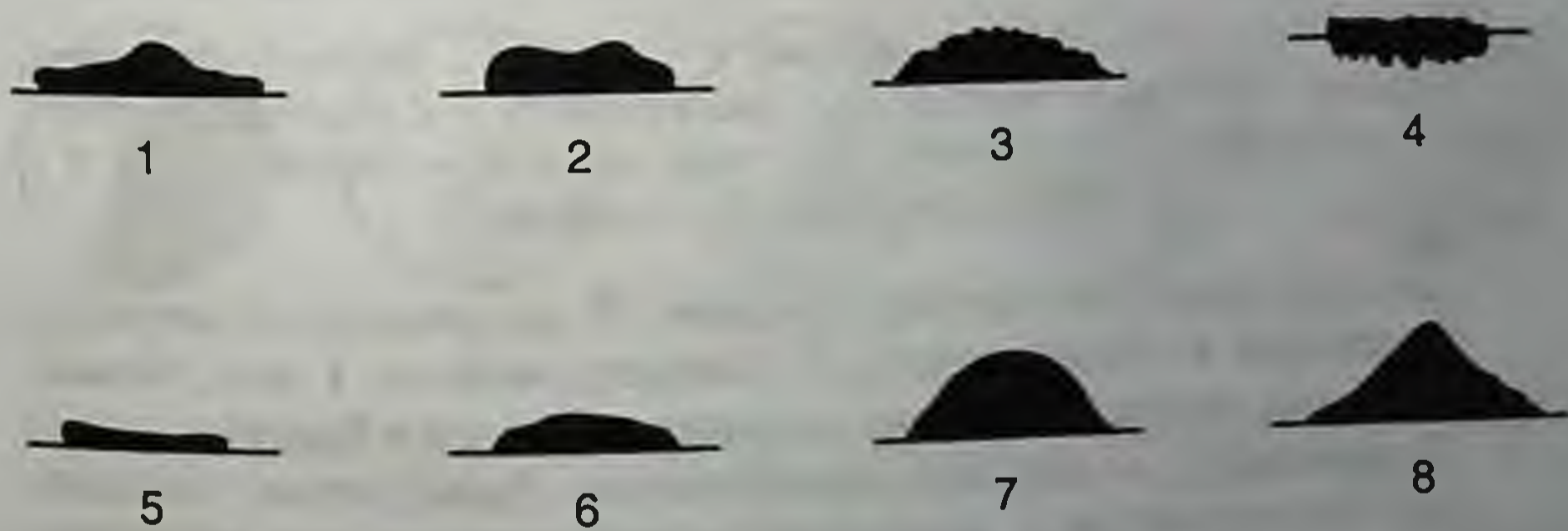
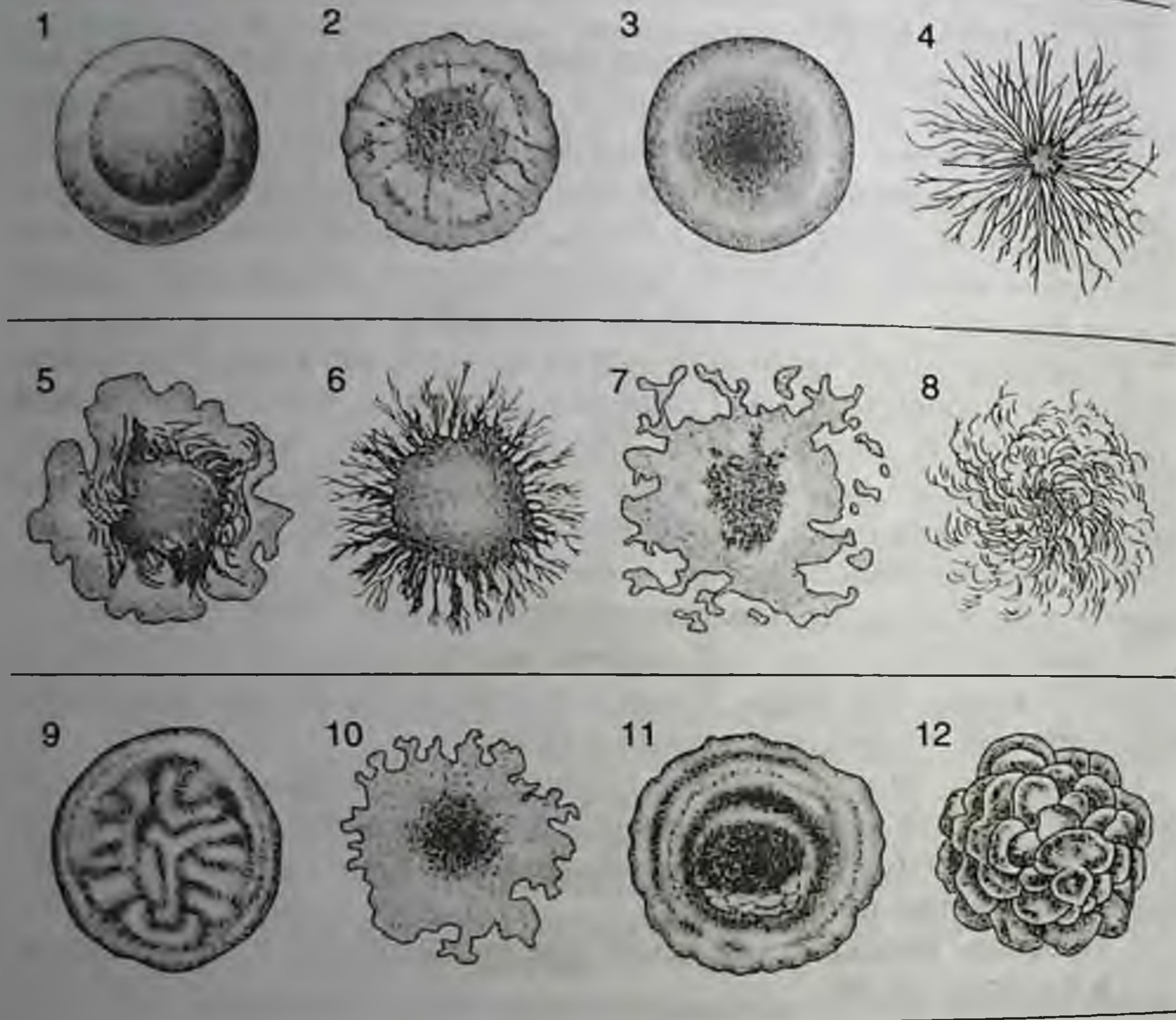


Рис. 18.18. Профиль колоний: 1 — изогнутый; 2 — кратерообразный; 3 — бугристый; 4 — врастающий в субстрат; 5 — плоский; 6 — выпуклый; 7 — каплевидный; 8 — конусовидный

- Форма: округлая, амебовидная, неправильная, ризоидная и т.д. (рис. 18.19).



**Рис. 18.19.** Форма колоний: 1 — круглая; 2 — круглая с фестончатым краем; 3 — круглая с валиком по краю; 4, 5 — ризоидные; 6 — с ризоидным краем; 7 — амебовидная; 8 — нитевидная; 9 — складчатая; 10 — неправильная; 11 — концентрическая; 12 — сложная

- Диаметр определяет размер колонии. В зависимости от диаметра различают колонии точечные (диаметр меньше 1 мм), мелкие (1–2 мм), средние (2–4 мм) и крупные (4–6 мм и более).
- Поверхность — гладкая, шероховатая, бороздчатая, складчатая, морщинистая, с концентрическими кругами или радиально исчерченная.
- Блеск и прозрачность: колония блестящая, матовая, тусклая, мучнистая, прозрачная.

- Цвет колонии определяется пигментом, который продуцирует культура бактерий. Большинство патогенных бактерий пигмента не образуют, вследствие чего колонии их бесцветны или молочно-мутного цвета, похожи на опал. В проходящем свете такие колонии в большей или меньшей степени прозрачны. Пигментообразующие виды микроорганизмов дают колонии различных цветов: кремовые, желтые, золотисто-оранжевые, синие, красные, сиреневые, черные и др.
- Характер контура края определяют при рассмотрении колонии под лупой или микроскопом с малым увеличением. Различают ровные края в виде четко выраженной линии и неровные — волнистый, зубчатый, бахромчатый и т.д. (рис. 18.20).

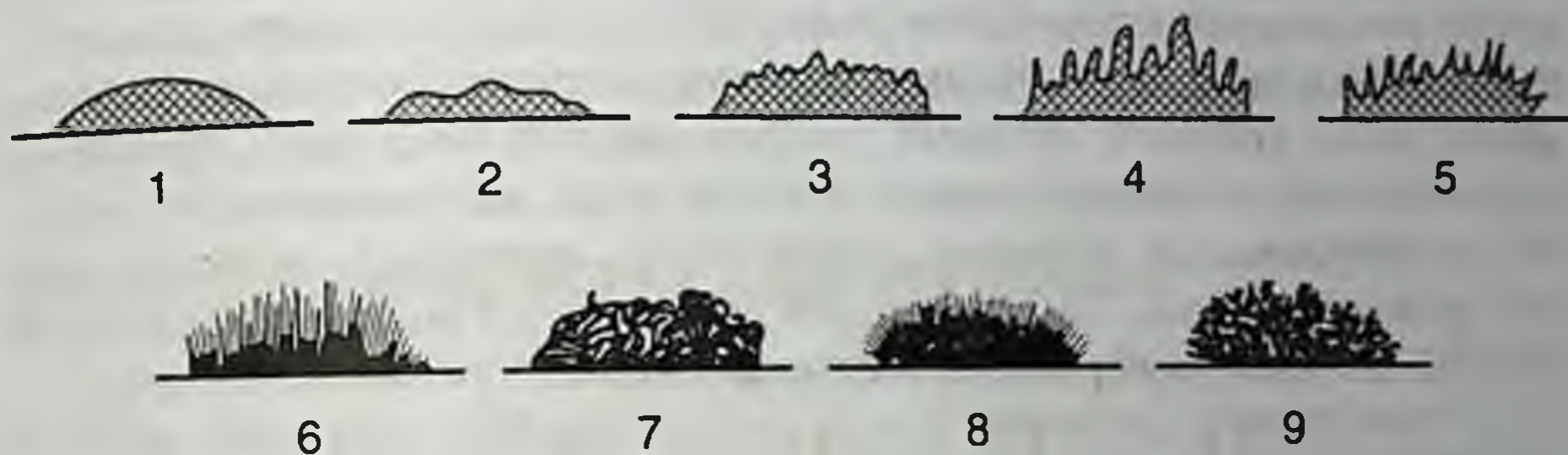


Рис. 18.20. Край колоний: 1 — гладкий; 2 — волнистый; 3 — зубчатый; 4 — лопастной; 5 — неправильный; 6 — реснитчатый; 7 — нитчатый; 8 — ворсинчатый; 9 — ветвистый

- Структура: однородная, мелко- или крупнозернистая, струйчатая и т.д. (рис. 18.21). Край и структуру колонии определяют с помощью лупы или при малом увеличении микроскопа (для этого чашку Петри помещают на столик микроскопа крышкой вниз).

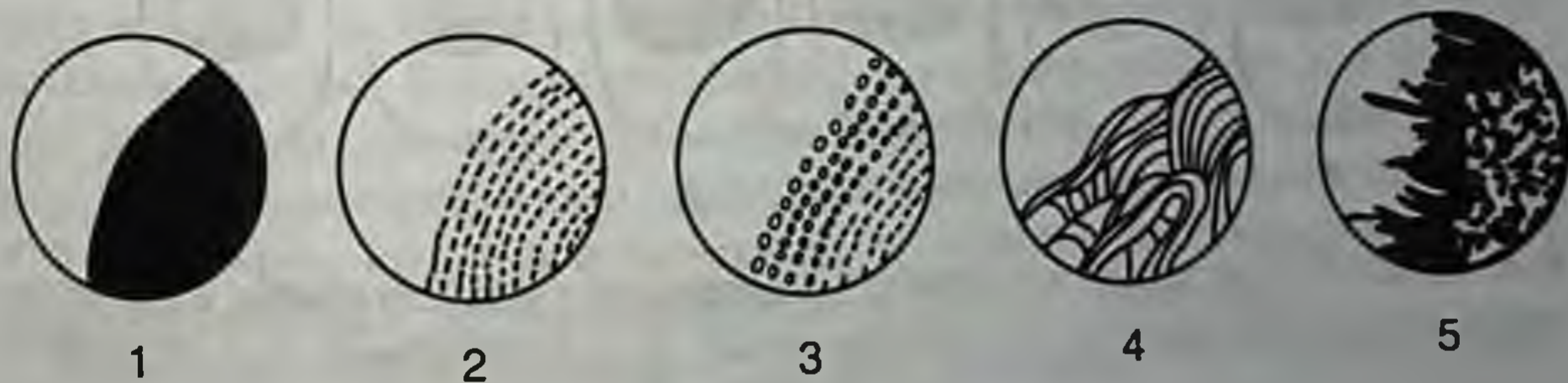


Рис. 18.21. Структура колоний: 1 — однородная; 2 — мелкозернистая; 3 — крупнозернистая; 4 — струйчатая; 5 — волокнистая

- Консистенцию определяют, прикасаясь к поверхности колонии петлей. Колония может легко сниматься с агара, быть плотной, мягкой или врастающей в агар, слизистой (прилипает к петле),

тягучей, иметь вид пленки (снимается целиком), быть хрупкой (легко ломается при прикосновении петлей).

Глубинные колонии не отличаются многообразием форм. Чаще всего они по виду похожи на более или менее сплюсненные чечевички, в проекции имеющие форму овалов с заостренными концами. Лишь у немногих бактерий глубинные колонии напоминают пучки ватных волокон с нитевидными выростами в питательную среду. Образование глубинных колоний часто сопровождается разрывом плотной среды, если микроорганизмы выделяют углекислоту или другие газы. Донные колонии разных микроорганизмов обычно имеют вид тонких прозрачных пленок, стелющихся по дну.

Если на поверхность плотной среды микробные клетки помещены путем проведения прямой линии петлей по агару, то микроорганизмы вырастут в виде штриха. В таких случаях отмечают следующие особенности роста колоний: скудный, умеренный или обильный, сплошной с ровным или волнистым краем, четковидный, напоминающий цепочки изолированных колоний, диффузный, перистый, древовидный, или ризоидный (рис. 18.22). Характеризуют также оптические свойства налета, его цвет, поверхность и консистенцию.

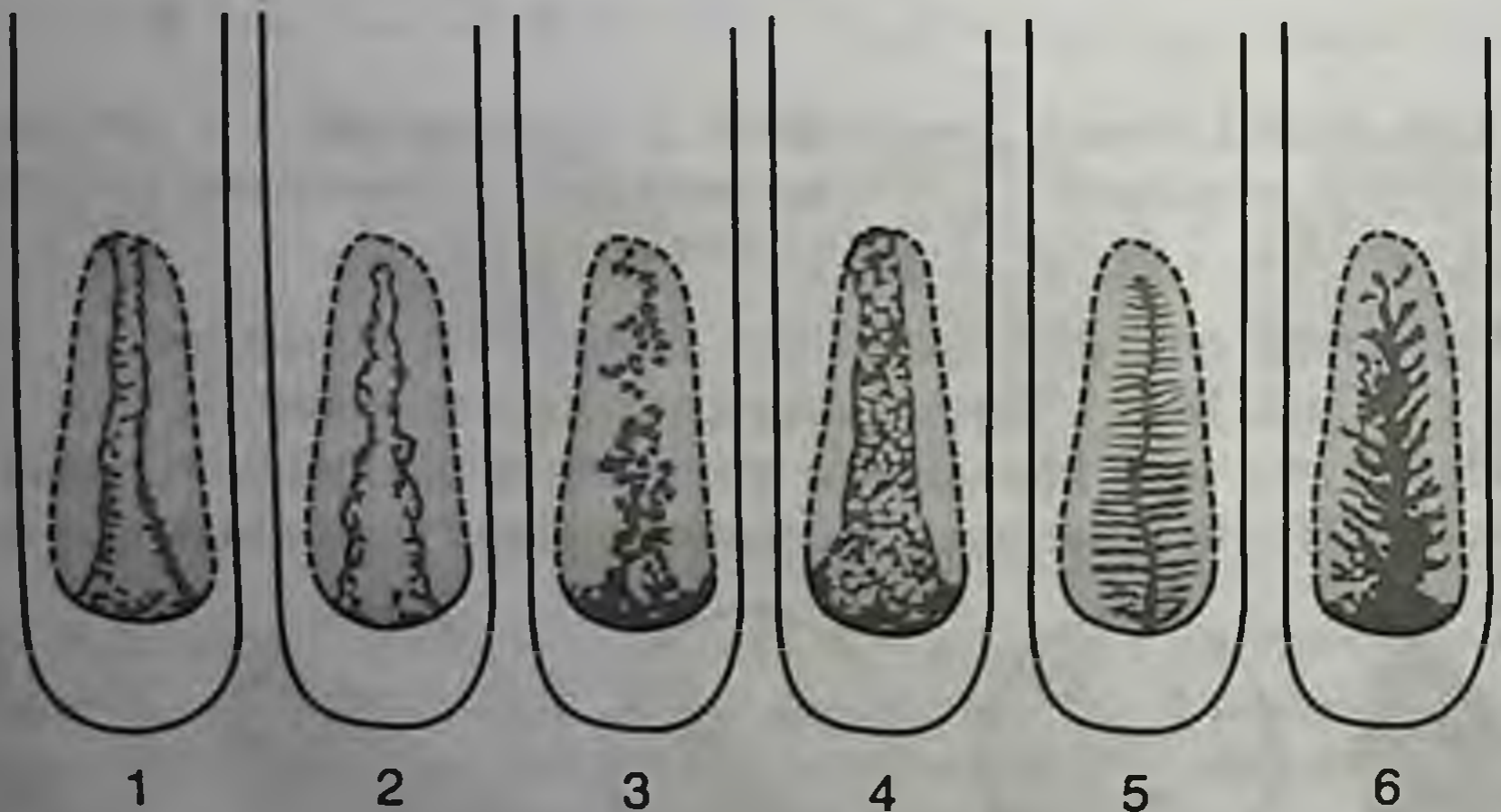


Рис. 18.22. Рост колоний по штриху: 1 — сплошной с ровным краем; 2 — сплошной с волнистым краем; 3 — четковидный; 4 — диффузный; 5 — перистый; 6 — ризоидный

Если рост по штриху неоднороден, то культура загрязнена. Затем культуру отсевают в пробирку на скошенную среду (МПА) для использования в дальнейшей работе, а также делают рассев на поверхность твердой среды в чашки Петри методом истощающего штриха для проверки на чистоту (по однородности выросших колоний). Засеянные



пробирки и чашки помещают в термостат при температуре 30 °С на время от 2 до 3 сут. Остаток исходной культуры бактерий в пробирке используют для проверки на чистоту методом микроскопии (по морфологической однородности популяции), а также для изучения формы, взаимного расположения, подвижности клеток и их размеров.

Рост микроорганизмов в жидких питательных средах более однообразен и сопровождается помутнением среды, образованием пленки или осадка. Характеризуя рост микроорганизмов в жидкой среде, отмечают степень помутнения (слабая, умеренная или сильная), особенности пленки (тонкая, плотная или рыхлая, гладкая или складчатая), а при образовании осадка указывают, скудный он или обильный, плотный, рыхлый, слизистый или хлопьевидный.

Нередко рост микроорганизмов сопровождается появлением запаха, пигментацией среды, выделением газа. Последнее обнаруживают по образованию пены, пузырьков.

#### 18.6.4.2. БИОХИМИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Ферментативная активность микроорганизмов богата и разнообразна. Она позволяет установить видовую и типовую принадлежность, определить биологические варианты бактерий. Существует целый ряд ферментов, по активности которых можно определить степень патогенности микроорганизма.

Для идентификации выделяемых культур по биохимическим свойствам в состав сред обычно вводят дифференцирующие субстраты и соответствующие индикаторы. Наиболее часто субстратом служат углеводы (лактоза, сорбит, сахароза и др.), мочевины или другие субстраты, при расщеплении которых микробными ферментами образуются вещества, изменяющие  $pH$  или окислительно-восстановительный потенциал среды. В результате воздействия ферментов на эти внесенные в питательную среду субстраты образуются продукты ферментации. В результате индикатор окрашивает, например, колонии бактерий и среду вокруг, помогая отличить их от бесцветных (неокрашенных) колоний бактерий, не ферментирующих данный субстрат.

При биохимической дифференциации бактерий определяют их следующие свойства:

- сахаролитические — способность сбраживать углеводы и многоатомные спирты с образованием кислоты и газа или только кислоты;
- протеолитические — способность разлагать белковые продукты с образованием сероводорода, индола и др.;

- гемолитические — способность лизировать эритроциты на кровяном агаре (КА) или бульоне с отмытыми эритроцитами;
- редуцирующие — способность восстанавливать некоторые химические вещества (краски и др.).

В зависимости от этих особенностей бактерий классифицируют и дифференциально-диагностические среды, разделяя их на четыре основные группы.

- Среда, содержащая углеводы или многоатомные спирты: ферментативное расщепление субстратов приводит к сдвигу pH и изменению окраски среды, а иногда и образованию газа. Наиболее распространены цветные среды с различными углеводами и индикаторами, лакмусовое молоко (среда Минкевича) и среды Гисса. Из углеводов наиболее часто используют моносахариды (ксилозу, арабинозу, глюкозу, фруктозу, маннозу, галактозу), дисахариды (лактозу, мальтозу, сахарозу), полисахариды (крахмал, гликоген, инулин, декстрин), спирты (дульцит, маннит, сорбит, глицерин) и гликозиды (адонит, инозит, салицин, амигдалин).
- Среда, содержащая белки: характерные изменения под действием бактериальных ферментов (кровь, желатин, молоко и др.), применяют для определения гемолитических или протеолитических свойств. Кроме того, для этих целей наиболее часто применяют мясопептонный желатин, свернувшуюся лошадиную сыворотку, молоко и кровяной агар.
- Среда для определения редуцирующей способности: в эту группу входят среды с красками, обесцвечивающимися при восстановлении (например, метиленовый голубой, нейтральный красный, индигокармин), а также среды с нитратами для определения денитрифицирующей активности бактерий (при положительном результате среды окрашиваются в синий цвет).
- Среда, включающая вещества, ассимилируемые только определенной группой бактерий: наиболее часто используют нитратный агар Симмонса и цитратную среду Козера.

**Сахаролитические свойства микроорганизмов.** Различные виды и даже разновидности микроорганизмов относятся по-разному к одним и тем же сахарам. Их сахаролитические свойства определяют путем посева чистой культуры на специальные дифференциально-диагностические питательные среды, содержащие различные углеводы (лактозу, сахарозу, глюкозу, мальтозу, маннит и др.) и индикатор (смесь водного голубого и розоловой кислоты, реактив Андреде и др.). Наиболее распространена среда Гисса, которая представляет собой смесь сахара

и индикатора в пептонной воде. Каждая среда Гисса содержит один вид сахара. По изменению цвета индикатора после посева судят об образовании кислых продуктов; заполнение поплавка газом или разрыв агара указывает на образование газа из углевода. Если культура не ферментирует углевод, цвет индикатора не изменяется и образования газа не наблюдают. В зависимости от наличия в микробной клетке того или иного фермента она способна разлагать какой-либо один из углеводов с образованием определенных продуктов разложения, поэтому в состав среды вводят какой-либо углевод: лактозу, глюкозу, маннит, сахарозу и пр. Поскольку бактерии ферментируют не все, а только определенные для каждого вида углеводы, входящие в состав сред Гисса, то пробирки, в которых изучают свойства микроорганизмов, приобретают различную яркую окраску и буквально «пестрят» при их одновременном рассматривании (рис. 18.23, см. цв. вклейку). Именно поэтому набор сред Гисса с углеводами и цветным индикатором получил название «пестрый ряд углеводов». Их еще называют дифференциально-диагностическими средами, так как они позволяют идентифицировать вид бактерий.

Короткий «пестрый ряд» включает жидкие среды Гисса с моно- и дисахаридами: глюкозой, лактозой, сахарозой, мальтозой и 6-атомным спиртом — маннитом. В длинный «пестрый ряд» наряду с перечисленными углеводами вводят среды с разнообразными моносахаридами (арабиноза, ксилоза, рамноза, галактоза и др.) и спиртами (глицерин, дульцит, инозит и др.).

При проведении идентификации культуру микроорганизмов высевают на жидкие среды Гисса с поплавками (в 5 пробирок с глюкозой, лактозой, сахарозой, мальтозой и маннитом). Пробирки помещают в термостат при температуре 37 °С на срок 24 ч. Определяют в каждой пробирке происшедшие изменения, указывают наличие кислотообразования буквой «К», что видно по покраснению среды, и газообразования буквой «Г» в том случае, если поплавок заполнен газом.

Кроме сред Гисса сахаролитическую активность бактерий изучают на средах Эндо, Левина, Плоскирева. Микроорганизмы, ферментируя до кислоты находящийся в этих средах молочный сахар (лактозу), образуют окрашенные колонии — кислота изменяет цвет имеющегося в среде индикатора. Колонии микроорганизмов, не ферментирующих лактозу, бесцветны.

Определение протеолитических свойств микроорганизмов проводят на средах с желатином, молоком, сывороткой, пептоном. Пептон — промежуточный продукт распада белков, представляет собой смесь полипептидов и аминокислот. Он хорошо растворяется в воде и не свертывается.

вается при нагревании. Получают пептон из рубцов крупного и мелкого рогатого скота. Желатин — животный клей, состоящий из белка сухожилий, костей, хрящей. Он имеет светло-коричневый цвет и не имеет запаха и вкуса. Желатин плавится при температуре 32–34 °С и застывает при температуре 16 °С. При посеве уколом в столбик желатиновой среды бактерии, разлагающие желатин, разжижают среду.

В посевах в пептонную воду протеолитические свойства бактерий оценивают по образованию продуктов расщепления аминокислот после инкубирования в течение 2–3 сут при температуре 37 °С (таких как аммиак, индол, сероводород и др.).

Для обнаружения аммиака узкую полоску лакмусовой бумаги укрепляют под пробкой так, чтобы она не соприкасалась с питательной средой. Посинение бумаги свидетельствует об образовании аммиака.

Выявление индола осуществляют с помощью реактива Эрлиха. В пробирку с культурой бактерий прибавляют 2–3 мл этилового эфира, содержимое энергично перемешивают и добавляют несколько капель реактива Эрлиха (спиртовой раствор парадиметиламидобензальдегида с хлористоводородной кислотой). В присутствии индола наблюдают розовое окрашивание, при осторожном наклонении образуется розовое кольцо.

Для индикации сероводорода ( $H_2S$ ) в пробирку с пептонной водой помещают узкую полоску фильтровальной бумаги, смоченную сульфатом железа, и закрепляют ее под пробкой так, чтобы она не соприкасалась с питательной средой. При выделении сероводорода образуется нерастворимый сульфид железа ( $FeS$ ), окрашивающий бумагу в черный цвет. Продукцию  $H_2S$  можно определять также путем посева культуры бактерий уколом в столбик с питательной средой, содержащей реактивы для выявления сероводорода (смесь солей: железа сульфат, натрия тиосульфат, натрия сульфит). Положительный результат — среда приобретает черный цвет за счет образования  $FeS$ .

Действие микроорганизмов, разлагающих казеин (молочный белок), проявляется в пептонизации молока, которое приобретает вид молочной сыворотки. В процессе ферментации пептонов микроорганизмы образуют индол ( $C_8H_7N$ ), сероводород ( $H_2S$ ), аммиак ( $NH_3$ ) и другие соединения, которые обнаруживают с помощью приведенных выше методов.

**Редуцирующие свойства микроорганизмов.** Редукцией или восстановлением того или иного вещества называют химический процесс, состоящий в отнятии кислорода от данного вещества или замене его водородом. Имеются вещества, которые при редукции легко обесцвечиваются.

Наиболее часто применяют тесты на редукцию метиленового синего и хлорида трифенилтетразолия. Если микроорганизмы обладают реду-

цирующими свойствами, то внесенные в культуру красители обесцвечиваются (метиленовый синий) или приобретают вишневую окраску (восстановление бесцветного соединения трифенилтетразолия до трифенилформаза).

**Тест на каталазу.** Важным признаком у микроорганизмов служит обнаружение у них фермента каталазы. Для этого на предметное стекло наносят каплю 1–3% раствора водорода пероксида и бактериологической петлей в нее вносят исследуемую культуру бактерий. При положительном результате наблюдают выделение пузырьков газа (кислорода) в результате разложения  $H_2O_2$  на кислород и воду.

**Тест на плазмокоагуляцию** основан на свертывании плазмы в результате продукции плазмокоагулирующими бактериями тромбиноподобного вещества — плазмокоагулазы. Плазмокоагулазу определяют в пробирочном опыте путем вычисления скорости свертывания испытуемой культурой микроорганизмов цитратной кроличьей или человеческой плазмы.

Результаты биохимических тестов учитывают визуально во временной последовательности в соответствии с методикой анализа и вносят в бланк учета результата. По полученной комбинации результатов биохимических тестов с помощью таблицы определяют род и вид бактерий в исследуемых культурах.

Современные методы биохимической идентификации бактерий выделенных чистых культур представляют собой наборы тест-систем различного формата (планшеты, «стрипы», панели). Они позволяют быстро и надежно определить ферментативные свойства микроорганизмов. Тест-системы представляют собой наборы микропробирок или микроконтейнеров с определенными субстратами, дисками или полосками бумаги, пропитанными различными ингредиентами, наборы индикаторных карандашей и др. Такие системы значительно сокращают время анализа (рис. 18.24). В табл. 18.3 приведены варианты тест-системы для идентификации различных видов энтеробактерий «РАПИД-ЭНТЕРО-50».



Рис. 18.24. Тест-система для биохимической идентификации бактерий

Таблица 18.3. Варианты тест-систем «РАПИД-ЭНТЕРО-50»

Род, вид, бактерий	Номер лунок и тесты (субстрат)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+2	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+2	+/-	+	+	+	=	+	+	+	-	+	+	-
<i>Enterobacter spp.</i>	+	+/-	+	+	-/+	+/-	+	+	-	-	-	+	+
<i>Proteus vulgaris</i>	-/+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-/+	+1	+	-	-	+	-	+	-	-	-/+	+	+

Обозначения: «+1» – положительный результат за 1 ч; «+2» – положительный результат за 2 ч; «+» – положительный результат за 4 ч; «+/-» – положительный результат у более 50% штаммов; «-/+» – положительный результат у менее 50% штаммов; «-» – отрицательный результат.

В настоящее время наряду с методами классическими пробирочными и на основе использования наборов тест-систем «пестрого ряда» разработаны и широко используют автоматизированные системы идентификации бактерий — автоматические бактериологические анализаторы. В них идентификация бактерий основана на использовании методов турбидиметрии, колориметрии и флуоресценции для регистрации конечных результатов биохимических («пестрый ряд») и иммунологических тестов. Система включает ряд пластиковых планшетов, в которые помещены биохимически активные субстраты. Суспензию бактерий определенной концентрации вносят в лунки. Распознавание микроорганизмов наиболее часто основано на турбидиметрии раствора (суспензия бактерий и биохимического субстрата) в лунке. Время анализа от 4–8 до 18 ч.

#### 18.6.4.3. МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Масс-спектрометрия — метод исследования, основанный на разделении белков микроорганизмов после их ионизации в высоком вакууме с помощью электрических и магнитных полей на основании отношения массы белка к его заряду.

Чтобы получить масс-спектр белков, первоначально в анализаторе нейтральные белки микроорганизмов в пробе биологического материала превращаются в заряженные частицы — ионы (ионизируются). Затем в высоком вакууме с помощью электрических и магнитных полей разделяются на основании массы и полученного заряда в пространстве/времени. В последующем сигнал от полученных заряженных белков (ионов) фиксируется детектором ионов. Среди различных вариантов масс-спектрометрии в практике КДЛ для исследования пептидов, белков, углеводов, олигонуклеотидов наибольшее распространение получила MALDI — десорбционный метод «мягкой» ионизации, обусловленной воздействием импульсами лазерного излучения на матрицу с анализируемым веществом. Матрица представляет собой материал, свойства которого обуславливают понижение деструктивных свойств лазерного излучения и ионизацию анализируемого вещества. Последующее сопряжение метода MALDI (источник ионов) с время-пролетным (TOF) масс-спектрометром (система разделения ионов), в котором заряженные частицы разделяются по времени пролета определенного расстояния (при этом время пролета частицы пропорционально отношению массы данной частицы к ее заряду), привело к поистине революционным возможностям для использования метода в клинической практике. В настоящее время метод MALDI-TOF

позволяет осуществлять анализ биомолекул (ДНК, белки, пептиды и сахара) и крупных органических молекул (полимеры, дендримеры и другие макромолекулы). После ионизации, вызванной лазерным лучом, система выполняет сканирование на наличие белковых молекул микроорганизмов. Результаты анализа регистрируются в виде масс-спектров и в дальнейшем сравниваются с масс-спектрами определенных микроорганизмов, хранящимися в памяти компьютера анализатора, что позволяет установить вид и род микроорганизма.

Метод MALDI-TOF позволяет осуществить идентификацию микроорганизмов в течение нескольких минут, поэтому имеет первостепенное значение для ранней диагностики инфекционных заболеваний. Помимо типирования микроорганизмов метод способен обнаруживать генетические маркеры устойчивости бактерий к лекарственным средствам.

#### 18.6.4.4. ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Если из исследуемого биоматериала больного в лаборатории выделяют чистую культуру истинно-патогенных бактерий, то оценка результата анализа не вызывает сложности. Установленный вид микроорганизма служит возбудителем заболевания у пациента. Однако при выделении из биоматериала условно-патогенных микроорганизмов возникает ряд трудностей при оценке их этиологической роли в развитии гнойно-воспалительных заболеваний. Условно-патогенные микроорганизмы могут представлять нормальную микрофлору исследуемых жидкостей и тканей или контаминировать (инфицировать) их из окружающей среды. Однако, если исследуемый биоматериал в норме стерилен, как, например, СМЖ, экссудаты, всех выделенных из него микроорганизмов могут считать возбудителями заболевания. В отношении других биоматериалов для правильной оценки результатов бактериологических исследований необходимо знать состав естественной микрофлоры изучаемого образца. Отделяемое влагалища, кал, мокрота имеют собственную микрофлору, поэтому необходимо учитывать изменения ее качественного и количественного состава, возникновение несвойственных ему видов бактерий, количественную обсемененность биоматериала. Так, например, при бактериологическом исследовании мочи степень бактериурии (число бактерий в 1 мл мочи), равная и выше  $10^5$ , свидетельствует об инфекции мочевых путей. У здоровых людей может быть выявлена более низкая степень бактериурии, которая служит следствием загрязнения мочи естественной микрофлорой мочевых путей.



Установить этиологическую роль условно-патогенной микрофлоры помогают также нарастание количества и повторность выделения бактерий одного вида от больного в процессе заболевания.

Специалист лаборатории должен знать, что положительный результат бактериологического исследования в отношении биологического материала, полученного из очага, в норме стерильного (кровь, плевральная жидкость, СМЖ, пунктат органа или ткани), — всегда тревожный результат, о котором необходимо немедленно сообщить врачу лечащему, а в его отсутствие — дежурному.

### **18.6.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВАМ**

Чувствительность к антимикробным лекарственным средствам изучают на выделенных чистых культурах микроорганизмов, имеющих этиологическое значение для данного заболевания. Определение чувствительности бактерий к спектру антибиотиков помогает лечащему врачу правильно выбрать средство для лечения больного.

Методы определения чувствительности микроорганизмов к АБС подразделяют на методы серийных разведений и диффузионные.

**Методы серийных разведений** основаны на прямом определении основного количественного показателя, характеризующего микробиологическую активность АБС — величины его минимальной подавляющей концентрации (МПК). МПК — минимальная концентрация, подавляющая видимый рост исследуемого микроорганизма в бульонной культуре или на плотной среде.

Для определения МПК известные концентрации АБС вносят в питательную среду, которую затем засевают культурой исследуемого микроорганизма и после инкубации оценивают наличие видимого роста или его отсутствие.

В зависимости от характера используемой питательной среды для определения чувствительности бактерий к АБС различают методы серийных разведений в агаре или бульоне.

Общим и крайне важным этапом для всех методов серийных разведений служит приготовление растворов АБС. Различают «основные» растворы (пригодные для хранения) и «рабочие» — те, которые необходимо использовать сразу после приготовления.

Для приготовления основных растворов необходимо использовать субстанции АБС с известной активностью, лекарственные формы не пригодны. Для взвешивания субстанций необходимо использовать

электронные лабораторные весы с точностью до 4-го знака, для измерения объемов — калиброванные дозаторы и пипетки.

В пробирки с питательной средой вносят соответствующее разведение АБС и добавляют суспензию чистой бактериальной культуры. В контрольную пробирку вместо АБС вносят аналогичное количество питательного бульона без антибиотика («отрицательный контроль»).

Пробирки закрывают стерильными ватно-марлевыми пробками или металлическими колпачками. Все пробирки с тестируемыми штаммами, кроме пробирки «отрицательный контроль», инкубируют в обычной атмосфере при температуре 35 °С в течение 16–20 или 20–24 ч (в зависимости от вида тестируемого микроорганизма). Пробирку «отрицательный контроль» помещают в холодильник при температуре 4 °С, где хранят до учета результатов.

Для определения наличия роста микроорганизма пробирки с посевами просматривают в проходящем свете. Рост культуры в присутствии АБС сравнивают с референтной пробиркой («отрицательный контроль»), содержащей исходную суспензию чистой культуры и хранившейся в холодильнике. МПК определяют по наименьшей концентрации АБС, которая подавляет видимый рост микроорганизмов.

Метод серийных разведений в агаре заключается в посеве тестируемых микроорганизмов на чашки Петри с агаром, содержащими последовательные двойные разведения антибиотиков. После внесения суспензии чистой культуры чашки оставляют при комнатной температуре для подсыхания, далее переворачивают и инкубируют при температуре 35 °С в течение 18–24 ч (в зависимости от вида тестируемого микроорганизма). Учет результатов проводят, поместив чашку на темную, не отражающую свет, поверхность. За МПК принимают концентрацию, вызвавшую полную ингибицию видимого роста.

**Диффузионные методы** определения чувствительности основаны на диффузии АБС из носителя в плотную питательную среду и подавлении роста исследуемой культуры в той зоне, где концентрация АБС превосходит МПК. В настоящее время существуют две основные модификации диффузионного метода: диско-диффузионный и E-тест.

Диско-диффузионный метод определения чувствительности основан на способности АБС диффундировать из пропитанных ими бумажных дисков в питательную среду, угнетая рост микроорганизмов, посеянных на поверхности агара.

При определении чувствительности диско-диффузионным методом используют стандартную суспензию чистой культуры (инокулюм), соответствующий по плотности 0,5 по стандарту МакФарланда и содержащий примерно  $1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл бактерий. Стандарт МакФарланда,

или мутности, позволяет определить спектрофотометрически или визуально по мутности приготовленной суспензии чистой культуры количество микроорганизмов в единице объема. При длине светового пути (размер кюветы) 1 см и длине волны 625 нм оптическая абсорбция стандарта МакФарланда 0,5 должна составлять 0,08–0,13.

В диско-диффузионном методе в качестве носителя АБС используют бумажный диск. Образование зоны подавления роста происходит в результате диффузии АБС из носителя в питательную среду. В определенных пределах величина диаметра зоны подавления роста обратно пропорциональна МПК. Однако диско-диффузионный метод позволяет лишь косвенно судить о величине МПК, а результатом исследования считают отнесение микроорганизма к одной из категорий чувствительности (чувствительный, промежуточный или резистентный).

Для определения чувствительности диско-диффузионным методом следует использовать только стандартизированные качественные диски. Изготовление дисков с АБП, необходимых для определения чувствительности диско-диффузионным методом, в лабораторных условиях нецелесообразно.

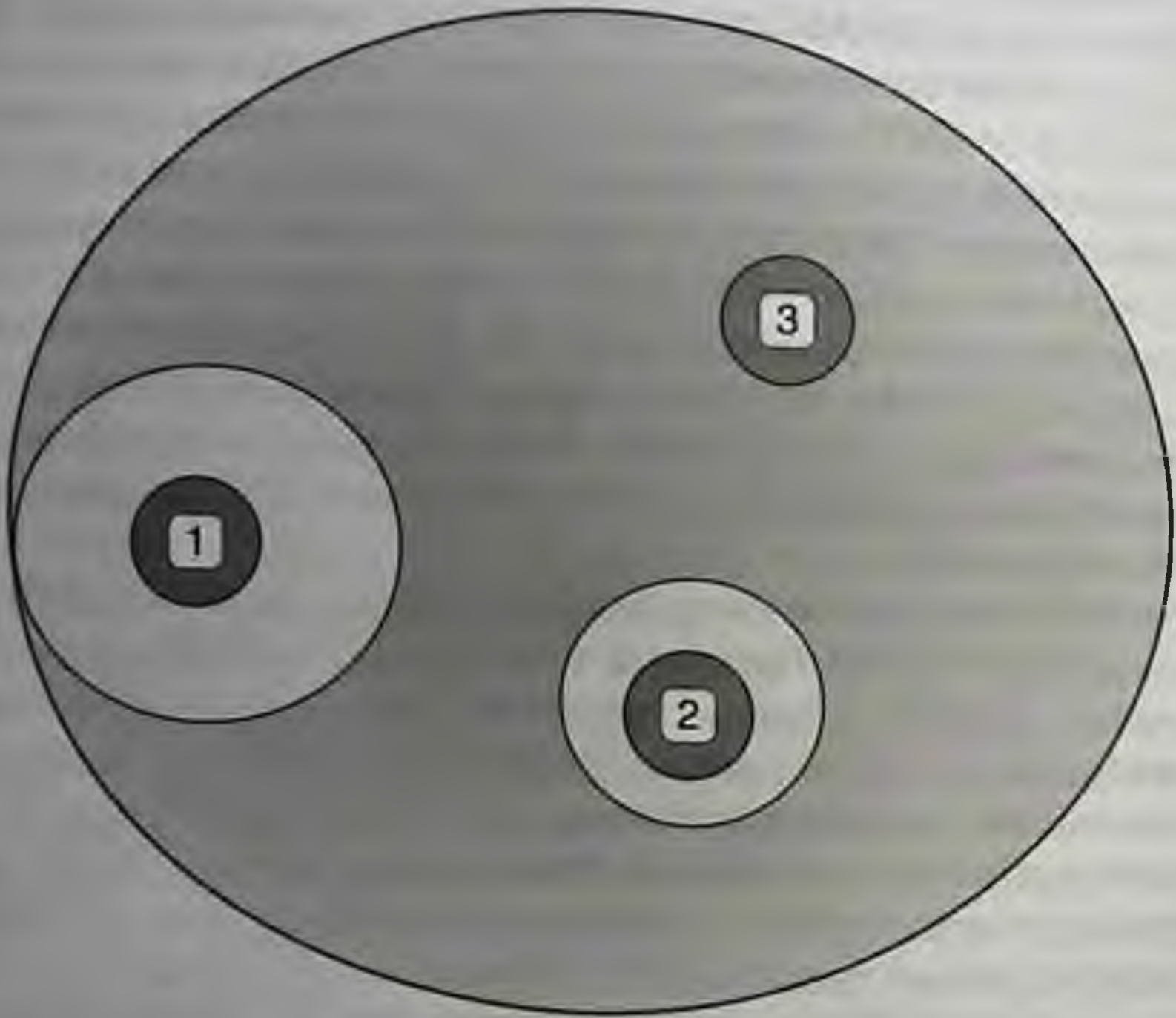
Для получения правильных результатов определения чувствительности диско-диффузионным методом необходимо строго соблюдать правила хранения и использования дисков. В противном случае содержание в них антибиотиков может снизиться ниже допустимого уровня (прежде всего, в результате увлажнения) еще до истечения срока годности.

Первоначально на поверхность питательной среды вносят суспензию чистой культуры, а затем, не позднее чем через 15 мин, на поверхность среды наносят диски с АБС. Аппликацию (нанесение) дисков проводят с помощью стерильного пинцета или автоматического диспенсера. Расстояние от диска до края чашки и между дисками должно быть 15–20 мм. Таким образом, на одну чашку диаметром 100 мм следует помещать не более 6 дисков с АБС. Диски должны равномерно контактировать с поверхностью агара, для чего их следует аккуратно прижать пинцетом.

Сразу после аппликации дисков чашки Петри помещают в термостат кверху дном и инкубируют при температуре 35 °С в течение 18–24 ч (в зависимости от вида тестируемого микроорганизма). Увеличение интервала времени между нанесением дисков на поверхность среды и началом инкубации (а соответственно — началом роста исследуемой культуры микроорганизма) приводит к «преддиффузии» АБС в агар и увеличению диаметра зоны подавления роста.

После окончания инкубации чашки помещают кверху дном на темную матовую поверхность так, чтобы свет падал на них под углом 45°

(учет в отраженном свете). Диаметр зон задержки роста измеряют с точностью до 1 мм, предпочтительнее пользоваться штанген- или кронциркулем. При измерении зон задержки роста следует ориентироваться на зону полного подавления видимого роста (рис. 18.25). Не следует обращать внимания на очень мелкие колонии, выявляемые в пределах зоны задержки роста только при особых условиях освещения или увеличении, и едва заметный налет у края зоны.



**Рис. 18.25.** Определение чувствительности к антибактериальным лекарственным средствам диско-диффузионным методом: 1 — микроорганизм чувствителен (есть большая зона подавления роста микроорганизмов вокруг диска с антибактериальным лекарственным средством); 2 — микроорганизм умеренно резистентен (есть небольшая зона подавления роста микроорганизмов вокруг диска); 3 — микроорганизм устойчив (нет зоны подавления роста микроорганизмов вокруг диска)

Е-тест представляет собой узкую полоску полимера (0,5×6,0 см), на которую нанесен градиент концентраций АБС (от минимальных до максимальных). Подавление роста микроорганизма вокруг полоски Е-теста происходит только в той зоне, где концентрация АБС, диффундирующего из носителя, выше МПК, при этом образуется каплевидная зона ингибиции. Значения концентрации АБС в каждом участке носителя типографским способом нанесены на наружной (обращенной

к исследователю) поверхности Е-теста. Величину МПК учитывают в том месте, где граница зоны подавления роста вплотную подходит к носителю. Детальные инструкции по определению чувствительности с использованием Е-тестов изготовители прилагают к набору реактивов.

### 18.6.6. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЕ АНАЛИЗАТОРЫ

Автоматизация бактериологических исследований — одно из недавних достижений современных технологий, позволяющее обнаружить и идентифицировать микроорганизмы, а также проводить определение их антибиотикочувствительность всего за несколько часов или минут, вопреки классическому микробиологическому анализу, продолжительность которого может достигать нескольких дней. Приборы, которые способны решать перечисленные задачи, получили название «бактериологические анализаторы». В зависимости от предназначения, бактериологические анализаторы используют в своей работе ИФА, турбидиметрический, колориметрический масс-спектрометрический и другие методы анализа.

По предназначению различают бактериологические анализаторы для:

- исследования крови на стерильность;
- идентификации микроорганизмов;
- определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам;
- идентификации и определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам.

#### 18.6.6.1. АНАЛИЗАТОРЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ КРОВИ НА СТЕРИЛЬНОСТЬ

Быстрая и точная идентификация бактерий или грибов, вызывающих инфекции кровотока, жизненно важна для диагностики и лечения сепсиса. Это обусловлено тем, что каждый час задержки назначения антибактериальной терапии увеличивает летальность сепсиса на 7,6%. Посев крови служит одним из самых простых и часто используемых методов обследования, направленных на установление этиологии системных инфекций кровотока. Культура крови — лабораторный анализ, при котором кровь, взятую у пациента, вносят во флаконы, содержащие питательную среду. Ускоренное получение положительного результата посева крови на гемокультуру значительно улучшает исходы заболевания и повышение эффективности лечения пациента.

Для решения этой жизненно важной для больного проблемы используют анализаторы гемокультур.

Принцип работы таких анализаторов состоит в инкубировании при оптимальной температуре (37 °С) и как можно скорейшему обнаружению положительных образцов крови, помещенных во флакон со специальной средой. Постоянный мониторинг роста микроорганизмов во флаконе с питательной средой основан на методе флуоресценции или колориметрии и контроля газообразования. Для ускорения получения результата используют несколько типов флаконов: с аэробными и анаэробными средами, со средами для улучшенной детекции грибов и микобактерий в крови. Все среды в основе своей имеют триптазо-соевый бульон. Флаконы содержат частицы латекса или уголь активированный, адсорбирующие антибиотики из крови, а также способствующие лизису клеток крови и освобождению внутриклеточных бактерий. Флаконы для обнаружения дрожжей и грибов содержат специальную селективную среду, которая включает хлорамфеникол и тобрамицин для подавления роста сопутствующей бактериальной флоры, лизирующие вещества (сапонин) высвобождают фагоцитированные дрожжи и плесени из лейкоцитов крови.

Флаконы со средой и образцом крови помещают в индивидуальные ячейки анализатора в инкубационном блоке. Далее тестирование выполняется без каких-либо манипуляций со стороны специалиста лаборатории (до того момента, когда флакон признается положительным и извлекается для дальнейшей работы: окраски по Граму и дальнейшего культивирования для выделения чистой культуры и ее идентификации). Каждый флакон с гемокультурой индивидуально считывается регистрационным блоком анализатора каждые 10–15 мин до появления признаков микробного роста. Результаты каждого считывания каждого флакона сохраняются и анализируются компьютерной системой, при этом строится кривая микробного роста на основании алгоритмов, заложенных в программное обеспечение каждого прибора.

В основание каждого флакона введен угольный диоксид (сенсор), отделенный от кровяного бульона флакона мембраной, полупроницаемой для  $\text{CO}_2$ , что позволяет определять количество углекислого газа во флаконе по изменению цвета сенсора при увеличении его концентрации во флаконе. Кроме того, в основании ячейки для каждого флакона, находящегося на инкубации, расположен светоизлучающий и светопоглощающий диод. Несмотря на схожее устройство детектирующего блока анализатора, сам принцип регистрации роста гемокультуры может различаться. В одних анализаторах (например, в анализаторах BD BACTEC TM компании Becton Dickinson) фотоде-

текторы прибора измеряют уровень флуоресценции, который зависит от объема выделяемого  $\text{CO}_2$ . Далее эти измерения интерпретируются прибором в соответствии с критериями, заложенными в его программу. При выявлении положительных культур (увеличение концентрации  $\text{CO}_2$  во флаконе) анализатор немедленно извещает об этом посредством светового и звукового сигнала и выводит данные на монитор. В других анализаторах (например, VacT/ALERT 3D компании bioMérieux) в дно флакона встроен колориметрический сенсор (рис. 18.26). При росте микроорганизмов во флаконе выделяется углекислый газ, под действием которого сенсор меняет цвет. Изменение цвета регистрируется фотометром анализатора. В третьем типе анализаторов гемокультур используют манометрический метод детекции. Флаконы с гемокультурой помещают в анализатор, где проводится непрерывный мониторинг наличия/отсутствия роста во флаконе по изменению давления в результате потребления и/или выделения газов ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$  и  $\text{H}_2$ ).



**Рис. 18.26.** Анализатор гемокультур VacT/ALERT 3D компании bioMérieux

Анализаторы гемокультур отличаются по количеству одновременно загружаемых флаконов с гемокультурой (от 50 до 320 флаконов одном блоке) и, соответственно, производительности, габаритам и весу.

Положительный результат гемокультивирования либо устанавливает, либо подтверждает инфекционную этиологию заболевания пациента. На следующих этапах анализа проводят выделение самого этиологического агента и определение его чувствительности к антибиотикам, что позволяет оптимизировать лечение. При использовании автоматических анализаторов гемокультур 94% клинически значимых

микроорганизмов выявляют в течение первых 2 дней инкубирования, и 98% — в течение первых 3 дней после посева.

### 18.6.6.2. АНАЛИЗАТОРЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ

Современные бактериологические анализаторы разработаны для ускорения получения результатов идентификации и определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. По методу количественного анализа, на котором основано измерение результатов исследования, бактериологические анализаторы можно разделить на 2 группы.

- Анализаторы на основе физико-химических методов количественного анализа — различных вариантов оптической спектроскопии. В таких анализаторах идентификация и определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам основана на использовании методов турбидиметрии, колориметрии и флуоресценции для регистрации конечных результатов биохимических («пестрый ряд») тестов.
- Масс-спектрометры, использующие для регистрации физический метод количественного анализа, основанный на ионизации молекул изучаемого вещества с последующим разделением ионов по величине отношения массы к заряду.

К первой группе относят бактериологические анализаторы, в которых автоматизированы частично или полностью традиционные ручные процедуры идентификации и определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Для биохимической дифференциации бактерий (исследования сахаро-, протео-, гемолитических и редуцирующих свойств микроорганизмов в полученной чистой культуре) в бактериологических анализаторах используют специальные тест-карты или тест-панели (стрипы). Тест-карты включают различное количество мини-контейнеров или лунок (от 30 до 64 лунок в зависимости от конкретного анализатора), запаянных таким образом, чтобы исключить всякую контаминацию. Каждая лунка заполнена комбинированными субстратами для оценки сахаро-, протео-, гемолитических и редуцирующих свойств микроорганизмов.

Все бактериологические анализаторы первой группы по уровню автоматизации разделяют на две группы:

- полуавтоматические;
- автоматические.



Для работы на полуавтоматическом бактериологическом анализаторе необходимо получить чистую культуру возбудителя, после чего провести микроскопию и окрашивание по Граму, а также поставить ряд ориентировочных тестов. Эта первичная информация о возбудителе определяет выбор тест-систем (панелей) для дальнейшей работы с культурой уже на приборе. Использование готовых тест-панелей, специально разработанных фирмой-производителем для работы на каждом конкретном приборе, с одной стороны, существенно упрощает и ускоряет схему проведения идентификации возбудителя и определение антибиотикограммы, с другой стороны, позволяет получить высокоспецифичный стандартизованный результат. Тест-системы для одного прибора не могут быть использованы для прочтения результата на другом. На рис. 18.27 представлена тест-панель, помещенная в полуавтоматический анализатор для считывания результатов.



Рис. 18.27. Тест-панель, помещенная в полуавтоматический анализатор для считывания результатов

Для работы на панелях (стрипах) необходимо приготовить раствор из культуры выращенного возбудителя, что требует высокой точности, так как в определенном объеме жидкости должно быть строго определенное количество микроорганизмов. Для этого пользуются шкалой мутности по МакФарланду. В лунках панелей находятся лиофилизированные биохимические субстраты, которые при добавлении раствора тестируемой живой культуры вступают или не вступают в реакцию с изменением при этом либо цвета, либо мутности, либо с образованием пузырьков воздуха. Результаты реакции можно получить только после периода инкубации (4 или 18–24, иногда до 48 ч, в зависимости от используемого протокола работы, в определенных температурных и атмосферных условиях). Для инкубации используют лабораторный термостат, обеспечивающий соответствующий температурный режим.

Панели для определения чувствительности возбудителей к антибиотикам также выпускают фирмы-производители, это стандартный набор антибиотиков, представленных в двух концентрациях. Результаты исследования определяются по наличию роста в лунках панели и сравнению с контролем. Они могут быть представлены в виде: чувствителен, умеренно-устойчив и устойчив (S, I, R).

Полуавтоматические бактериологические анализаторы по сути своей являются только считывающим устройством результатов тестов, полученных в каждой лунке, и анализа этих данных для выдачи окончательного ответа либо по идентификации, либо по чувствительности микроорганизма к антибиотикам. В большинстве случаев они представляют собой 8-канальный вертикальный фотометр со встроенным термостатом (14–40 °С), системой съемных фильтров и встряхивателем, совместим с компьютером, который работает в зависимости от программного обеспечения как микробиологический или иммуноферментный анализатор. Тест-системы для идентификации выпускают в формате 96-луночных планшетов.

Автоматические анализаторы отличаются от полуавтоматических тем, что инкубация, считывание результата и его обработка проходят без участия специалиста лаборатории. Бактериологический анализатор состоит из следующих блоков:

- считыватель штрих-кода для тест-карт;
- устройство для заполнения тест-карт;
- устройство для запаивания тест-карт;
- инкубатор;
- автоматизированное регистрирующее устройство (ридер);
- программное обеспечение.

В бактериологических анализаторах используют следующие виды тест-карт.

- Тест-карты для идентификации грамположительных бактерий. Специфичны для грамположительных кокков, стафило-, стрепто-, энтерококков и подобным им микроорганизмам. Время, необходимое для получения результата, 2–8 ч.
- Тест-карты для идентификации грамотрицательных бактерий. Специфичны для грамотрицательных бацилл, дрожжей и не дрожжевых бактерий. Время, необходимое для получения результата, 2–10 ч.
- Тест-карты для идентификации бацилл. Карты специфичны для грамположительных и грамотрицательных спорообразующих бацилл. Время, необходимое для получения результата, 14 ч.

- Тест-карты для идентификации дрожжей. Специфичны для дрожжей и дрожжеподобных микроорганизмов. Время, необходимое для получения результата, 18 ч.
- Тест-карты для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.
  - ◊ Для грамотрицательных микроорганизмов карты содержат от 18 до 20 антибиотиков в концентрациях, соответствующих 5–7 разведениям; минимальное время до получения результата — 5 ч, максимальное — 15 ч, среднее — 6,5 ч.
  - ◊ Для грамположительных микроорганизмов карты содержат от 19 до 22 антибиотиков в концентрациях, соответствующих 5–7 разведениям; определение минимальных ингибирующих концентраций.

В большинстве бактериологических анализаторов используют фотометрический метод регистрации результатов реакций в тест-картах. Однако в ряде анализаторов (например, анализатор Walk Away-40) дополнительно могут быть использованы тест-панели с флуоресцентной меткой, что позволяет получать результаты идентификации большинства микроорганизмов в течение 2–4 ч (рис. 18.28).



Рис. 18.28. Автоматический бактериологический анализатор Walk Away-40

В бактериологических анализаторах технологический процесс получения результатов анализа значительно упрощен благодаря заполненным реагентами и запечатанным лункам на тест-картах, автоматической загрузке карт в ридер и их сбросу в коллектор для отходов

по завершению процесса идентификации. Тест-карты имеют штриховой код для предотвращения ошибок при регистрации результатов.

Программное обеспечение содержит расширенную базу данных о множестве различных штаммов и видов микроорганизмов, которая обеспечивает точность идентификации в пределах 96% для бактерий грамположительных и 95% — для грамотрицательных, в 89% — для бацилл и 85% точности — для дрожжей.

Производительность бактериологического анализатора определяется количеством тест-карт для одновременной загрузки и может колебаться от 30 до 100 тест-панелей и более.

Масс-спектрометр представляет собой вакуумный прибор, способный определять массы атомов (молекул). Принцип работы анализатора основан на использовании физических законов движения заряженных частиц, обладающих различной молекулярной массой, в электрических и магнитных полях, что позволяет получить масс-спектр изучаемого объекта. При проведении анализа пробы, содержащей микроорганизмы, масс-спектрометр позволяет с высокой точностью определить количественный и качественный состав вещества, его структуру, физико-химические свойства. Масс-спектрометры используют для идентификации микроорганизмов в биологических средах (мицелиальных грибов, дрожжей, грамположительных и грамотрицательных бактерий), видового типирования бактерий, то есть выявления их родовой и видовой принадлежности, определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам. Использование в масс-спектрометрии технологии MALDI-TOF позволяет получить данные максимальной точности. MALDI представляет собой «мягкий» способ ионизации. Вспомогательная матрица снижает разрушительные свойства лазерного излучения, что обеспечивает ионизацию крупных биомолекул без дегградации. TOF — принцип работы анализатора масс-спектрометра. Он фиксирует время пролета заряженными частицами (белками микроорганизмов) конкретного расстояния и разделяет ионы по этому фактору. Время пролета при этом пропорционально отношению массы частицы к ее заряду.

Современные масс-спектрометры состоят из следующих узлов:

- источник ионов, преобразующий составляющие микроорганизмов (нейтральные молекулы и атомы) в заряженные частицы — ионы;
- микробиологический анализатор, который разделяет заряженные ионы по времени пролета в масс-спектрометре определенного расстояния;
- детектор, фиксирующий сигнал ионов;

- программное обеспечение, осуществляющее обработку полученных результатов, их анализ и конечную идентификацию микроорганизмов.

В процессе измерений получают спектр константных белков исследуемых микроорганизмов, который в дальнейшем сравнивают с базой данных, то есть характерным спектром белков для известных микроорганизмов. В результате сравнения спектров определяют родовую и видовую принадлежность бактерий. Помимо идентификации и типирования микроорганизмов масс-спектрометры позволяют определить их чувствительность к антибиотикам. С помощью этого анализатора можно регистрировать изменения в реакции среды на тот или иной антибактериальный препарат, что позволяет установить ряд наиболее эффективных препаратов для лечения конкретных видов бактерий.

Вся методика идентификации микроорганизмов на масс-спектрометре состоит из двух этапов.

- Этап I — подготовка образца. На подложке масс-спектрометра смешивают биологический материал из колонии бактерий и специальную матрицу (2',5'-дигидроксибензойная кислота, раствор уже готов к использованию и устойчив к свету); образцом может служить первичная колония.
- Этап II — идентификация. Подготовленный образец помещают в прибор (рис. 18.29) и подвергают воздействию лазерных импульсов. При этом молекулы матрицы и материал из бактерий (в частности, белки) переходят в газовую фазу, а протонированные молекулы матрицы взаимодействуют с белками, перенося на них положительный заряд. Под действием электрического поля ионизированные белки движутся от источника ионизации к детектору с ускорениями, обратно пропорциональными их атомным массам.

В дальнейшем программное обеспечение анализатора оценивает время пролета частиц и преобразует эту информацию в спектр молекулярных масс (масс-спектр). Масс-спектр сравнивается со спектрами микроорганизмов из базы данных, и на основании сведений о массах характеристических белков происходит идентификация микроорганизмов. Затраты по времени для идентификации составляют всего 2–3 мин.

База данных современного масс-спектрометра состоит из более чем 750 клинически значимых видов микроорганизмов (бактерий, дрожжей, плесневых грибов/дерматофитов, микобактерий) и покрывает большинство видов, встречаемых в ежедневной практике микробиологической лаборатории.



**Рис. 18.29.** Помещение подготовленных проб в масс-спектрометр для анализа

Главные преимущества масс-спектрометра в том, что он обладает гораздо более высокой достоверностью идентификации микроорганизмов по сравнению со стандартными биохимическими методами, позволяет сократить время получения результата до 2–3 мин и имеет очень низкую себестоимость анализа, так как для него используют небольшое количество расходных материалов (стоимость 1 исследования складывается из цены одноразовых планшет и матрикса).

## КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ

1. Какие варианты нативного препарата используют в лаборатории для оценки подвижности бактерий?
2. Какие способы фиксации мазков применяют в лаборатории?
3. Для чего используют окраску мазков по Граму?
4. Перечислите основные реактивы (красители), которые используют при окраске мазков по Граму.
5. В чем сущность окраски мазков по Цилю–Нильсену?
6. Что такое культура?
7. Что такое накопительная культура?
8. Что такое чистая культура?
9. Перечислите основные способы посева на жидкие питательные среды.
10. Перечислите основные способы посева на твердые питательные среды.

11. Что такое культивирование?
12. Что такое КОЕ?
13. Что следует понимать под идентификацией культур?
14. Перечислите основные способы идентификации культур.
15. Что собой представляет среда Гисса?
16. Что такое «пестрый ряд» углеводов?
17. Что такое масс-спектрометрическая идентификация микроорганизмов?
18. Перечислите методы определения чувствительности микроорганизмов к АБС.
19. Что такое МПК?
20. Что такое стандарт МакФарланда?
21. Перечислите принципы работы анализаторов гемокультур.
22. Как классифицируют современные бактериологические анализаторы?
23. В чем сущность масс-спектрометрической идентификации микроорганизмов?

## РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Гудер В.Г., Нарайана С., Вислер Г., Цавта Б. Пробы: от пациента до лаборатории. Влияние факторов преаналитического этапа на качество результатов лабораторных исследований / пер. с англ. Мюнхен: GIT VERLAG, 2003. 105 с.

Долгов В.В., Мошкин А.В. Обеспечение качества в клинической лабораторной диагностике. Практическое руководство. М.: Медиздат, 2004. 216 с.

Камышева К.С. Основы микробиологии и иммунологии. Ростов н/Д: Феникс, 2015. 382 с.

Кишкун А.А. Диагностика неотложных состояний: руководство для специалистов клиничко-диагностической лаборатории и врачей-клиницистов. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. 736 с.

Кишкун А.А. Руководство по лабораторным методам диагностики. 2-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. 760 с.

Кишкун А.А. Современные технологии повышения качества и эффективности клинической лабораторной диагностики. М.: РАМЛД, 2005. 528 с.

Клиничко-лабораторные аналитические технологии и оборудование / под общ. ред. В.В. Меньшикова. М.: Академия, 2007. 240 с.

Любимова Н.В., Бабкина И.В., Тимофеев Ю.С. Теория и практика лабораторных биохимических исследований. учебник для колледжей. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2020. 416 с.

Мальцев В.Н., Пашков Е.П., Хаустова Л.И. Основы микробиологии и иммунологии. М.: Медицина, 2005. 280 с.

Медицинская паразитология / под общ. ред. Н.В. Чебышева. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2017. 432с.

Обеспечение качества лабораторных исследований: преаналитический этап. Справочное пособие / под общ. ред. В.В. Меньшикова. М.: Лабинформ, 1999. 315 с.

Пустовалова Л.М. Основы биохимии для медицинских колледжей. 2-е изд. Ростов н/Д: Феникс, 2004. 448 с. Серия «Медицина для вас».

Пустовалова Л.М., Никанорова И.Е. Физико-химические методы исследования и техника лабораторных работ. Ростов н/Д: Феникс, 2017. 300 с.

Тиц Н. Клиническое руководство по лабораторным тестам. М.: Юнимед-пресс, 1997. 960 с.

Шабалова И.П., Полонская Н.Ю., Касоян К.Т. Теория и практика лабораторных цитологических исследований. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2018. 176 с.



# ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

## А

- Авидность 427
- Адреналин 129
- Азот остаточный 91
- Алкалоз
  - метаболический 284
  - респираторный 283
- Альбумин 78
- Амебиаз 30
- Амилаза 187
- Анализ
  - иммуноцитофлуориметрический 379
  - крови
    - белков 74
    - мокроты 59
- Анализатор
  - бактериологический 597
  - биохимический 318
  - калибровка 328
- Ангиопатия диабетическая 143
- Андрогены 502
- Анемия 305
- Антиген
  - раковый СА-125 402
- Аскаридоз 39
- АСТ 193
- Атеросклероз 163
- Ацидоз респираторный 282

## Б

- Бактериоскопия 554
- Бактериурия
  - асимптоматическая 537
- Баланс
  - водный 239
  - калия 253

кальция 257

натриевый 246

Балантидиаз 32

Билирубин 206

Болезнь

Аддисона 490

Грейвса 479

Жильбера 218

Иценко—Кушинга 489

новорожденного гемолитическая 422

## В

Вагинит 547

Вагиноз 547

ВИЧ-инфекция 442

Волчанка системная красная 393

Время

активированное частичное

тромбопластиновое 345

протромбиновое 343

свертывания по Сухареву 342

тромбиновое 346

## Г

Газы крови 269

Гельминтоз 37

Гематоксилин

Гарриса 67

Гемостаз 333

Гемохроматоз 307

Гепарин 350

Гепатит

А 446

В 447

С 452

Д 455

Е 455

G 457  
 вирусный 446  
 Гестагены 500  
 Гипербилирубинемия 216  
 Гиперволемиа 241  
 Гипергликемия 130  
 Гиперкалиемиа 255  
 Гиперкальциемиа 262  
 Гиперкортицизм 488  
 Гипернатриемиа 250  
 Гиперпротеинемия 77  
 Гипертиреоз 479  
 Гиперхолестеринемия 166  
 Гипоальбуминемия 219  
 Гиповолемиа 241  
 Гипогликемия 142  
 Гипогонадизм 513  
 Гипокалиемиа 253  
 Гипокальциемиа 260  
 Гипонатриемиа 248  
 Гипопаратиреоз 261  
 Гипопротеинемия 77  
 Гипотиреоз 481  
 Гипофиз 466  
 Гликогенолиз 124  
 Глоссит 313  
 Глюкагон 127  
 Глюкокортикоиды 129  
 Глюкометры 148  
 Гонадотропины 494  
 Гонорея 549  
 Гормоны 464  
     антидиуретический 234  
 Группа крови 413  
 Д  
 Дегидратация 242  
 Дедерлейна палочки 544

Десквамация эпителия 52  
 Дефект синтеза белков 83  
 Диабет сахарный 131  
 Дисбактериоз 541  
 Диспротеинемия 80

## Ж

Железа  
     поджелудочная 183  
     щитовидная 471  
 Железо 295  
     дефицит 302  
 Желтуха 216  
 Жидкость организма 227

## З

Зоб 478

## И

Идентификация  
     бактерий 579  
     биохимическая 585  
     культуральная 581  
     масс-спектрометрическая 591  
 Иммунитет  
     гуморальный 385  
     клеточный 368  
 Иммуноглобулины 370  
 Инсулин 126  
 Инфаркт  
     миокарда 192

## К

Кандидоз 550  
 Кетоацидоз 144  
 Кислоты  
     мочевая 108  
     фолиевая 308

- Коагулометры 357  
Коагулопатия 351  
Колония 581  
Коэффициент гликемический 141  
Крапивница 422  
Креатинин 92  
Креатинкиназа 193  
Кровотечение  
    время 340  
    длительность 340  
Куссмауля дыхание 145
- Л**
- Лактатдегидрогеназа 194  
Лактобациллы 544  
Лангерганса островки 126  
Липаза 187  
Лямблиоз 31
- М**
- Мазок 62  
    из шейки матки 55  
    отпечаток 63  
    по Като 43  
    фиксация 65, 558  
Макрофаги 367  
Малярия 19  
Маркеры  
    миокардиальные 199  
    опухолевые 398  
Менопауза 511  
Метод  
    гексокиназный 153  
    глюкозодегидрогеназный 153  
    глюкозооксидазный 150  
    гравиметрический 112  
    Ендрашика—Клегхорна—  
        Грофа 210  
    Илька 168  
    ионометрический 264  
    Каравея 178  
    кинетические 177  
    клоттинговый 352  
    мазка влажного 37  
    окраски регрессивный 69  
    определения билиру-  
        бина 209  
    отпечатка перианаль-  
        ного 45  
    Поппера 121  
    Райтмана—Френкеля 179  
    толстых капель 24  
    ферментативные 214  
    цитологии жидкост-  
        ной 64  
    электрофореза  
        белков 79  
    электрофоретический 115  
Микроальбуминурия 146  
Миоглобин 195  
Моча 92  
Мочевина 96
- О**
- Обмен  
    белков промежуточный 90  
Окраска  
    по  
        Граму 560  
        Цилю—Нильсену 562  
Опухоль  
    злокачественная 49  
Орозомукоид 85  
Ответ иммунный 376  
Оценка результатов исследова-  
    ния 592

## П

Панкреатит 183, 188  
 Парапротеинемия 83, 387  
 Печень 204  
 Подагра 109

## Посев

газоном 576  
 глубинный 577  
 дробный 576  
 крови 524  
 мокроты 553  
 мочи 532  
 тампоном 577  
 техника 570  
 уколом 571  
 цель 569

Преальбумин 81

## Проба

жгута 339  
 Реберга—Тареева 103  
 шипка 339

Пролактин 497

Простейшие 28

## Р

## Рак

пузыря мочевого 60  
 шейки матки 54

## Реакция

агглютинации 429  
 гемагглютинации 431  
 Златкиса—Зака 168  
 иммунофлуоресценции 433  
 Либерманна—Бурхарда 168  
 нейтрализации 432  
 полимеразная цепная 459  
 посттрансфузионная 418  
 преципитации 431

связывания компонента 432

ферментативная 175

Яффе 121

Регуляция глюкозы 125

## С

Свертывание 331

Сепсис 525

## Синдром

адреногенитальный 492

климактерический 512

Шерешевского—Тернера 508

Штейна—Левенталя 510

## Система

гемостаза 331

иммунная 364

Келл 408

резус-фактора 407

Сифилис 438

Скорость фильтрации клубочковой 94

## Состояние

кисотно-основное 280

Спектрофотометрия 267

## Т

## Тест

Варбурга 179

глюкозотолерантный 134

скрининговый 58

Тимус 365

Трансферрин 300

Триглицериды 158

Трихомоназ 549

Тропонин 195

Турбидиметрия 119

ТЭЛА 348

## У

Углеводы 122

## Ф

Фагоцитоз 372

Фагоциты 367

Фактор

антинуклеарный 396

ревматоидный 394

Ферменты 170

панкреатические 186

расчет активности 181

Ферритин 301

Фетопротеин-альфа 400

Фибриноген 346

Фосфатаза щелочная 215

Фотометры 318

## Х

Хасимото тиреоидит 482

Хиломикроны 159

Хламидиоз 548

Холестерин 157, 167

## Ц

Церулоплазмин 86

Цикл менструальный 504

Цистит 536

Цисты 30

## Ш

Шпатель

Эйра 57

Штамм 581

## Э

Электрофорез 115

Энтеробиоз 41

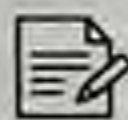
Эстрогены 499

# ТЕОРИЯ И ПРАКТИКА ЛАБОРАТОРНЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

- Учебник разработан в соответствии с федеральным государственным образовательным стандартом среднего профессионального образования по специальности 31.02.03 «Лабораторная диагностика».
- В книге представлены основы биохимии, включая представления о биоорганических соединениях и их функциях в организме, особенностях и многообразии обмена веществ, взаимосвязи его разных этапов, рассмотрена биохимическая природа различных заболеваний. Большое внимание уделено принципам биохимических исследований и их интеграции с новыми технологиями, а также детализированному описанию тестов, используемых в лабораторной практике.
- Издание предназначено для студентов и преподавателей медицинских колледжей, а также может быть полезным студентам высших медицинских учебных заведений и начинающим специалистам всех клинических специальностей.



**Учебное издание**



**Авторы**

**Н.В. Любимова,  
И.В. Бабкина,  
Ю.С. Тимофеев**



**2020 г., 416 с.**



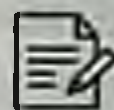
**ИЗДАТЕЛЬСКАЯ ГРУППА  
«ГЭОТАР-Медиа»  
geotar.ru**

# ТЕОРИЯ И ПРАКТИКА ЛАБОРАТОРНЫХ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

- Учебник разработан в соответствии с федеральным государственным образовательным стандартом среднего профессионального образования по специальности 31.02.03 «Лабораторная диагностика».
- В книге подробно изложены теоретические и практические основы проведения гематологических исследований, описаны показатели общего анализа крови и дополнительных тестов. Представлены детализированное описание техники окраски мазков крови и методик подсчета форменных элементов, микрофотографии и формулы основных расчетов. Большое внимание уделено лабораторной диагностике гематологических заболеваний, начиная с анемий и заканчивая лейкозами и лимфомами.
- Издание предназначено студентам и преподавателям медицинских колледжей, а также студентам высших медицинских учебных заведений и начинающим специалистам в области клинической лабораторной диагностики и других клинических специальностей.



Учебное издание



Авторы

Г.Н. Зубрихина,  
В.Н. Блиндарь,  
Ю.С. Тимофеев



2020 г., 288 с.



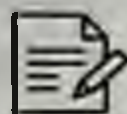
ИЗДАТЕЛЬСКАЯ ГРУППА  
«ГЭОТАР-Медиа»  
geotar.ru

# ТЕОРИЯ И ПРАКТИКА ЛАБОРАТОРНЫХ ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

- Для успешного лечения заболеваний необходимо точно установить клинический диагноз. Цитологическое исследование, основанное на изучении клеток, отличаясь относительной простотой и малой травматичностью, широко используется в диагностике заболеваний и наряду с гистологическим является полноценным методом морфологической верификации диагноза. Важная роль при этом принадлежит специалистам среднего звена. Цель настоящего учебника — изложение основ цитологического исследования медицинским кадрам, обучающимся по специальности 31.02.03 «Лабораторная диагностика» с базовым уровнем подготовки и присвоением квалификации «Медицинский лабораторный техник» и с углубленным уровнем подготовки и присвоением квалификации «Медицинский технолог».
- Учебник поможет овладеть методиками приготовления, фиксации и окрашивания препаратов, а также навыками проведения микроскопического исследования, первичного просмотра цитологических мазков, по которым врач осуществляет дальнейшую дифференциальную диагностику.



Учебное издание



Авторы

И.П. Шабалова,  
Н.Ю. Полонская,  
К.Т. Касоян



2018 г., 176 с.

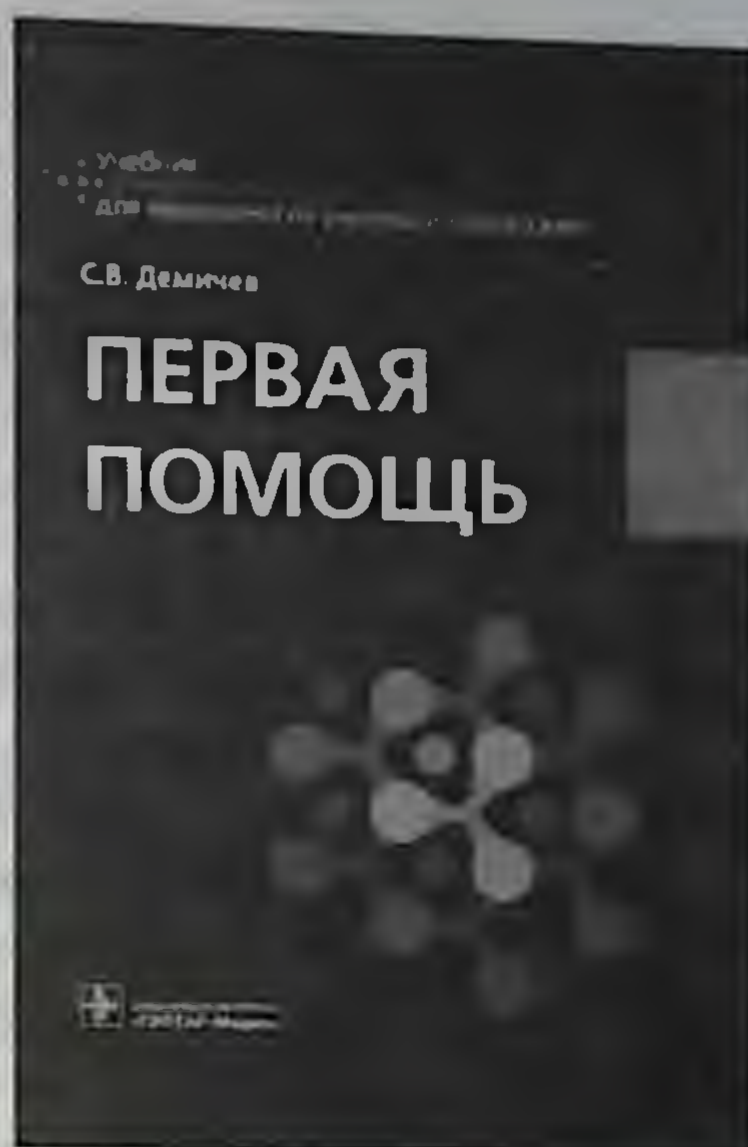


ИЗДАТЕЛЬСКАЯ ГРУППА  
«ГЭОТАР-Медиа»  
geotar.ru

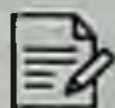


## ПЕРВАЯ ПОМОЩЬ

- Учебник содержит основные сведения по оказанию первой помощи при травмах и заболеваниях в соответствии с программой учебной дисциплины «Первая помощь» для специальностей 31.02.03 «Лабораторная диагностика» и 31.02.05 «Стоматология ортопедическая».
- В материале подчеркивается чрезвычайно важная роль человека, который раньше других оказался около пострадавшего и правильно оказал первую помощь, а также значение соответствующей психологической подготовки обучающихся.
- Автор книги — высококвалифицированный врач с большим клиническим опытом, много лет занимавшийся обучением приемам первой помощи.
- Учебник предоставляет возможность организовывать и проводить занятия по первой помощи для среднего медицинского персонала, он может быть полезен студентам медицинских вузов; практикующим врачам; преподавателям, занятым обучением первой помощи в автошколах, общеобразовательных школах, на производствах, а также широкой аудитории читателей, интересующихся данной проблемой.



Учебное издание



Автор  
С.В. Демичев



2021 г., 192 с.



ИЗДАТЕЛЬСКАЯ ГРУППА  
«ГЭОТАР-Медиа»  
geotar.ru

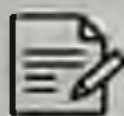
# ЗДОРОВЫЙ ЧЕЛОВЕК И ЕГО ОКРУЖЕНИЕ

5-е издание, исправленное и дополненное

- Учебник состоит из девяти глав, в которых даны современные представления о здоровье человека на протяжении всей его жизни, включая основные виды жизнедеятельности: обучение, трудовую деятельность, рациональное питание детей, гигиенические требования к предметам детского обихода, подходы к организации гигиенического воспитания и формированию здорового образа жизни населения, медицинское и санитарно-эпидемиологическое обеспечение населения.
- Особое внимание уделено влиянию факторов окружающей среды. Показана роль факторов, влияющих на рост и развитие, возникновение заболеваний в процессе жизни человека. В новом издании отражена Европейская стратегия охраны здоровья детей и подростков «Инвестируя в будущее», 2015–2020 гг., представлены гармонизированные европейские и российские подходы к оценке качества медицинской помощи в образовательных организациях и требования к квалификации медицинских работников школ, а также положения ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» (в последней редакции).
- Учебник рекомендован учащимся медицинских училищ и колледжей.

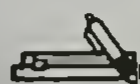


**Учебное издание**



**Авторы**

**В.Р. Кучма,  
О.В. Сивочалова**



**2020 г., 560 с.**



**ИЗДАТЕЛЬСКАЯ ГРУППА  
«ГЭОТАР-Медиа»  
geotar.ru**

# ГДЕ И КАК КУПИТЬ КНИГИ

115035, Москва, ул. Садовническая, д. 11, стр. 12

## Отдел оптовых продаж

Тел.: (495) 921-39-07  
(доб. 109, 112, 192, 143, 152);  
моб.: (916) 876-90-59;  
e-mail: opt@geotar.ru,  
iragor@geotar.ru, sa@geotar.ru

## Отдел розничных продаж и выставок

Тел./факс: (495) 921-39-07  
(доб. 255, 280); моб.: (926) 168-42-16;  
e-mail: bobyleva@medknigaservis.ru,  
gnezdilov@medknigaservis.ru

## Интернет-магазин «Медкнигасервис»

Тел.: 8 (800) 555-99-92;  
www.medknigaservis.ru;  
e-mail: bookpost@medknigaservis.ru;  
доставка по всей России

## Фирменные магазины (Москва)



**М. «ФРУНЗЕНСКАЯ»**,  
Комсомольский пр-т, д. 28, под. 3  
(здание Московского дворца  
молодежи, вход в магазин со стороны  
Комсомольского пр-та).  
Ежедневно с 9 до 20 ч.  
Тел.: (499) 685-12-47;  
моб.: (916) 877-06-84



**М. «НОВОКУЗНЕЦКАЯ»**,  
**«ТРЕТЬЯКОВСКАЯ»**,  
ул. Садовническая, д. 13, стр. 11.  
Ежедневно с 9 до 20 ч.  
Тел.: (495) 921-39-07  
(доб. 602, 603)



**М. «САВЕЛОВСКАЯ»**,  
ул. Сушевский Вал, д. 9, стр. 1  
(вход справа от Мебельного центра).  
Ежедневно с 9 до 20 ч.  
Тел.: (495) 921-39-07 (доб. 729);  
моб.: (985) 387-14-57

**Москва**

Дом книги «Молодая гвардия»:  
ул. Б. Полянка, 28, стр. 1;  
тел.: (495) 780-33-70,  
238-50-01

Торговый дом «Библио-Глобус»:  
ул. Мясницкая, 6/3, стр. 1;  
тел.: (495) 781-19-00;  
факс: (495) 628-87-58

**Смоленск**

СГМУ, магазин «Пульс»:  
ул. Крупской, 28;  
тел.: (4812) 31-09-25

**Рязань**

Супермаркет «Книги»:  
Московское ш., 5А,  
ТД «БАРС-1»;  
тел.: (4912) 93-29-54

**Воронеж**

ИП Собацкий Б.Н.,  
«Медицинская книга»:  
ул. Кольцовская, 6;  
тел.: (4732) 40-59-56

**Краснодар**

ИП Мирзоян А.А.  
(«Медицинская книга»):  
ул. Седина, 6/1;  
тел.: (918) 075-98-86

**ИП Белик Е.Н.:**

ул. Седина, 4;  
тел.: (918) 330-08-73

**Ставрополь**

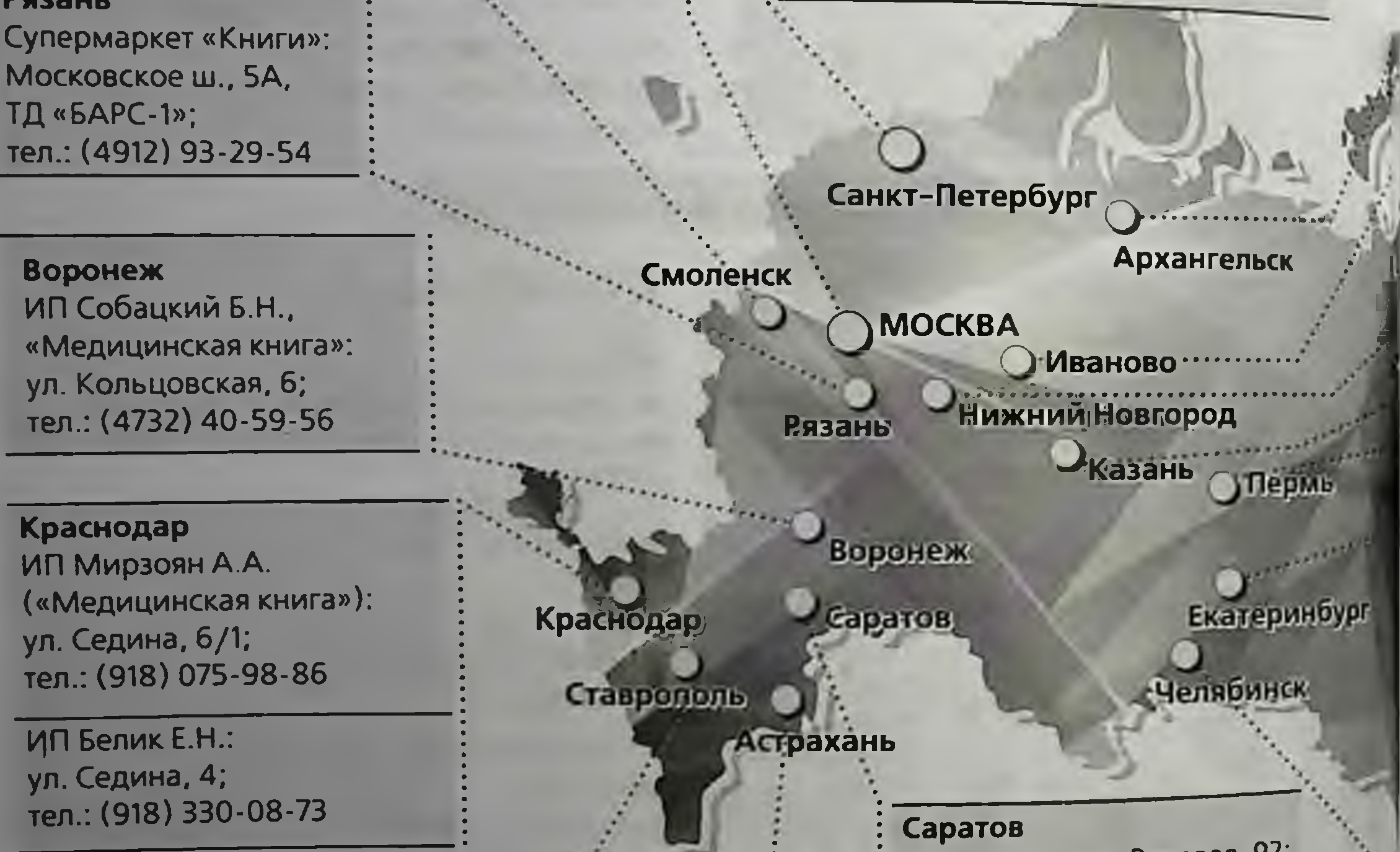
«Мир Знаний»:  
ул. Лермонтова, 191, корп. 43;  
тел.: (8652) 24-28-77;  
e-mail: mz@kavkazinterpress.ru

**Санкт-Петербург**

«Санкт-Петербургский дом книги»:  
Невский пр-т, 28;  
тел.: (812) 318-49-15, 312-01-84

ИП Кузьменок И.В. (медицинская и ве-  
теринарная литература):  
ДК им. Крупской, 2-й этаж,  
место № 54, 80; тел.: (962) 708-77-64  
(место № 54), (911) 24-22-54  
(место № 80);  
<http://krupaspb.ru/uchastniki/>;  
e-mail: personal/medkniga.htm

Магазин «Медицинская  
литература»: ул. Боткинская, 3,  
ТК «ТуКан», 2-й этаж;  
тел.: (812) 642-24-67;  
e-mail: Medbook-spb@bk.ru,  
Medbook.shop



Санкт-Петербург

Архангельск

Смоленск

МОСКВА

Иваново

Рязань

Нижний Новгород

Казань

Пермь

Воронеж

Краснодар

Саратов

Екатеринбург

Ставрополь

Челябинск

Астрахань

**Саратов**

«Стержень»: ул. Валовая, 92;  
тел.: (8452) 23-46-44;  
факс: (8452) 23-56-99

**Астрахань**

«Медицинская книга»:  
ул. Бакинская, 121 / ул. Кирова, 51  
(около Медицинского  
университета);  
тел.: (8512) 60-87-06,  
(917) 170-25-22;  
факс: (8512) 25-87-06

**Книги Издательской группы «ГЭОТАР-Медиа»  
вы можете приобрести у следующих  
региональных представителей:**

**Архангельск**

«АВФ-книга»:  
ул. Ленина, 3;  
тел.: (8182) 65-38-79

**Иваново**

«Новая мысль»:  
пр-т Ленина, 5;  
тел.: (4932) 41-64-16

**Нижний Новгород**

«Дом книги»:  
ул. Советская, 14;  
тел.: (831) 246-22-92,  
246-22-73, 277-52-07;  
e-mail: kniga@kis.ru

**Казань**

Магазин «Медкнига»:  
ул. Бутлерова, 35/15;  
тел.: (843) 238-82-39,  
(962) 557-83-37;  
ул. Бутлерова, 36, КГМА;  
тел.: (952) 038-11-12

**Пермь**

Книжный магазин «Пермкнига»:  
ул. Лодыгина, 6;  
тел.: (342) 278-33-23,  
242-84-90, 242-72-74

**Екатеринбург**

Магазин «Медицинская книга»:  
ул. Волгоградская, 184;  
тел./факс: (343) 338-77-25;  
<http://www.mmbook.ru/>;  
торговый представитель: Тюмень,  
ул. Одесская, 59. Магазин «Милан»,  
отдел «Медкнига»

**Хабаровск**

«Деловая книга»:  
ул. Промышленная, 20Д/1;  
тел.: (4212) 45-06-65,  
46-95-31, 45-06-64

**Новосибирск**

**Челябинск**

ЧП Луговых А.Ю.,  
Южно-Уральский ГМУ  
(главный корпус, 1-й этаж):  
ул. Воровского, 64;  
тел.: (351) 775-77-47,  
(912) 895-26-36

**Иркутск**

**Новосибирск**

«Книги Сибири»:  
ул. Часовая, 6/2;  
тел.: (383) 335-61-63

**Иркутск**

Магазин «Медкнига»:  
ул. К. Либкнехта, 157;  
тел.: (3952) 20-06-68,  
(914) 910-53-48

**Фирменные магазины «Медкнига»  
(Республика Татарстан)**

г. Казань, ул. Бутлерова, д. 35/15.  
Тел.: +7 (843) 238-82-39, +7 (962) 557-83-3;  
e-mail: gafurovan@mail.ru, kazanmedkniga@mail.ru  
Время работы: ежедневно с 8.00 до 19.00.  
г. Казань, ул. Бутлерова, 36, КГМА, 1-й этаж.  
Тел.: +7 (952) 038-11-12  
Время работы: пн.-пт. с 9.00 до 16.30

**РЕАЛИЗАЦИЯ МЕДИЦИНСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ В СНГ  
(ПРЕДСТАВИТЕЛЬСТВА ИЗДАТЕЛЬСТВА,  
ФИЛИАЛЫ, ДИЛЕРЫ, МАГАЗИНЫ)**

**Дистрибьютор в Республике Казахстан  
ТОО «ГЭОТАР-НС»**

Республика Казахстан, 010000, г. Нур-Султан, пр-т Республики, д. 42.  
geotarns@bk.ru  
Тел.: 8 (7172) 20-51-20

**Дилер Издательской группы «ГЭОТАР-Медиа»  
в Республике Беларусь  
ЧПТУП «Дар-Ника»**

Республика Беларусь, 247760, г. Мозырь, ул. Ленинская, д. 9/10.  
Тел.: (37529) 662-46-51, (37529) 730-13-66

**Дилер Издательской группы «ГЭОТАР-Медиа»  
в Республике Беларусь  
ООО «Лебенскрафт»**

Республика Беларусь, 210024, г. Витебск, пр-т Победы, д. 7/1, комн. 112.  
Тел.: (37529) 718-41-51

## **ПРИГЛАШЕНИЕ К СОТРУДНИЧЕСТВУ**

Издательская группа «ГЭОТАР-Медиа» приглашает к сотрудничеству авторов и редакторов медицинской литературы.

**ИЗДАТЕЛЬСТВО СПЕЦИАЛИЗИРУЕТСЯ НА ВЫПУСКЕ**  
учебной литературы для вузов и колледжей, атласов,  
руководств для врачей, переводных изданий.

По вопросам издания рукописей обращайтесь в отдел по работе с авторами  
Тел.: 8 (495) 921-39-07.

*Учебное издание*

**Кишкун Алексей Алексеевич**  
**Беганская Людмила Алексеевна**

### **КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА**

В трех томах

Том 2

2-е издание,  
переработанное и дополненное

Зав. редакцией *А.В. Андреева*  
Зам. главного редактора *О.В. Кириллова*  
Научный редактор издательства *И.В. Кислицына*  
Менеджер проекта *Т.Е. Якобсон*  
Выпускающий редактор *Н.В. Белова*  
Редактор *Е.В. Бухарова*  
Корректоры *Е.В. Маурина, Л.И. Базылевич*  
Компьютерная верстка *О.А. Колесников*  
Дизайн обложки *Н.В. Ионова*  
Верстка обложки *Т.В. Делицина*

Подписано в печать 05.05.2023. Формат 60×90 1/16.  
Бумага офсетная. Печать офсетная. Объем 39 усл. печ. л.  
Тираж 1000 экз. Заказ № 3673/22

ООО Издательская группа «ГЭОТАР-Медиа».  
115035, Москва, ул. Садовническая, д. 11, стр. 12.  
Тел.: 8 (495) 921-39-07.

E-mail: [info@geotar.ru](mailto:info@geotar.ru), <http://www.geotar.ru>.

Отпечатано в ООО «ИПК Парето-Принт».  
170546, Тверская обл., промышленная зона Боровлево-1, комплекс № 3«А».

ISBN 978-5-9704-7342-9



9 785970 473429 >





УЧЕБНИК ДЛЯ МЕДИЦИНСКИХ УЧИЛИЩ И КОЛЛЕДЖЕЙ

Учебник подготовлен в соответствии с государственным образовательным стандартом среднего профессионального образования по специальности Лабораторная диагностика. Основная цель данного учебника — дать будущему специалисту лаборатории системное представление о современной клинической лабораторной диагностике, ее методах, технологиях и их связях с клинической практикой. В доступной форме освещены основы общей патологии, возможности аналитических лабораторных технологии, современных лабораторных методов диагностики заболеваний. Достаточно подробно описаны устройство и принципы работы различных типов автоматических анализаторов. Отдельная глава содержит современные принципы организации деятельности клиничко-диагностической лаборатории лечебно-профилактического учреждения. Особого внимания заслуживает весьма полезный раздел учебника, посвященный основам менеджмента качества лабораторных исследований.

Издание предназначено студентам медицинских колледжей, преподавателям специальности 31.02.03 Лабораторная диагностика, интернам и клиническим ординаторам, обучающимся по специальности Клиническая лабораторная диагностика, а также начинающим врачам и специалистам лаборатории.



ISBN 978-5-9704-7342-9



9 785970 473429 >



[www.geotar.ru](http://www.geotar.ru)

[www.medknigaservis.ru](http://www.medknigaservis.ru)