

А.Н. Арипов, Л.М. Фесенко

КЛИНИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ

МЕТОДЫ

"АБУ АЛИ ибн СИНО"

А. Н. АРИПОВ, Л. М. ФЕСЕНКО

КЛИНИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ

Методы

Ташкент
Издательство медицинской литературы
имени Абу Али ибн Сино
2000

52.5
УДК

Арипов А. Н. — доктор медицинских наук, профессор, зав. биохимической лабораторией НИИ педиатрии МЗ РУз; **Фесенко Л. М.** — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник НИИ педиатрии МЗ РУз.

Рецензенты — заслуженный деятель науки РУз, доктор медицинских наук, профессор НИИП РУз *О. С. Махмудов*; доктор медицинских наук *Р. А. Сабирова*.

Арипов А. Н., Фесенко Л. М.

А 81 Клиническая биохимия: Методы. — Т.: Изд. мед.-лит. им. Абу Али ибн Сино, 2000. — 271 с. — (Библиотека практического врача).

1. Соавт.

Пособие посвящено лабораторному исследованию биологических жидкостей в клинике и содержит сведения о вопросах организации биохимической лаборатории, физиологической роли и диагностическом значении наиболее часто употребляемых в практических лабораториях компонентах биологических жидкостей организма. Рассматриваются особенности обмена веществ и нарушения биохимических показателей организма человека.

Книга предназначена для врачей-лаборантов и врачей других специальностей.

ББК 52.5

ISBN 5-538-01406-3

© Арипов А. Н., Фесенко Л. М.,
2000 г.

ПРЕДИСЛОВИЕ

Основная задача лабораторной службы заключается в максимальном удовлетворении клинических подразделений лечебных учреждений лабораторной информацией. Возрастающая потребность клиницистов в анализах в настоящее время привела к тому, что удельный вес лабораторных анализов в общей структуре диагностических процедур в крупной многопрофильной больнице достигает 90%, причем число исследований увеличивается с каждым днем. Лабораторная диагностика, непрерывно совершенствуясь, направлена на увеличение знаний врача о состоянии больного, о глубине поражения клеток, органов и систем, о причинах и характере патологического процесса и основывается на комплексе клинико-биохимических, иммунологических и инструментальных данных. Развитие химии, физики и техники в последние годы создало условия для интенсивной разработки многих новых лабораторных методов. Накоплено немало наблюдений относительно характера и величины отклонений лабораторных показателей от нормы при различных формах патологии, как врожденной, так и приобретенной. Ускорение диагностики, приближение сроков начала лечения, оценка эффективности лечебных мероприятий с помощью лабораторных средств вносят существенный вклад в рационализацию клинической диагностики и лечения. Общее число лабораторных исследований сегодня достигает 400 показателей.

Вместе с тем становится все более очевидным, что назначение врачом лабораторных исследований должно быть хорошо обоснованным, т.к. многие виды исследований являются трудоемкими и дорогостоящими. Кроме того, выполнение необоснованных анализов затягивает диагностический процесс, снижает эффективность работы лечебно-профилактического учреждения.

Клиническая биохимия опирается на значительную теоретическую базу и тесно связана с такими науками, как общая биохимия, патологическая физиология, патологическая анатомия, фармакология и пропедевтика внутрен-

них болезней. Это определяет специфическую методологию науки и формирует определенные требования к специалисту, работающему в области клинической биохимии. Прежде всего, здесь подразумевается обязательное знание теоретических и практических основ аналитической химии, работы с измерительными приборами, анатомо-физиологических норм человека, без чего невозможна правильная оценка отклонений от них и, наконец, самое важное — врач-биохимик должен уметь клинически мыслить и правильно интерпретировать полученные результаты исследования. Все это, в конечном итоге, позволяет на должном профессиональном уровне обследовать больного.

В связи с вышесказанным, назрела потребность в систематизированной информации о возможностях лабораторной диагностики в медицине. В нашей республике осуществляется комплекс мероприятий по совершенствованию работы клинических лабораторий. Среди них издание справочников, методических руководств, которые могут быть полезны врачам лабораторной службы и клинических подразделений. Данное пособие вышло в рамках данной программы и, надеемся, станет помощником в деятельности лабораторий. В нем предпринята попытка изложить материал по клинической биохимии в плане методического и учебного руководства для специалистов клинико-диагностических лабораторий.

Согласно поставленной задаче пособие поделено на две части: общую и специальную. В общей части рассматриваются вопросы организации биохимической лаборатории, техники забора биологического материала и выполнения биохимического анализа. Так как знание основ работы с реактивами, умение правильно приготовить растворы необходимой концентрации является неотъемлемой частью работы клинической лаборатории любого уровня, отдельная глава посвящена растворам, с подробным изложением правил их приготовления. Изложены основы санитарного режима и техники безопасности в диагностических лабораториях.

В специальной части рассмотрены узловые теоретические положения обмена веществ в норме и при патологии, необходимые для осмысленного проведения клинического биохимического анализа и грамотной интерпретации результатов исследования. Приведены методы изучения основных звеньев процесса обмена веществ, главным образом, унифицированные, из числа наиболее оправдавших себя в клинической практике и реально доступные к вы-

полнению в клинических лабораториях. В подавляющем большинстве предложенных методов, если это было возможно, "ход определения" представлен в виде схем, что на наш взгляд значительно облегчает восприятие методики.

Размерность единиц обозначения результатов исследования выдержана в строгом соответствии с Международной системой единиц (СИ).

Особое значение в предлагаемом издании уделяется широкому клиническому толкованию лабораторных тестов с углубленным патогенетическим их обоснованием.

В пособие включена глава, посвященная системе гемостаза, поскольку данные исследования, как правило, выполняются в биохимических лабораториях. В главе рассматриваются наиболее общие вопросы современных теорий гемостаза и методы исследования, доступные к исполнению в любых неспециализированных лабораториях.

Несомненно, широкий охват функциональных характеристик человека чрезвычайно сложен. Поэтому авторы с признательностью примут замечания по структуре справочника и содержанию отдельных глав.

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СОКРАЩЕНИЙ И СИМВОЛОВ

АЛТ	— аланин-аминотрансфераза
АСТ	— аспартат-аминотрансфераза
ВОЗ	— Всемирная организация здравоохранения
ГТТ	— глюкозотолерантный тест
ГФДГ	— глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа
НЬ	— гемоглобин
ДНК	— дезоксирибонуклеиновая кислота
ИБС	— ишемическая болезнь сердца
ИФА	— иммуноферментный анализ
КЩС	— кислотно-щелочное состояние
КК	— креатинкиназа
КК-МВ	— сердечный изофермент креатинкиназы
ЛДГ	— лактатдегидрогеназа
ЛП	— липопротеины
ЛПВП	— липопротеины высокой плотности
ЛПНП	— липопротеины низкой плотности
МДА	— малоновый диальдегид
ПОЛ	— перекисное окисление липидов
РИА	— радиоиммуноанализ
РНК	— рибонуклеиновая кислота
СЖК	— свободные жирные кислоты
СРБ	— С-реактивный белок
СМП	— среднемолекулярные пептиды
ТГ	— триглицериды
ХЛ	— холестерин
ц.АМФ	— циклический 3,5-аденозинмонофосфат
ЦНС	— центральная нервная система
ЩФ	— щелочная фосфатаза
НВsAg	— поверхностный антиген вируса гепатита В
Анти-НВs	— антитела к поверхностному антигену вируса гепатита В
Анти-НВс	— антитела к сердцевинному антигену вируса гепатита В
Анти-НВе	— антитела к антигену инфекционности вируса гепатита В
НВеAg	— антиген инфекционности вируса гепатита В
Ig A	— иммуноглобулин А
Ig M	— иммуноглобулин М
pO ₂	— напряжение кислорода в биологических жидкостях
PCO ₂	— напряжение углекислого газа в биологических жидкостях больше меньше увеличение уменьшение

Глава 1

ОРГАНИЗАЦИЯ БИОХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ И ТЕХНИКА ВЫПОЛНЕНИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Клинико-диагностические лаборатории оборудуются по возможности в просторных и светлых помещениях. Рабочие места обеспечиваются хорошим освещением. Обязательны водопровод, канализация, подводка газа, проточно-вытяжная вентиляция. Подготовку материала для исследования проводят в отдельных комнатах. Полы в лаборатории лучше настилать легко моющимися материалами. Лабораторные столы должны иметь химически стойкую поверхность (линолеум, пластик). Во время проведения ряда анализов выделяются газообразные и парообразные вещества, требующие удаления. Для этого необходимо установить вытяжные шкафы с местной вытяжной вентиляцией. В вытяжном шкафу предусматривается подводка электричества, водопровода и газа. Рабочая поверхность вытяжного шкафа должна иметь химически стойкое и термостойкое покрытие.

МАТЕРИАЛ ДЛЯ КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Материалом для клинико-лабораторных исследований могут служить следующие биологические жидкости: кровь и ее компоненты (плазма, эритроциты), моча, кал, желудочный, панкреатический соки, желчь, ликвор, сперма, пот, выпотные жидкости (экссудаты, трансудаты), конденсат выдыхаемой влаги, а также ткань паренхиматозных органов, получаемая способом биопсии. Но чаще исследуется кровь и преимущественно ее жидкая часть — сыворотка и плазма. Получают сыворотку из венозной крови.

Материал для исследований надо доставлять в лабораторию в предельно короткие сроки с сопроводительным бланком, в котором указываются фамилия, имя, отчество больного, характер материала и дата его взятия, перечень необходимых лабораторных исследований, отделение, предполагаемый диагноз. Хранение сыворотки на сгустке недопустимо, т.к. с течением времени происходит пере-

распределение внутри- и внеклеточных компонентов, что значительно изменяет их концентрацию в сыворотке и, как правило, приводит к гемолизу эритроцитов.

Кровь рекомендуют брать у больных натощак (спустя 12 ч после приема пищи), обычно утром (между 7 и 9 ч), желательна до физической нагрузки и проведения диагностических процедур.

При исследовании крови, полученной не натощак, а также при некоторых типах дислиппротеинемий возможен выход липемической сыворотки. В такой сыворотке нельзя определять ряд биохимических показателей (креатинин, общий белок, триглицериды и др.).

При взятии крови путем венепункции время сдавливания сосудов жгутом должно быть минимальным. Больной не должен сжимать и разжимать пальцы руки, поскольку это вызывает местный стаз и гипоксию, а также сдвиги в распределении некоторых веществ (холестерина, калия, натрия, кальция и др.) между форменными элементами крови и ее жидкой частью.

На концентрацию ряда компонентов плазмы, в частности общего белка, альбумина, креатинина, холестерина, кальция, щелочной фосфатазы и ряда других показателей влияет положение тела пациента. Установлено, что концентрация всех перечисленных метаболитов значительно повышается, если больной находится в вертикальном положении, и уменьшается — в горизонтальном. В положении лежа или сидя больной должен находиться не менее 30 минут до взятия крови.

Во избежание гемолиза кровь следует брать сухим шприцом, сухой иглой (одноразового пользования), в сухую пробирку, в стерильных условиях при комнатной температуре. Гемолиз эритроцитов возможен в условиях венозного застоя, энергичной аспирации крови шприцом, при длительном хранении цельной крови, действии воды и детергентов, высокой и низкой температуры, высокоскоростного центрифугирования. Для предотвращения вспенивания взятую кровь переносят из шприца в пробирку медленно. Психогенный фактор (волнение, страх, стрессовые ситуации) перед манипуляцией взятия крови, может вызвать у больного снижение уровня калия в крови. При исследовании системы гемостаза к взятию крови предъявляют ряд дополнительных требований. В этом случае используют иглу с широким просветом, лучше без шприца (шприц применяют при взятии крови у детей, а также у больных с явлениями гипотонии, находящихся в

терминальном состоянии). Кровь собирают в градуированные центрифужные пробирки, содержащие антикоагулянт-стабилизатор, связывающий ионизированный кальций (3,8%-ный раствор цитрата натрия, 1,34%-ный раствор оксалата натрия). Для получения правильных результатов необходимо строго соблюдать соотношения объемов крови и стабилизатора 1:9. Не рекомендуется брать кровь через катетер, так как его периодически промывают гепарином и в его изгибах происходит травматизация форменных элементов крови. Кожу над местом прокола (обычно в локтевом сгибе) обрабатывают спиртом. Поскольку, в процессе введения иглы в просвет сосуда из проколотой кожи, подкожной клетчатки, сосудистой стенки в иглу перемешаются тканевая жидкость и фрагменты тканей, которые в дальнейшем могут существенно повлиять на коагулологические тесты, первые 0,5—1 мл (особенно выступившие первые 5—6 капель) вытекающей крови нельзя использовать для коагулограммы. Однако, эту порцию крови можно использовать для всех других биохимических исследований. Чтобы исключить влияние на коагуляцию последствий венозного застоя, желателен брать кровь без наложения жгута или во время вытекания крови на 2—3 секунды расслабить жгут. Кровь должна стекать по стенке пробирки до метки. Пробирку закрывают пробкой и плавными движениями несколько раз переворачивают для перемешивания крови с антикоагулянтом (не встряхивать! не вспенивать!). Время между взятием крови и ее обработкой не должно превышать 30—40 мин.

При изучении системы гемостаза кровь обычно стабилизируют раствором лимоннокислого натрия, поскольку в цитратной крови (плазме) лучше сохраняются лабильные факторы свертывания и тромбоциты. Основные сведения о наиболее часто применяемых антикоагулянтах приведены в табл. 1.1.

Таблица 1.1

<i>Антикоагулянт</i>	<i>Показатели, определению которых мешает используемый антикоагулянт</i>
Гепарин	
Гепаринат аммония	Аммиак, щелочная фосфатаза
Гепаринат натрия, калия	Электролиты (K, Na)
ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота)	Электролиты (K, Na, Ca), остаточный азот
Цитрат натрия	α -амилаза, липопротеиды
Оксалат аммония	аммиак, α -амилаза, ЩФ, рН крови, Ca

Для получения сыворотки антикоагулянт не добавляют.

Доставленные в лабораторию пробирки закрывают ватной пробкой и помещают на 10—15 мин в термостат для прогревания при температуре 37° С. Затем осторожно проводят проволокой или стеклянной палочкой по внутренним стенкам пробирки, чтобы ускорить отделение сыворотки. Считается, что объем выделяемой сыворотки составляет примерно 1/3 от взятого объема крови (при некоторых патологических состояниях сыворотки получается намного меньше). После свертывания крови сгусток отделяют от стенок пробирки тонким запаянным капилляром и центрифугируют при 2000 об/мин в течение 15 мин. Полученную сыворотку отсасывают пастеровской пипеткой и переносят в другие чистые пробирки.

Сыворотку желательно использовать в день взятия крови. Если же исследование откладывают до следующего дня, пробирку с сывороткой закрывают пробкой и помещают в холодильник (температура 4° С).

Для проведения исследования микрометодом, кровь берут из пальца, заполняя ею специальные пробирки, поднесенные к месту прокола. Капиллярную кровь получают путем прокола мякоти IV пальца кисти левой руки. У лиц с загрубелой или уплотненной кожей кровь можно получить из мочки уха, а у новорожденных — из пятки или большого пальца ноги.

Место прокола предварительно протирают ватным тампоном, смоченным этиловым спиртом. Перед проколом кожа должна высохнуть, чтобы кровь не растекалась по пальцу. Можно обработать кожу вторым тампоном, смоченным эфиром или протереть обработанный спиртом палец сухим стерильным ватным тампоном. Перед тем, как произвести прокол, легким давлением двумя пальцами левой руки лаборант делает более упругой мякоть подготовленного пальца. Рука больного находится на столе. Укол целесообразно производить чуть сбоку от средней линии, где более развита капиллярная сеть. Глубина укола — 2—3 мм и варьирует в зависимости от толщины кожи. Важно, чтобы рассечение кожи проходило поперек кожных линий.

Первую каплю крови нужно удалить сухим стерильным ватным тампоном, так как она содержит клеточные элементы кожи и тканевую жидкость. Выступающие капли крови должны иметь куполообразную форму, что удобно при всасывании в капилляры. Вначале берут кровь для определения содержания гемоглобина, подсчета эритроцитов и лейкоцитов, приготовления мазков, а в последу-

юшем — для других целей. После окончания забора крови ранку обрабатывают йодом, накладывают тампон из стерильной ваты, прижимают его пальцем к ладони.

Биохимические исследования выполняются как в плазме, так и в сыворотке крови. Основным биологическим материалом для исследования активности ферментов и метаболитов является сыворотка крови. Необходимо отметить, что вследствие выделения в процессе свертывания крови и ретракции сгустка, содержащихся в тромбоцитах биологически активных веществ, которые могут влиять на ферменты, в большинстве случаев активность ферментов сыворотки превышает таковую в плазме крови. Более того, при лизисе сосредоточенных в сгустке эритроцитов, находящиеся в них ферменты переходят в сыворотку крови. Этим объясняется, в частности, более высокая активность ферментов (лактатдегидрогеназы, аланин- и аспартатами-нотрансфераз, фруктозо-дифосфата альдолазы, кислой фосфатазы, аргиназы, фосфогексоизомеразы и других энзимов, содержащихся в значительных количествах в тромбоцитах и в эритроцитах и освобождающихся из них при свертывании крови) в сыворотке, чем в плазме крови. Поэтому для оценки активности перечисленных ферментов рекомендуется пользоваться плазмой.

Для определения содержания лабильных соединений, либо активности ряда ферментов (например, кислой фосфатазы) нужно пользоваться свежей или лиофилизированной сывороткой. Сыворотку, хранившуюся при 0—4°C, применять для этих целей нельзя.

При необходимости определения фотолабильных веществ (желчные пигменты, порфирины, витамин В₁₂, креатинфосфокиназа, некоторые метаболиты аминокислот), биологический материал следует направлять в лабораторию как можно быстрее и в затемненной посуде.

Содержание электролитов также рекомендуется определять в плазме крови. Поскольку концентрация ионов калия в эритроцитах намного превышает таковую в плазме крови, они способны выходить из эритроцитов даже через неповрежденную оболочку (чему способствуют нарушения в ней метаболических процессов, в частности АТФазной активности, функционирования К-Na — насоса). Исходя из этого, определять уровень калия в плазме следует не позже 3/4—1ч после взятия крови.

Если для исследования нужны и **форменные элементы** крови и плазма (как, например, при определении активности ацетилхолинэстеразы эритроцитов и холинэстеразы плазмы), то

при взятии крови следует предупредить ее свертывание. Пробирки, предназначенные для взятия и хранения крови, предварительно обрабатывают раствором лимоннокислого и щавелевокислого натрия, высушивают и набирают в них кровь. Затем кровь центрифугируют в течение 5 мин на центрифуге типа ОПН-3 при 3000 об/мин. После этого плазму отделяют. Эритроциты отмывают от плазмы охлажденным изотоническим раствором натрия хлорида и вновь несколько раз центрифугируют, каждый раз удаляя центрифугат.

Гемолизированные сыворотку и плазму не рекомендуется использовать для анализа, за исключением редких случаев. Так, гемолизаты цельной крови можно использовать при определении активности фруктозомонофосфатальдозазы, глюкозы и в некоторых других тестах.

Обычно сыворотку крови хранят в холодильнике при 0—4°C. Допускается хранение сыворотки в течение месяца и больше при однократном ее замораживании и оттаивании. Вместе с тем известно, что активность щелочной фосфатазы более стабильна (на протяжении нескольких суток) при комнатной температуре. В случае хранения сыворотки при пониженной температуре (0—4°C) через 12—24 часа активность этого фермента повышается.

Если же данные об устойчивости соединений (т.е. об изменении активности фермента) в сыворотке (плазме) крови при хранении отсутствуют, рекомендуется проводить анализ тотчас после взятия крови.

Исследуемый материал, как правило, сохраняют до окончания всех анализов, что позволяет повторить тот или иной из них в случае необходимости.

При хранении мочи надо помнить, что присутствующие в ней бактерии способны влиять на содержащиеся в ней химические соединения. Чтобы предотвратить развитие микрофлоры в моче, в наибольшей мере сказывающейся на результатах бактериологического исследования, анализ мочи рекомендуют производить в сроки от 30 мин до 1,5 ч после выделения. Если это невозможно, мочу следует подкислить и хранить в холодильнике при 4°C (что позволяет отложить исследование на 6 ч после сбора). Для подкисления используют борную кислоту из расчета 1,8 г на 100 мл мочи. Допускается применение других консервантов, правда, многие консерванты затрудняют химическое исследование мочи.

Выпотные жидкости собирают в сухую чистую колбу, содержащую в качестве антикоагулянта гепарин или лимоннокислый натрий.

Спинномозговая жидкость хранению не подлежит, должна исследоваться сразу же после взятия.

Биологический материал от больного необходимо доставлять в лабораторию с правильно оформленным направлением. В направлении должны быть указаны фамилия, имя, отчество, возраст, пол больного, номер истории болезни, либо амбулаторной карты, предполагаемый диагноз, дата взятия материала и название вида заказываемого исследования.

АВТОМАТИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ

Лабораторное отделение наиболее напряженное в информационном отношении подразделение современного медицинского учреждения. Расширяющийся ассортимент и объем лабораторных показателей приводит к необходимости совершенствования деятельности лаборатории как в структурно-организационном отношении, так и в направлении повышения её производительности, качества и надежности исследований. Решение такой задачи может достигаться различными методическими, организационными и техническими средствами, одним из которых является автоматизация и комплексная механизация лабораторного процесса путем внедрения приборов-автоматов, специализированных систем анализа, компьютерной техники и создаваемых на их базе автоматизированных лабораторных систем.

Можно выделить два основных направления компьютеризации лаборатории. Первое предусматривает использование компьютеров для автоматизации информационных и технологических процессов внутри лабораторий, внедрение автоматизированных информационных и информационно-технологических лабораторных систем. В функции подобных систем входит:

- регистрация биологического материала, распределение заказов по участкам лаборатории, регистрация и оформление результатов исследований, оперативный и ретроспективный анализ деятельности лаборатории;
- автоматизация выполнения исследований, включая ввод и обработку данных с анализаторов, управление процессом и проверку функционирования автоматов;
- контроль качества лабораторных исследований, выявление и исправление ошибок по источникам их возникновения, оценка точности и правильности аналитических результатов, их статистическая обработка;
- учет поступления и использования химреактивов, оборудования и принадлежностей к нему.

● Целью создания подобных систем является повышение производительности труда и качества исследований, контроль за использованием расходных материалов, сокращение рутинных трудозатрат персонала лаборатории.

Второе направление использования компьютеров в деятельности лабораторной службы связано с решением проблем взаимодействия лабораторий с клиническими отделениями стационара (поликлиники) на базе автоматизированной информационной системы лечебного учреждения. Это направление включает автоматизацию процессов оформления назначений на лабораторные исследования и передачи результатов в клинические отделения, внедрение консультирующих систем для лечащих врачей по вопросам лабораторной диагностики. В рамках этого направления решаются следующие задачи:

● заказ лабораторных исследований с терминалов в клинических отделениях, выдача результатов исследований на эти терминалы;

● создание банка данных с результатами лабораторных исследований, доступного лечащим врачам для оперативного использования;

● автоматизированная поддержка врачебных решений: предоставления программ обследования пациентов, схем лабораторных назначений, методических указаний по интерпретации результатов исследований.

Работы этого назначения адресованы в первую очередь лечащим врачам. Их целью является сокращение количества необоснованных анализов, более полная и правильная интерпретация результатов.

Использование архива позволяет врачу по компьютерной сети получить все необходимые данные о пациенте и контролировать динамику состояния пациента в процессе лечения. Перспективным направлением в компьютеризации биохимических технологий является составление консультирующих программ для лечащих врачей по вопросам лабораторной диагностики.

ПРАВИЛА СОБЛЮДЕНИЯ САНЭПИДРЕЖИМА

Все инфекционные заболевания могут передаваться через кровь и другие биологические жидкости.

Основное правило соблюдения безопасности в лаборатории : *Относитесь ко всем образцам как к содержащим потенциальные инфекционные патогены!*

Большой процент заражения гепатитами среди медицинского персонала отмечен при случайных уколах иглой. Это происходит во время проведения инъекций, забора крови, одевания колпачка на иглу после использования шприца, во время уничтожения игл и уборки мусора, содержащего использованные иглы без колпачков.

● Все манипуляции с больными и материалами, полученными от них, должны выполняться лаборантом в резиновых перчатках с целью предохранения от возможного инфицирования. В исключительных случаях допускается использование резиновых напальчников. После каждого больного перчатки протирают ватным тампоном, смоченным дезраствором, лучше если это 4-% раствор перекиси водорода с 0,5% моющим средством. При попадании материала от больного на кожу, пораженный участок обрабатывается этим же раствором, либо 70° этиловым спиртом. Последнее средство предпочтительнее, так как является губительным и для вируса иммунодефицита. Причем, следует пользоваться именно 70° этиловым спиртом, так как он проникает вглубь пор кожи, обеспечивая более полную дезинфекцию, тогда как 96° этиловый спирт дубит кожу, закрывая верхнюю часть кожных пор, а внутрь пор не попадает.

● Работая с пипетками, ни в коем случае нельзя насыщать материал ртом, для этих целей должны применяться специально приспособленные резиновые груши.

● Взятие капиллярной крови из пальца у больного необходимо выполнять только стерильным инструментарием. Рационально готовить накануне и стерилизовать в сухожаровом шкафу (температура 180° С, экспозиция — 1 час) индивидуальные наборы, состоящие из одноразового копья-скарификатора, капилляра, обычно, из аппарата Панченкова и ватного тампона. Повторное использование капилляра для других больных без предварительной дезинфекции и стерилизации его — недопустимо! Стерильный ватный тампон берут стерильным пинцетом, смачивают 70° этиловым спиртом и обрабатывают участок кожи подушечки пальца. После укола скарификатором снимают первую каплю крови также стерильным сухим ватным тампоном и набирают стерильным капилляром необходимое количество крови. Кровь переносят на часовое стекло или же, что еще лучше при массовых исследованиях, в крупноячеистые иммунологические планшеты. Можно использовать для этих целей нижнюю часть от полиэтиленовых лабораторных штативов с уг-

лублиями, откуда кровь дозируют в необходимых объемах и в соответствующие реактивы обычными микропипетками. Отработанные скарификаторы, капилляры и ватные тампоны собирают в отдельные емкости, специально для этого предназначенные. Все емкости должны быть маркированы. В дальнейшем, уже в лаборатории, отработанные инструментарий и остатки материала от больных подвергаются дезинфекции.

● Нельзя пользоваться стеклянной посудой с отломленными краями. Пробирки с отбитыми краями подлежат утилизации или должны пройти обработку жаром.

● *Все служащие медицинских учреждений, имеющие контакт с кровью или другими биологическими жидкостями, должны быть вакцинированы против гепатита В.*

● Организация рабочих мест в лаборатории должна быть обеспечена так, чтобы снизить количество ненужных перемещений образцов. Перенос образцов от места забора до лаборатории осуществлять в соответствующих коробках или лотках для переноса образцов.

● Рабочее место для проведения исследования должно содержаться в порядке. На столе не должно быть ненужных предметов, высокие пробирки, во избежание опрокидывания, располагаются дальше от рук, дезинфекционные контейнеры помещаются ближе к месту проведения анализа.

● В каждой лаборатории необходимо иметь лабораторное руководство по безопасности работ, доступное для всех членов коллектива. Заведующий или лицо, ответственное за выполнение мер техники безопасности, должны регулярно проводить занятия по инструкции безопасности, о мерах при экстренных случаях и оказанию первой помощи в экстремальных ситуациях.

● Следует помнить, что ВГВ сохраняет инфекционные свойства на поверхности предметов в течение, по крайней мере, одной недели.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ЛИЧНОЙ ГИГИЕНЕ. Сотрудниками лаборатории неукоснительно должны соблюдаться следующие правила:

1. После работы с биологическим материалом и химическими реактивами необходимо тщательное мытье рук!

2. При наличии на руках порезов и других ранок на пораженное место накладывается повязка!

3. В комнате, где проводятся исследования запрещается прием пищи, нанесение макияжа и других, не связанных с рабочим процессом, процедур.

4. В холодильнике, предназначенном для хранения химикатов и образцов для исследования, категорически запрещается хранить пищевые продукты!

5. Во время работы запрещается ношение ювелирных изделий (кольца).

Организация хранения реактивов: 1. Все реактивы в лаборатории должны иметь надписи, соответствующие данному реагенту. 2. Токсичные реактивы должны быть маркированы надписями: «ОПАСНО»; «ТОКСИЧНО»; «ОГНЕОПАСНО»; «ЯД». 3. Реактивы должны располагаться так, чтобы к ним был легкий доступ. 4. Опасные реактивы должны располагаться на нижних полках — безопасность важнее, чем хранение в алфавитном порядке.

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

При работе в клинично-диагностической лаборатории должны соблюдаться меры предосторожности, пренебрежение которыми может быть опасно для работающих. Эти меры обязательны при работе с ядовитыми, огнеопасными и взрывчатыми веществами, с веществами, вызывающими химические ожоги.

При отмеривании пипеткой концентрированных и мало разведенных кислот (азотной, серной, соляной, уксусной) и некоторых ядовитых или вредных веществ нельзя их насаживать ртом, а следует применять пипетку с резиновым баллоном или пользоваться цилиндром. Это же относится к работе с хромовой смесью.

Работу с веществами, выделяющими вредные газы или испарения, проводят в вытяжных шкафах (азотная, соляная, уксусная и другие вещества). При работе с пылевидными препаратами применяют марлевые респираторы и защитные очки.

В связи с возрастающим количеством приборов, имеющих электропитание от сети в 220В, в лаборатории должен быть оборудован контур заземления. Этим достигается не только безопасность пользования, но и устраняются помехи, влияющие на точность измерительных приборов. В последние годы для обеспечения электробезопасности, сетевые провода снабжаются специальными вилками и розетками, в которых имеется дополнительный контакт заземления. Для них не требуется дополнительный контур заземления.

Исследуемый лаборантами материал может быть разным, что требует осторожности и постоянного внимания. После работы с таким материалом его следует тотчас обеззаразить, как и бывшую в употреблении посуду, с помощью химических и термических средств.

В таблице 1.2 приводятся основные сведения о токсичности, огнеопасности и взрывоопасности наиболее употребительных химических веществ, правилах их хранения, а также правила оказания первой помощи при отравлениях и ожогах.

Таблица 1.2

Токсичные и огнеопасные вещества

Название	Действие на организм	Огнеопасность	Хранение
КИСЛОТЫ			
Азотная	Раздражает дыхательные пути выделяющейся двуокисью азота. Вызывает ожоги кожи. Пары раздражают дыхательные пути и глаза	Вызывает воспламенение горючих веществ. Взрывается с восстановителями. При тушении пожара необходимо пользоваться противогазом. При контакте с горючими материалами вызывает воспламенение.	Хранить в стеклянных бутылках. Не допускать соприкосновения с горючими материалами, порошками металлов, солями пикриновой и хлорноватистой кислот
Серная	Дает тяжелые ожоги кожи. Действует на кожу и слизистые оболочки, особенно глаз	Не огнеопасна. При контакте с водой может воспламенить горючие материалы. Тушить песком, золой	Хранить в стеклянных бутылках в помещениях при температуре выше 16°C
Соляная	—	Не огнеопасна. Окислитель. Взрывается в смеси с концентрированной серной кислотой и горючими веществами	—
Фосфорная	—	При контакте с горючими веществами может вызвать их воспламенение	—
ОСНОВАНИЯ			
Калия, гидрат окиси (едкое кали)	Опасно вдыхание пыли	В обычной концентрации не горюч	
Кальция, окись (негашенная известь)	Вызывает раздражение и ожоги кожи	Горюч. Пары образуют с воздухом взрывчатые смеси. Тушить водой или углекислым газом	

Следует помнить, что работа в химической лаборатории безопасна при соблюдении техники безопасности: почти все случаи травматизма происходят вследствие нарушения правил работы или требований техники безопасности.

ПЕРВАЯ ПОМОЩЬ ПРИ ОТРАВЛЕНИЯХ И ОЖОГАХ

Оказывая первую помощь при попадании кислоты либо щелочи на кожу и, тем более, в глаза, необходимо строго помнить, что никаких реакций нейтрализации на пораженном участке тела проводить **нельзя!** Любая реакция нейтрализации (на кислоту — слабый раствор щелочи, а на щелочь — раствор слабой кислоты) протекает с выделением тепла и к химическому ожогу может быть добавлен ожог термический! Обычно достаточным и самым радикальным средством является немедленное промывание большим количеством воды пострадавшего участка тела.

<p>Ожоги Огнем, паром, горячими предметами: а) первой степени (краснота) б) второй степени (пузыри) в) третьей степени (разрушение тканей)</p>	<p>Наложить вату, смоченную этиловым спиртом Повторять смачивание То же, обрабатывать 3—5%-ным раствором марганцовокислого калия или 5%-ным раствором танина Покрывать рану стерильной повязкой и вызвать врача</p>
<p>Отравления Алкалоиды группы морфина</p>	<p>Дать пострадавшему 0,5 г камфоры или 30 капель кордиаминна. Полезны крепкий чай и кофе. Искусственное дыхание и вдыхание кислорода и его смеси с 6% углекислоты</p>
<p>Альдегиды</p>	<p>Дать пострадавшему внутрь 150—200 мл 0,2%-ного водного раствора аммиака и затем молоко Дать большое количество воды с добавлением уксуса или лимонного сока, вызвать рвоту. Давать растительное масло, молоко или яичный белок.</p>
<p>Аммиак</p>	<p>При вдыхании аммиака вывести пострадавшего на свежий воздух и предоставить ему покой Вызвать рвоту, дать пить 1%-ный раствор гипосульфита натрия, крахмальный клейстер, молоко.</p>
<p>Йод</p>	<p>Полоскать рот водой или 5%-ным раствором бикарбоната натрия. Пить молоко, суспензию окиси магния (10 г) в воде (150 мл³), известковую воду, растительное масло, жидкое мучное тесто</p>
<p>Кислоты</p>	<p>Промывание желудка раствором марганцовокислого натрия (1:1000). Давать пострадавшему 1%-ный раствор этой же соли по столовой ложке каждые 5 мин или жженую магнезито (30,0), белковую воду, солевое слабительное</p>
<p>Медь и ее соли</p>	<p>Промывание желудка. Касторовое масло. Внутрь — слизистые отвары, танин, уголь. Полоскать рот хлоратом калия</p>
<p>Перманганат калия</p>	<p>Дать три сырых яйца с молоком (около 1 л). Вызвать рвоту</p>

При промывании глаз воду лучше направлять струей. Для этой цели в аптечке необходимо иметь большую резиновую грушу, либо шприц Жанне. После промывания в конъюнктивальный мешок глаза закапывают 2 капли 30%-ного раствора сульфацила натрия, можно заложить за веко любую глазную мазь. На кожу после промывания, если это необходимо, накладывается жировая повязка.

ДОЛЖНОСТНЫЕ ОБЯЗАННОСТИ СПЕЦИАЛИСТОВ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ

ОБЯЗАННОСТИ ЗАВЕДУЮЩЕГО КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИЕЙ:

1. Обеспечивает своевременное и качественное проведение клинических лабораторных исследований, непосредственно выполняет часть исследований.

2. Составляет должностные инструкции для сотрудников лаборатории на основе утвержденных положений.

3. Распределяет работу между сотрудниками.

4. Осуществляет контроль за работой сотрудников лаборатории, в том числе за качеством проводимых исследований путем проведения внутрилабораторного контроля качества в КДЛ.

5. Руководит внедрением новых методов.

6. Отвечает за работу руководимого им персонала.

7. Организует и проводит мероприятия по повышению квалификации персонала лаборатории на рабочем месте и в учреждениях послевузовского и профессионального образования.

8. Консультирует врачей других специальностей по вопросам лабораторной диагностики заболеваний.

9. Представляет администрации заявку на приобретение оборудования, реактивов и расходных материалов, необходимых для качественной работы.

10. Организует рациональное и эффективное использование лабораторной техники и реактивов.

11. Обеспечивает проведение метрологической поверки оборудования.

12. Контролирует учет материальных ценностей, их расход и списание.

13. Организует составление рекомендаций для персонала ЛПУ по правильности сбора, доставки и хранения биологического материала.

14. Осуществляет связь с лечебными отделениями ЛПУ по обеспечению своевременной доставки исследуемого материала в КДЛ и получения результатов лечащими врачами.

15. Отвечает за санитарное состояние лаборатории и выполнение персоналом требований санэпидрежима при работе с кровью и другими биологическими материалами.

16. Обеспечивает условия по охране и технике безопасности сотрудников, контролирует соблюдение правил техники безопасности.

17. Проводит систематический анализ показателей деятельности лаборатории, готовит и представляет в установленные сроки отчеты о работе, разрабатывает на их основе мероприятия по совершенствованию деятельности лаборатории учреждения.

ОБЯЗАННОСТИ ВРАЧА-ЛАБОРАНТА:

1. Проводит лабораторные исследования в соответствии с возложенными на него обязанностями.

2. Осваивает и внедряет новые методы лабораторных исследований, имеющих наибольшую аналитическую и диагностическую информативность.

3. Консультирует врачей других специальностей по вопросам лабораторной диагностики заболеваний.

4. Составляет рекомендации для персонала ЛПУ по правилам взятия крови и доставки биологического материала в КДЛ.

5. Организует и контролирует работу подчиненного ему медицинского персонала, а также выполнение правил техники безопасности и санэпидрежима.

6. Анализирует результаты проведенных исследований, регистрирует их, ведет необходимую учетно-отчетную документацию.

7. Осуществляет мероприятия по проведению внутрилабораторного и внешнего контроля качества исследований.

8. Принимает участие в подготовке отчетов лаборатории.

9. Проводит занятия для специалистов со средним медицинским образованием с целью повышения их квалификации.

10. Повышает свою квалификацию в установленном порядке.

ОБЯЗАННОСТИ ЛАБОРАНТА

(специалиста со средним медицинским образованием по специальности «Лабораторная диагностика»)

1. Выполняет лабораторные исследования по разделу, определяемому заведующим лабораторией в соответствии с квалификационными требованиями и установленными нормами нагрузки.

2. Подготавливает для работы реактивы, химическую посуду, дезинфицирующие растворы.

3. Регистрирует поступающий в лабораторию биологический материал для исследования, в том числе с использованием персонального компьютера, проводит обработку и подготовку материала к исследованию.

4. Проводит забор капиллярной крови.

5. При работе с приборами соблюдает правила эксплуатации, согласно нормативно-технической документации.

6. Осваивает новое оборудование и новые методики исследования.

7. Проводит контроль качества выполняемых исследований и обеспечивает мероприятия по повышению точности и надежности анализов.

8. Проводит стерилизацию лабораторного инструментария в соответствии с действующими инструкциями.

9. Ведет необходимую документацию (регистрация, записи в журналах, бланках результатов анализа, заявки на реактивы, учет своей работы, составление отчета и т.д.).

10. Повышает профессиональную квалификацию в установленном порядке, участвует в занятиях для сотрудников со средним медицинским образованием.

11. Соблюдает правила техники безопасности и производственной санитарии, согласно требованиям санэпидрежима.

Специалист лабораторной службы должен знать: законы и иные информативные акты, касающиеся вопросов организации лабораторной службы — правила и способы получения биологического материала для исследования; современные методы лабораторной диагностики; лабораторную диагностику наиболее распространенных заболеваний; консервирование биологического материала.

На современном этапе развития клинической медицины к лабораторной службе предъявляются все более высокие требования, что объясняется увеличением объема, повышением качества лабораторных исследований, освоением новых, более сложных методов.

Одним из показателей качества работы лаборатории и направленного использования лабораторной диагностики является процент положительных результатов исследований, т.е. результатов, имеющих отклонения от нормальных величин. Процент отклонения «от нормы» характеризует также и уровень компетенции врача-клинициста, который назначает диагностические тесты. По оценкам различных авторов, количество положительных результатов должно приближаться к 40—50%. В таком случае продуктивность и качество работы лаборатории можно считать нормальной. В настоящее время, по данным ВОЗ, количество патологических исследований не превышает 15 — 18%, что говорит о неудовлетворительном качестве работы.

Для сокращения «ненужных» исследований необходимо предпринять следующие мероприятия:

1) обучение (в различной форме) лечащих врачей, предусматривающее ознакомление с фундаментальными знаниями по лабораторной диагностике и интерпретации полученных лабораторных исследований;

2) повышение личной ответственности лечащего врача за назначение лабораторных исследований без соответствующих показаний к тому;

3) правильное оформление направления на лабораторное исследование в соответствии с соответствующими нормативными требованиями;

4) повышение квалификации персонала лабораторий;

5) внутренний контроль за лабораторно-диагностическим процессом с обязательным систематическим определением удельного веса положительных исследований.

РАСТВОРЫ И СПОСОБЫ ВЫРАЖЕНИЯ ИХ КОНЦЕНТРАЦИИ

Растворы различных химических веществ широко применяются в лабораторной практике. Весовая концентрация растворов характеризуется числом граммов растворенного вещества в определенном объеме раствора, молярная и эквивалентная концентрации — числом молей или грамм-эквивалентов растворенного вещества в 1000 г (или 1 дм³) раствора.

В зависимости от способа выражения концентрации вещества, растворы подразделяются на процентные и титрованные. *Процентные* растворы, менее точные, допускают возможность отклонения в навеске вещества в пределах $\pm 1\%$. *Титрованные* растворы требуют взятия навески

на аналитических весах с точностью до 0,1 мг. К титрованным растворам относятся молярные и нормальные растворы. Особенностью титрованных растворов является то, что для их приготовления нет необходимости рассчитывать объем растворителя. Концентрация титрованных растворов всегда задается из расчета на приготовление 1 литра раствора. Готовят титрованные растворы обязательно в мерных колбах. Навеску взвешивают на аналитических весах.

Нормальным называется раствор, в 1л (дм³) которого содержится 1 грамм-эквивалент (г-э) растворенного вещества. Г-э вещества — это количество вещества в граммах, численно равное его эквиваленту. Под эквивалентом вещества понимают часть его молекулы, способную принять участие в реакциях.

Для наиболее часто употребляемых в работе классов химических соединений, таких как основания, кислоты, соли эквивалент рассчитывается следующим образом:

Эквивалент основания равен молекулярной массе основания, деленной на число гидроксильных групп, содержащихся в молекуле основания.

Например, эквивалент гидрата окиси кальция с ММ = 74 у.е. рассчитывается: $\text{Э Ca(OH)}_2 = 74:2=37$.

Эквивалент кислоты равен молекулярной массе кислоты, деленной на число атомов водорода в ее молекуле (для неорганических кислот) или для органических кислот — на число атомов водорода в карбоксильной группе кислоты.

Например, эквивалент серной кислоты с ММ = 98 у.е. рассчитывается: $\text{Э H}_2\text{SO}_4 = 98:2=49$.

Эквивалент соли равен молекулярной массе соли, деленной на произведение числа атомов металла на его валентность.

Например, эквивалент сернокислого алюминия с ММ=342 у.е. рассчитывается: $\text{Э Al}_2(\text{SO}_4)_3 = 342 : (2 \times 3) = 57$.

Молярным называется раствор, в 1 л которого содержится 1г-моль растворенного вещества. Грамм-моль (г/м) вещества — это количество вещества в граммах, численно равное его молекулярной массе.

Процентные растворы. По способу приготовления процентные растворы делятся на три группы:

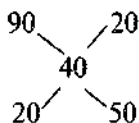
1. Массовые процентные растворы. К ним относятся растворы, содержащие определенное количество вещества в граммах на 100 г раствора. Являются наиболее точными из процентных растворов.

2. Массо-объемные процентные растворы. Растворы, содержащие определенное количество вещества в граммах на 100 мл раствора.

3. Объемные процентные растворы. Растворы, содержащие определенное количество миллилитров растворенного вещества в 100 мл раствора.

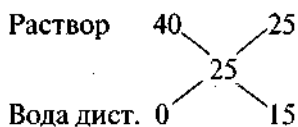
А. Получение раствора требуемой концентрации (вес. %) смешением двух данных растворов. Требуемую концентрацию раствора пишут в месте пересечения двух линий, а концентрации данных растворов — у концов обеих линий слева. На каждой линии вычитают одно стоящее на ней число из другого и разность записывают у свободного конца той же линии. Полученные числа, расположенные справа — вверху и внизу, указывают, сколько весовых частей каждого раствора следует взять, чтобы получить раствор требуемой концентрации.

Пример. Для получения 40% -го раствора из 90 и 20%-ного следует взять на 20 вес. ч. 90%-ного раствора 50 вес. ч. 20%-ного:



Б. Разбавление раствора до требуемой концентрации (вес. %) прибавлением растворителя. Поступают так же, как в предыдущем случае, только слева внизу вместо меньшей концентрации ставят нуль. Полученные числа (расположенные справа — вверху и внизу) указывают, сколько весовых частей раствора и сколько растворителя следует взять.

Пример. Чтобы разбавить 40%-ный водный раствор до 25%-ного, на 25 весовых частей раствора требуется 15 весовых частей воды:



**Относительные молекулярные и эквивалентные массы
наиболее употребляемых веществ**

<i>Название</i>	<i>Формула</i>	<i>Относительная молекулярная масса (I Г-М)</i>	<i>Эквивалентная масса (I Г-Э)</i>
Азотная кислота	HNO_3	63,02	63,02
Аммиак	NH_3	17,032	17,032
Аммония хлорид	NH_4Cl	53,5	53,5
Калия бихромат	$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	294,234	49,039
Калий едкий	KOH	56,11	56,11
Калия йодат	KIO_3	214,032	35,672
Калия карбонат	K_2CO_3	138,2	69,1
Калия хлорид	KCl	74,56	74,56
Меди сульфат	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	249,72	124,86
Натрий едкий	NaOH	40,0	40,0
Натрия карбонат	Na_2CO_3	106,0	53,0
Натрия оксалат	$\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$	133,99	66,99
Натрия хлорид	NaCl	58,455	58,455
Соляная кислота	HCl	36,47	36,47
Серная кислота	H_2SO_4	98,0	49,0

Глава 2

ХАРАКТЕРИСТИКА ОБМЕННЫХ ПРОЦЕССОВ И МЕТОДЫ ИХ ИССЛЕДОВАНИЯ

Процесс обмена веществ, или иначе метаболизм, складывается из двух взаимно противоположных процессов — ассимиляции и диссимиляции. Под процессом ассимиляции (анаболизма) понимают процесс образования соединений, характерных для живого организма из питательных веществ, поступающих извне. Этот процесс сопровождается поглощением энергии.

Процесс диссимиляции (катаболизма) — это процесс разложения сложных соединений, сопровождающийся накоплением энергии и выделением из организма образующихся более простых веществ.

Все многочисленные химические реакции, лежащие в основе обмена веществ, протекают в строго определенной

последовательности, обусловленной генетически, и в организме человека регулируются ЦНС и эндокринной системой.

Развитие детского организма характеризуется изменением соотношения процессов анаболизма и катаболизма, причем в большей степени изменяется анаболическая фаза метаболизма, включающая различные формы биологического синтеза. В меньшей степени подвержена изменениям катаболическая фаза. В связи с быстрым развитием и совершенствованием биохимических исследований и внедрением их в клиническую практику для более точной диагностики заболеваний, возникает необходимость увеличения числа исследований в крови, что приводит к увеличению ее количества, необходимого для анализа. В некоторых случаях забор большого количества крови затруднителен. Поэтому внедрение микрометодов в практику биохимических лабораторий является вопросом первостепенной важности, особенно в педиатрической практике.

Соответственно задачам диагностики и лечения при оценке состояния организма определяют химический состав плазмы. Важнейшей органической частью плазмы являются белки, в состав которых входит фибриноген. Свободная от фибриногена плазма называется сывороткой. Большую группу белков представляют глобулины, в число которых входят иммуноглобулины.

Химический состав плазмы у здоровых людей относительно постоянен, изменение его указывает на наличие патологического процесса в организме. Количество крови у человека составляет примерно 1/13 массы тела. Плазма крови составляет 55%, эритроциты — 44%, остальные клеточные элементы — 1% (Ермолаев М. В., 1974).

ОСНОВНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ БЕЛКОВОГО ОБМЕНА И ЗНАЧЕНИЕ ИХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ

Белки — основная и наиболее важная органическая составная часть живых организмов. Они представляют собой высокомолекулярные азотсодержащие органические соединения. С ними связаны пищеварение, раздражимость, сократимость, движение, способность к размножению и другие функции организма. Наиболее изученными являются белки крови. Находясь в тесной связи с белками различных тканей, белки крови очень тонко реагируют на изменение химических и физико-химических процессов, происходящих в органах человека.

Белки условно делятся на две большие группы — простые, или протеины, и сложные, или протеиды. Простые белки состоят только из аминокислот, соединенных друг с другом пептидной связью. Сложные белки содержат, кроме аминокислот, другие небелковые соединения (углеводы, липиды, нуклеиновые кислоты и др.), представляющие собой так называемые простетические группы.

По форме молекул белки подразделяются на фибриллярные (составляющие многие плотные ткани) и глобулярные. К последним относятся белки плазмы крови. Суммарное их количество определяется как общий белок плазмы крови. Как известно, белки плазмы делятся на 3 большие группы: альбумины, глобулины и фибриноген. Кроме того, белок входит в состав некоторых частей комплементов сыворотки крови, ферментов — тромбина, тромбопластина, липазы, амилазы, пептидаз, фосфатаз и др.

Современные физико-химические методы исследования позволили открыть и описать около 200 различных белковых компонентов плазмы крови. Большое значение приобрело электрофоретическое разделение белков сыворотки крови.

Белки плазмы крови. К белкам плазмы крови в норме относятся: альбумины, глобулины и фибриноген. Это простые белки — протеины, которые различаются между собой по молекулярной массе, физико-химическим свойствам и биологической роли. Суммарное количество белков плазмы составляет такое понятие как общий белок крови. Общее содержание белков в плазме крови не претерпевает значительных изменений с возрастом. У новорожденных, особенно недоношенных, оно несколько ниже, но в течение первого года жизни повышается.

Содержание альбуминов у детей к концу первого года жизни также приближается к таковому у взрослых, в то время как глобулины достигают этого уровня позже. В отношении фибриногена значительных колебаний не отмечается. Существенной разницы в содержании белков в зависимости от пола также не отмечается. В лабораторной практике чаще приходится оперировать таким понятием как общий белок сыворотки крови. Так как сыворотка крови — это плазма крови, лишенная фибриногена, то общий белок сыворотки будет содержать на 2—4 г/л белка меньше, чем общий белок крови (плазмы).

В зависимости от метода исследования белков крови можно получить от 5 до 100 белковых фракций. Традиционным, унифицированным методом разделения белков

сыворотки крови является метод электрофореза на бумаге, ацетатцеллюлозе. Этим методом получают 5 белковых фракций; альбумины — гомогенная фракция, и глобулины — гетерогенная фракция, состоящая из альфа₁-, альфа₂-, бета — и гамма- глобулинов. Другие методы, позволяющие получить большее количество белковых фракций, в клинической практике не применяются из-за трудностей при интерпретации получаемых результатов.

Альбумины. На долю альбуминов приходится 55—66% от общего белка крови. Синтезируются альбумины в печени, поэтому целый ряд проб коллоидоустойчивости белков крови, связанных с количественными изменениями соотношения альбумины/ глобулины, в немалой мере отражают и состояние печеночной паренхимы.

Альбумины несут в организме многогранную физиологическую нагрузку. Именно альбумины, главным образом, участвуют в регуляции коллоидно-осмотического давления крови.

В норме между кровью и тканевыми жидкостями существует динамическое равновесие, то есть нормальная белковая концентрация обеспечивает физиологическое распределение водно-солевого раствора между жидкими средами организма. Однако, при резком снижении альбуминов (<30 г/л) вода не задерживается в кровяном русле и проникает в ткани, вызывая их отек. Это случается при целом ряде патологических состояний, например, таких как массивная кровопотеря, нефротический синдром. Хорошо иллюстрирует описанное выше явление известное некогда выражение “опух от голода”. Длительное голодание приводит организм к использованию собственных белков плазмы для процессов белкового синтеза (как источник аминокислот). Это приводит к снижению концентрации альбуминов и, как следствие, к отеку тканей.

Альбумины выполняют в организме также транспортную функцию. Связываясь с токсическими продуктами обмена, они, не снижая токсических свойств метаболитов, способствуют их выделению из организма. Например, альбумин, связывая в кровяном русле билирубин, доставляет его в печень, которая обеспечивает выведение билирубина в кишечник. Альбумины связывают в крови высокотоксичные свободные жирные кислоты и доставляют в жировое депо. Значительная часть кальция в сыворотке крови также связана с альбуминами.

Альбумины связывают избыток гормонов, нейтрализуя их действие. Это наиболее важные свойства альбумина.

При патологии чаще встречается снижение концентрации альбумина — гипоальбуминемия. Такое состояние наблюдается при заболеваниях печени, а также при острых и хронических воспалительных процессах, ожогах. Повышение концентрации альбумина — гиперальбуминемия, встречается редко и может быть связана с дегидратацией организма (т.е. относительная гиперальбуминемия).

Альфа-глобулины. Фракция включает в себя целый ряд белков, таких как: гаптоглобин, протеиды, церулоплазмин, α -липопротеиды, ЛПВП, α -антитрипсин, патологические белки — α -фетопротеин, С-реактивный белок. Синтезируются в печени. При электрофорезе подразделяются на α_1 - и α_2 -глобулины. В норме α_1 -глобулины составляют 3—6%, а α_2 -глобулины — 7—10% от общего белка крови. Альфа-глобулины относятся к белкам “острой фазы”. Их концентрация возрастает в остром периоде заболевания и при обострении хронических процессов.

Бета-глобулины. В состав фракции входят β - и пре- β -липопротеиды, фибриноген, плазминоген, трансферрины, комплимент, липопротеидлипаза. Синтезируются в печени, в тканях системы мононуклеарных фагоцитов (СМФ) и РЭС. В норме составляют 7—12% от общего белка крови. При патологии их концентрация увеличивается; в основном, при заболеваниях, связанных с нарушением липидного обмена, атеросклерозе, сахарном диабете, гломерулонефрите, гипотиреозах, механической желтухе.

Гамма-глобулины. Фракция содержит антитела (иммуноглобулины), обеспечивающие гуморальный иммунитет организма, белковые факторы свертывания крови — агглютинины, участвующие в формировании групповой принадлежности крови. Синтезируются в тканях печени и других органов. В норме γ -глобулины составляют 13—22% от общего белка крови. При заболеваниях уровень γ -глобулинов может быть сниженным и повышенным. Снижение γ -глобулинов связано с врожденным дефектом иммунной системы, когда выпадает синтез отдельных или всех иммуноглобулинов. Угнетение синтеза иммуноглобулинов отмечается при гипертоксических вирусных и бактериальных инфекциях, в результате облучения, приема цитостатиков и кортикостероидов в больших дозах.

Гипергаммаглобулинемия часто сопровождает аутоиммунные заболевания (за счет аутоантител), паразитарные инвазии, хронические бактериальные инфекции (сепсис, даже у детей), хронические гепатиты и циррозы печени.

Значительное диагностическое значение имеют белки «острой фазы», синтезирующиеся в печени и объединяющие до 30 белков плазмы крови. К наиболее чувствительным белкам «острой фазы» относятся С-реактивный белок и амилоидный белок А, концентрация которых увеличивается при повреждении в 100 и более раз.

Вторую группу составляют белки, концентрация которых при патологии может увеличиваться в 2 — 5 раз. К ним относятся α_1 -антитрипсин, гаптоглобин, фибриноген.

Индивидуальной оценки требует интерпретация результатов определения содержания церулоплазмينا, C_3 - и C_4 комплиментов.

Содержание альбумина, трансферрина, преальбумина может снижаться на 30—60%, что обусловлено снижением синтеза, увеличением потребления, либо изменением их распределения в организме.

Нормальное соотношение альбуминов и глобулинов в плазме примерно равно 2 : 1 или 3 : 2,1. При некоторых патологических состояниях содержание альбуминов снижается, при этом количество глобулинов повышается. В результате соотношение альбумины : глобулины изменяется и может быть равным 1 : 1 или 1 : 2. При этом, для интерпретации результата необходимо определять общий белок.

Охарактеризовав отдельные белковые фракции, приводим обобщенные сведения относительно физиологической роли белков плазмы крови:

1. Белки плазмы участвуют в регуляции коллоидно-осмотического давления крови. Ведущая роль в этом принадлежит альбумину;

2. Обеспечивают постоянство вязкости крови;

3. Принимают участие, наряду с другими системами, в регуляции кислотно-основного состояния крови. Белки плазмы, благодаря такому свойству как диафотерность, могут нейтрализовать избыток как кислот, так и оснований;

4. Поддерживают физиологический уровень катионов в крови. Белки плазмы образуют с катионами недиализируемые соединения, что препятствует их потере из организма. Например, 50% кальция сыворотки связано с белками. С белками сыворотки связана значительная часть железа, меди, магния, йода;

5. Белки плазмы (альбумин) связывают избыток гормонов, нейтрализуя их действие;

6. Белки плазмы выполняют транспортную функцию. Соединяясь с метаболитами, лекарственными вещества-

ми, они способствуют их переносу в соответствующие органы и ткани, либо выведению из организма. Например, альбумин транспортирует в печень билирубин, β -липопротеиды — холестерин, α -липопротеиды — фосфолипиды;

7. Игрют важную роль в процессах иммунитета (иммуноглобулины, комплимент и др.);

8. Участвуют в процессах свертывания крови (фибриноген, белковые факторы гемостаза, ферменты свертывающей системы);

9. В случаях крайнего истощения организма, белки плазмы могут использоваться как источник аминокислот;

10. Каталитическая функция (ферментативная активность).

Изменения белков плазмы при патологии могут проявляться в виде диспротеинемии, дефектпротеинемии и парапротеинемии.

Диспротеинемия — это патология, связанная с любыми количественными изменениями отдельных белковых фракций. Например, при острых инфекционных процессах, либо при обострении хронических заболеваний, на фоне снижения количества альбуминов, увеличиваются α_1 — α_2 глобулиновые фракции. При хронических инфекционных заболеваниях на фоне снижения альбуминов увеличиваются β - и γ - глобулиновые фракции. А при циррозе печени на электрофореграмме белков плазмы отмечается значительно увеличенная γ - глобулиновая фракция при одновременном снижении количества альбуминов.

Дефектпротеинемия — определяется как дефицит или полное отсутствие определенных белков плазмы, свойственных здоровому организму. Чаще эта патология носит врожденный характер. Например, гемофилия — это наследственное заболевание, передающееся по материнской линии к лицам мужского пола, проявляется длительными обильными кровотечениями из-за дефицита VIII, IX либо XI белковых факторов свертывания крови.

Парапротеинемия — это патология, характеризующаяся появлением в плазме крови белков, не свойственных здоровому организму. Например, при миеломной болезни на электрофореграмме белков сыворотки крови появляется дополнительная шестая фракция, так называемый M-градиент, который располагается обычно между бета- и гамма-глобулиновыми фракциями. В моче при миеломной болезни можно обнаружить белок Бенс-Джонса.

К парапротеинемиям следует отнести появление в сыворотке крови С-реактивного белка. Свое название белок получил в связи с тем, что впервые был выделен в реакции преципитации с С-полисахаридом оболочки пневмококков. СРБ способен связывать широкий спектр лигандов — компонентов микроорганизмов, токсинов, частиц поврежденных тканей, препятствуя их распространению. В сыворотке крови здорового человека С-реактивный белок отсутствует. Его появление отмечается при воспалительных процессах любой этиологии.

Большое диагностическое значение имеет количественное определение СРБ. Концентрация СРБ в плазме крови здорового человека, как правило, менее 10 мг/л. Содержание СРБ является индикатором при острых воспалительных заболеваниях, сепсисе. При подозрении на сепсис у новорожденных концентрация СРБ более 12 мг/л является указанием на немедленное начало противомикробной терапии, но следует помнить, что у части новорожденных бактериальная инфекция может и не сопровождаться резким повышением концентрации СРБ. Использование этого показателя для клинической практики имеет ряд преимуществ. Это быстрое увеличение концентрации (в первые 6—12 часов, максимальная — на 2—3 сутки), многократное увеличение концентрации, отсутствие изменений при вирусной инфекции позволяет дифференцировать вирусную и бактериальную инфекции, быстрая нормализация уровня, простота определения.

В качестве еще одного парапротеинемического белка, имеющего практическое значение, можно назвать интерферон, который появляется в крови в ответ на внедрение вируса. Он имеет для организма защитное значение — блокирует размножение вируса, воздействуя на его нуклеиновые кислоты.

В развитии парапротеинемических гемобластозов, как известно, одним из ведущих моментов является выраженный синдром белковой патологии. Для его обнаружения, еще на предварительном этапе обследования больного, достаточно постановки элементарных проб коллоидоустойчивости белков сыворотки крови. Из них простейшей является проба Вальденстрема, положительная при одноименном заболевании.

Проба проводится следующим образом:

В пробирку, содержащую 4—5 мл дистиллированной воды, добавляют 1—2 капли исследуемой сыворотки крови. Если обследуемый человек здоров, то образующийся вна-

чале мутный след в воде от добавляемых капель сыворотки быстро исчезает и вода остается прозрачной — отрицательный результат пробы. В случае же болезни Вальденстрема образуется интенсивное стойкое помутнение всего содержимого пробирки — положительная проба Вальденстрема. Такой результат требует дальнейшей дифференцированной биохимической характеристики выявленной белковой патологии.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЛКОВ

В настоящее время имеется несколько методов определения общего белка в сыворотке крови, основными из них являются следующие:

1. Количественные химические методы (м-д Кьельдаля, биуретовая реакция, солевое фракционирование альбуминов и глобулинов, осаждение этанолом при низкой температуре).

2. Рефрактометрические.

3. Нефелометрические (количество белка определяется по степени помутнения).

4. Поляриметрические.

5. Ультрацентрифугирование.

6. Электрофорез.

2.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО БЕЛКА РЕФРАКТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Принцип. При переходе из одной среды в другую луч света меняет направление — преломляется. Коэффициент преломления (отношение синуса угла падения к синусу угла преломления) в сыворотке крови зависит, главным образом, от содержания в ней общего белка.

Определение. 1. Подготовка рефрактометра к работе: предварительно проверяют нулевую точку прибора. С этой целью камеру со зрительной трубкой переводят в горизонтальное положение. Приподнимают верхнюю половину камеры и на призму наносят 1—2 капли дистиллированной воды. Закрывают камеру. С помощью зеркала направляют свет в окно камеры. Поворотом винта достигают резкой границы светотени. Линию окуляра шкалы устанавливают на 1,3330 и в зрительную трубку наблюдают границу светотени по отношению к точке пересечения двух взаимно перпендикулярных линий. Совпадение границы светотени с точкой пересечения линий указывает на то, что прибор установлен на ноль.

2. На поверхность призмы наносят 1—2 капли исследу-

емой сыворотки и быстро закрывают камеру. Поворачивают камеру до момента совпадения границы светотени с точкой пересечения двух линий. Этот момент устанавливают при наблюдении через окуляр и по таблице 2.1 находят содержание белка.

По окончании работы обе призмы промывают дистиллированной водой и протирают фильтровальной бумагой или мягкой тряпочкой.

Таблица 2.1

Коэффициент преломление и содержание белка (г%) по Рейссу

1,33705	0,63	1,34612	5,90
1,33743	0,86	1,34650	6,12
1,33781	1,08	1,34687	6,34
1,33820	1,30	1,34724	6,55
1,33858	1,52	1,34761	6,77
1,33896	1,74	1,34798	6,98
1,33934	1,96	1,34836	7,20
1,33972	2,18	1,34873	7,42
1,34010	2,40	1,34910	7,63
1,34048	2,62	1,34947	7,85
1,34086	2,84	1,34984	8,05
1,34124	3,06	1,35021	8,28
1,34162	3,28	1,35058	8,49
1,34199	3,50	1,35095	8,71
1,34237	3,72	1,35132	8,92
1,34275	3,94	1,35169	9,14
1,34313	4,16	1,35205	9,35
1,34350	4,38	1,35242	9,57
1,34388	4,60	1,35279	9,78
1,34426	4,81	1,35316	9,99
1,34463	5,03	1,35352	10,20
1,34500	5,25	1,35388	10,41
1,34537	5,47		

Для пересчета г% в г/л полученные результаты следует умножить на 10.

Примечание. Метод прост, достаточно точен и не требует значительного количества сыворотки.

2.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО БЕЛКА МЕТОДОМ ЛОУРИ

Принцип. Метод основан на способности белков давать цветную реакцию с биуретовым и фенольным реактивом.

Реактивы. 1. 20 г Na_2CO_3 и 0,5 г виннокислого натрия или калия в 1 л 0,1 N NaOH.

2. 1,0 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1 л воды.

3. Смешивают 45 мл реактива 1 с 5 мл реактива 2. Годен в течение одного дня.

4. Разбавленный реактив Фолина и Чокэльта.

Приготовление реактива. В колбу емкостью 1500 мл, содержащую 100 г вольфрамвокислого натрия ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) и 25 г молибденовокислого натрия ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) добавляют 700 мл дистиллированной воды, 50 мл 85% ортофосфорной и 100 мл концентрированной соляной кислоты. Колбу соединяют с холодильником резиновой или корковой пробкой, обернутой фольгой. Смесь кипятят в течение 10 часов. После этого к раствору добавляют 150 г сернокислого лития, 50 мл дистиллированной воды и несколько капель (3—4) жидкого брома. Раствор кипятят 10 — 15 минут без холодильника до полного удаления избытка брома, охлаждают и доводят его объем в мерной колбе дистиллированной водой до 1 л. Хранят в темных, плотно закрытых склянках. Реактив имеет насыщенный желтый цвет без зеленоватого оттенка.

Устанавливают нормальность основного раствора Фолина и Чокэльта титрованием 0,1 N NaOH с индикатором фенолфталеином. Титруют 1 мл раствора с 50 мл воды. Разводят основной раствор так, чтобы его кислотность соответствовала 0,1 N.

Ход определения. 0,2 мл разведенной (1:200) испытуемой сыворотки смешивают с 5 мл раствора 3. Через 15 минут прибавляют очень быстро 0,5 мл реактива 4 и энергично размешивают в течение 1 — 2 секунды. Спустя 30 минут фотометрируют при фильтре $S=72$ в спектрофотометре или на ФЭКе с красным фильтром против контроля на реактивы.

Расчет производится по стандартной кривой, составленной с кристаллическим альбумином.

2.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО БЕЛКА СЫВОРОТКИ КРОВИ ПО БИУРЕТОВОЙ РЕАКЦИИ

Принцип. Белки реагируют в щелочной среде с сернокислой медью с образованием соединений, окрашенных в фиолетовый цвет (биуретовая реакция).

Исследуемый материал: сыворотка крови.

Реактивы.

1. 0,9% раствор хлористого натрия.
2. 0,2 н раствор едкого натра, свободный от углекислого газа.

3. Биуретовый реактив 4,5 г сегнетовой соли растворяют в 40 мл 0,2 н раствора едкого натра. Затем прибавляют 1,5 г сернокислой меди ($\text{Cu SO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$) и 0,5 г йодистого калия. В раствор доливают до 100 мл раствор 0,2 н едкого натра. Хранят в посуде из темного стекла. Реактив стоек.

4. 0,5% раствор йодистого калия в 0,2 н растворе едкого натрия. Хранят в посуде из темного стекла не более двух недель.

5. Рабочий раствор биуретового реактива, 20 мл биуретового реактива смешивают с 80 мл раствора йодистого калия. Раствор стоек.

6. Стандартный раствор альбумина (из плацентарной человеческой или бычьей сыворотки). 10% раствор альбумина в 0,9% растворе хлористого натрия, 1 мл раствора содержит 0,1 г белка.

Ход определения. К 0,1 мл сыворотки прибавляют 5,0 мл рабочего раствора биуретового реактива, смешивают, избегая образования пены. Через 30 минут (и не позднее, чем через 1 час) измеряют на ФЭКе в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 540—560 нм (зеленый светофильтр), против контроля.

Контроль. В 5,0 мл рабочего раствора биуретового реактива прибавляют 0,1 мл 0,9% раствора хлористого натрия; далее обрабатывают, как опыт.

Расчет ведут по калибровочному графику.

Построение калибровочного графика. Из 10 г% стандартного раствора готовят рабочие растворы, как указано в таблице 2.2 (0,1 мл основного стандартного раствора содержит 0,01 г белка).

Из каждого разведения берут по 0,1 мл рабочего раствора и прибавляют по 5,0 мл рабочего биуретового реактива; через 30—60 минут измеряют на ФЭКе, как в опыте, против контроля. По полученным данным строят калибровочный график. Калибровочную кривую можно строить лишь после того, как будет уверенность в том, что метод достаточно налажен. При этом для каждой концен-

трации стандартного раствора нужно сделать не менее чем 3—5 (обычно 5—10) определений.

Таблица 2.2

Схема приготовления рабочих растворов

№	Стандартный раствор белка	0,9% раствор хлористого натрия	Концентрация белка в г/л
I	0,4 мл	0,6 мл	40
II	0,6 мл	0,4 мл	60
III	0,8 мл	0,2 мл	80
IV	1,0 мл	—	100

Средние значения оптической плотности (соответствующие различным концентрациям) наносят на миллиметровую бумагу. На оси абсцисс (горизонтальной), с соблюдением одинаковых интервалов, равномерно откладывают значения концентрации стандартных растворов белка; по оси ординат (вертикальной) — соответствующие им величины оптической плотности. Масштаб выбирают так, чтобы кривая располагалась под углом $\approx 45^\circ$. Затем наносят среднее значение экстинкции из нескольких определений и через полученные точки (а возможно и между ними) проводят прямую линию. Если точки значительно выходят за пределы линии, то пробы рекомендуются повторить.

При оценке результатов, чтобы каждый раз не восстанавливать и не опускать перпендикуляры к оси ординат (оси оптической плотности) и к оси абсцисс (концентраций), следует составить таблицу пересчета (градуировочную таблицу), в которой напротив наиболее часто встречающихся значений экстинкций приводят соответствующие величины концентрации (табл. 2.3).

Калибровочную кривую нужно время от времени проверять. При этом достаточно сделать несколько концентраций и посмотреть, укладываются ли их точки на прежней калибровочной кривой. Если да, то кривую не переделывают.

Нормальные величины в сыворотке крови:

	г/100 мл	г/л
Кровь из пуповины:	4,8—8,0	48—80
Недоношенные	3,6—6,0	36—60
Новорожденные	4,6—7,0	46—70
1 неделя	4,4—7,6	44—76
7 месяцев — 1 год	5,1—7,3	51—73
1—2 года	5,6—7,5	56—75
≥3 лет	6,0—8,0	60—80
Взрослые	6,0—7,8	60—84
>60 лет, снижение на:	=0,2	=2,0

Нормальные величины в спинномозговой жидкости:

Недоношенные	15—130	150—1300
Новорожденные	40—120	400—1200
<1 месяца	20—80	200—800
>1 месяца	15—40	150—400

Нормальные величины в амниотической жидкости:

Ранние сроки беременности	0,2—1,7	2,0—17,0
Поздние сроки беременности	0,175—0,705	1,8—7,1

Диагностическая значимость:

Повышение уровня
(>90 г/л)

Свидетельствует о гипериммуноглобулинемии либо поликлональной, или клональной гаммапатии, при миеломной болезни, болезни Вальденстрема, аутоиммунных заболеваниях, хронических воспалительных заболеваниях, состояниях, сопровождающихся дегидратацией организма (понос, рвота).

Понижение
(<60 г/л)

Связано с потерей белка (при гастроэнтеропатиях, ожогах, нефротическом синдроме) и снижением синтеза белка (при тяжелой бел-

ковой недостаточности, хронических заболеваниях печени, синдроме нарушенного всасывания, гаммаглобулинемии, при хроническом панкреатите, массивных кровопотоках, при задержке воды в результате сердечной декомпенсации, при длительных воспалительных заболеваниях, раковой кахексии, гипертиреозе, глистных инвазиях, туберкулезе.

Примечания:

1. Название "Биуретовая реакция" произошло от соединения, образующегося при сплавлении двух молекул мочевины — биурету $\text{NH}_2 - \text{CO} - \text{NH} - \text{CO} - \text{NH}_2$. А.Я.Данилевский (1888 г.), изучая биуретовую реакцию, впервые высказал предположение, что связь типа биуретовой — $\text{NH} - \text{CO} -$ может быть положена в основу соединения отдельных аминокислот друг с другом в белковой молекуле. Э.Фишер (1902 г.) выдвинул полипептидную теорию строения белков, в которой доказал наличие связи $-\text{NH} - \text{CO}-$ между аминокислотами в белковой молекуле, но назвал такую связь пептидной.

2. Уровень общего белка повышен при венозном стазе, снижен при беременности, при разведении крови, в положении лежа (во время ночного сна пределы колебаний 1,0 — 1,3 г/100 мл) и во время внутривенных вливаний. На результаты могут влиять липемия, гемолиз и гипербилирубинемия.

3. Данный метод определения общего белка является наиболее специфичным и точным, так как биуретовой реакцией выявляются пептидные связи.

4. Биуретовая реакция чувствительна к температуре. Повышение температуры увеличивает скорость развития окраски. Поэтому определение необходимо проводить при одной и той же температуре. Обычно это комнатная температура.

5. Время экспозиции проб в ходе исследования также сказывается на интенсивности окраски реакционной смеси. Поэтому для получения сопоставимых результатов колориметрирование всегда проводят через одинаковые интервалы времени, которые выбирают в промежутке между 30—60 мин экспозиции и закладывают при построении калибровочного графика.

6. Содержание белка в стандартном растворе должно быть не меньше 70 г/л.

7. При содержании белка в сыворотке больше 100 г/л сыворотку разводят физиологическим раствором, а результаты умножают на коэффициент разведения.

8. Все реактивы готовят на прокипяченной дистиллированной воде.

2.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ СЫВОРОТКИ КРОВИ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА НА БУМАГЕ

Принцип метода. В постоянном электрическом поле белки сыворотки крови, несущие электрический заряд, движутся по смоченной буферным раствором бумаге со ско-

ростью, зависящей от величины заряда и молекулярного веса белков. В щелочной среде разделение белковых фракций происходит в направлении от катода к аноду. Наибольшей скоростью продвижения обладает альбумин, как мелкодисперсный, с относительно невысокой молекулярной массой белок. За ним следуют глобулины: α_1 -, α_2 -, β - и γ - фракции. Гамма-глобулины — тяжелые крупные белки уходят недалеко от линии старта.

Реактивы. 1. Буферный раствор. Веронал-мединаловый буфер с рН 8,6. Для приготовления 1 литра буфера взвешивают 10,32 г мединала (натриевая соль веронала), растворяют в химическом стакане емкостью 500 мл приблизительно в 300 мл дистиллированной воды. После растворения мединала сюда же добавляют 1,84 г веронала и для его растворения нагревают смесь на водяной бане до температуры не выше 80°C , чтобы избежать разложения барбитуратов. После охлаждения раствора до комнатной температуры его количественно переносят в мерную колбу на 1 литр и доводят объем дистиллированной водой до метки. Определяют рН с помощью рН-метра. От точности соблюдения рН буферного раствора во многом зависит качество электрофоретического разделения белковых фракций.

2. Красящий раствор с водорастворимым бромфеноловым синим и сулемой: бромфеноловый синий — 0,5 г, сулема — 10,0 г, ледяная уксусная кислота — 20 мл, вода дистиллированная — 980 мл. Порядок приготовления следующий: вначале растворяют 10,0 г сулемы в небольшом количестве кипящей воды, затем добавляют 20 мл ледяной уксусной кислоты и 0,5 г растертого в порошок бромфенолового синего. Смесь взбалтывают, охлаждают и доводят до 1 литра дистиллированной водой в мерном стакане, после чего фильтруют. Правильно приготовленный раствор имеет насыщенный вишнево-красный цвет.

3. 1% раствор уксусной кислоты. Раствор для отмывания электрофореграмм от несвязавшейся с белком краски.

4. 0,01N раствор NaOH. Элюирующий раствор для извлечения бромфенолового синего из окрашенных электрофореграмм.

5. Просветляющий раствор, используется при расчете белковых фракций с помощью денситометра. Бумажную ленту с окрашенной протеинограммой смачивают в растворе альфа-бромнафталина в вазелиновом масле (10 мл альфа-бромнафталина и 90 мл вазелинового масла), либо в чистом вазелиновом масле.

Оборудование. Аппарат для проведения электрофореза на бумаге с преобразователем переменного тока в постоянный, с силой тока 50—100 мА при напряжении 180—400 вольт.

Ход определения. 1. Подготовка электрофоретической камеры. Перед работой камеру устанавливают в строго горизонтальном положении. Кюветы камеры заполняют приблизительно на половину объема буферным раствором, следя за тем, чтобы уровень жидкости в них был одинаков. Это предотвращает возникновение “сифонного эффекта” с перебрасыванием жидкости по бумажной ленте из одной камеры в другую, что затрудняет процесс разделения белковых фракций.

2. Подготовка бумажных лент для электрофореза. Используют хроматографическую бумагу различных типов: “быструю”, “медленную”, последняя предпочтительнее. Из хроматографической бумаги производства Германии для электрофореза лучше подходит бумага типа F № 3 и F № 5.

Хроматографическая бумага имеет хорошо различимую лицевую гладкую и обратную рубчатую стороны. Рельефность бумаги обусловлена волокнами целлюлозы, которые создают как бы систему продольных капилляров. Нарезают ленты бумаги обязательно вдоль хода волокна целлюлозы, а не поперек, для того, чтобы не нарушать естественную капиллярность бумаги. Этим облегчается продвижение белковых фракций и предупреждается растекание их по краям бумаги.

Размер бумажных лент определяется габаритами электрофоретической камеры. Для аппаратов типа ПЭФ-2 оптимальным является размер ленты 2,5 x 40 см. Нарезают бумажные ленты с запасом, хранят в сухих, чистых коробках.

Перед установкой в электрофоретическую камеру бумажные ленты разметить соответствующим образом. На одном конце ленты, лучше на том, который идет к аноду, отмечают простым карандашом номер анализа, а в центре ленты карандашом ставят точку. Такая центровка ленты облегчает ее установку симметрично относительно центральной оси камеры, при этом концы ленты равномерно погружаются в обе кюветы с буферным раствором.

После разметки бумажные ленты замачивают в буферный раствор, оставляя сухими только концы. Слегка промокают ленты между двумя листами фильтровальной бумаги и укладывают в камеру.

3. Нанесение сыворотки. Сыворотку крови набирают микропипеткой емкостью на 0,1 мл в объеме до 0,02 мл. Затем полученной каплей слегка касаются бумажной ленты в месте намечаемой линии старта (0,5 — 2 см от краев, в зависимости от типа электрофоретической камеры). Количество сыворотки, которое переходит на бумажную ленту, будет достаточным для выполнения исследования. Остаток сыворотки из микропипетки удаляют, микропипетку промывают буферным раствором и повторяют аналогичные манипуляции с сывороткой крови следующего больного.

4. Проведение электрофореза. Выполняется при закрытой крышечкой электрофоретической камере. Это обусловлено конструктивными особенностями камеры, направленными на предупреждение поражения электротоком работающих.

Величина напряжения, при котором выполняется разделение белковых фракций, определяется, исходя из расчета 3—8 В на 1 см длины бумажной ленты. Для бумажной ленты длиной 40 см это напряжение составляет 240 В, время разделения фракций составляет 3—20 часов и определяется экспериментальным путем.

5. Обработка бумажных лент. По окончании электрофореза аппарат отключают от электросети. Вынимают бумажные ленты, развешивают их на деревянные рамки, лучше в горизонтальном положении и сушат в шкафу при температуре около 100°C в течение 10 минут. Затем ленты укладывают в плоские эмалированные кюветы так, чтобы они не соприкасались друг с другом и заливают красителем на 20—30 минут. Краситель сливается обратно в сосуд (используется многократно). Ленты несколько раз промывают 1% раствором уксусной кислоты до обесцвечивания участков бумаги, свободных от белка. Ленты высушивают на воздухе, подвешивая их на деревянные рамки или иные приспособления в вертикальном положении.

Методы окраски и подсчета белковых фракций. Для выявления белков электрофореграммы обычно окрашивают растворами, содержащими бромфеноловый синий, кислотный сине-черный, амидо-черный и другие красители:

1. Красящий раствор с бромфеноловым синим и сулемой: бромфенолового синего (индикатор) — 0,5 г, сулемы — 10 г, уксусной кислоты (ледяной) — 20 мл, воды дистиллированной — 980 мл. 10 г сулемы растворяют в небольшом количестве кипящей дистиллированной воды,

добавляют 20 мл ледяной уксусной кислоты и 0,5 г растертого в порошок бромфенолового синего, взбалтывают, охлаждают и доводят до метки в мерной колбе на 1000 мл, после чего фильтруют; светлый раствор имеет яркий насыщенный вишнево-красный цвет.

2. Красящий раствор с бромфеноловым синим и сернокислым цинком:

а) бромфенолового синего (индикатор) — 0,1 г, кристаллического сернокислого цинка — 50 г, ледяной уксусной кислоты — 50 мл, дистиллированной воды — 900 мл. Способ приготовления тот же, что и в случае с сулемой, однако обработка в этом красящем растворе осуществляется в течение ночи;

б) бромфенолового синего (индикатор) — 0,5 г, кристаллического сернокислого цинка — 10 г, ледяной уксусной кислоты — 20 мл, дистиллированной воды — 500 мл. Способ приготовления аналогичен описанному выше, время обработки полос составляет 30 минут.

3. Красящий раствор с кислотным сине-черным красителем (краска, аналогичная амидо-черному): кислотного сине-черного красителя — 0,2 г, уксусной кислоты ледяной — 100 мл, метилового спирта — 900 мл. 0,2 г кислотного сине-черного красителя растворяют в 100 мл ледяной уксусной кислоты и доводят до 1000 мл метиловым спиртом, либо 0,2 г красителя растворяют в смеси 100 мл уксусной кислоты и 900 мл метилового спирта.

4. Если используется амидо-черный 10В, то 100 мг краски растворяют в 100 мл ледяной уксусной кислоты и добавляют 900 мл метилового спирта.

● Сухие ленты окрашивают этими красителями в течение 30 минут.

● Сулема, сульфат цинка и ледяная уксусная кислота необходимы в качестве фиксаторов.

Затем фореграммы отмывают от несвязавшейся с белком краски в нескольких сменах (обычно 3—5) отмывающего раствора — до последней “бесцветной” порции, т.е. пока фон лент не делается белым, а раствор промывной жидкости не перестанет окрашиваться в желтый цвет.

Растворы для отмывания электрофореграмм от несвязавшейся с белком краски (отмывающие растворы) имеют разный состав (в зависимости от применявшегося красителя):

а) при окраске бромфеноловым синим применяют 2% раствор уксусной кислоты, получаемый добавлением к 20 мл ледяной уксусной кислоты 980 мл дистиллированной воды;

б) для амидо-черного 10В (или сине-черного красителя) используют смесь следующего состава: уксусной кислоты ледяной — 100 мл, фенола (расплавленного) — 40 мл, дистиллированной воды — 860 мл.

Отмытые ленты высушивают на воздухе при комнатной температуре (желательно в затемненном месте, если в качестве красителя использовали бромфеноловый синий). В последнем случае для получения более интенсивной окраски фракций, высушенные ленты проводят над открытой бутылкой с концентрированным раствором аммиака. Пары аммиака нейтрализуют остатки уксусной кислоты. При этом пятна белковых фракций из слабо-зеленых превращаются в ярко-синие. Сухие окрашенные электрофореграммы хранят в темноте.

Дальнейшую количественную обработку электрофореграмм производят извлечением краски из бумаги (элюация) с последующим измерением оптической плотности на ФЭКе, либо с помощью денситометра.

В случае денситометрии в проходящем свете, ленты пропитывают просветляющей жидкостью. Смоченную ленту промокают между листами фильтровальной бумаги и вставляют в денситометр таким образом, чтобы против щели камеры находился неокрашенный участок. Писчик денситометра настраивают на "0" и включают протягивающее и записывающее устройство. Записанная на денситометре кривая позволяет судить о числе фракций и о содержании в них белка. Для этого кривую делят на ряд участков, соответствующих отдельным фракциям. Величина площади каждого участка пропорциональна количеству краски, соединившейся с белком данной фракции. Соотношение между этими площадями вычисляют по весу вырезанных участков бумаги, взвешенных на торсионных весах. Общий вес всех участков принимают за 100% или же за содержание общего белка в плазме в г% и вычисляют, какой процент по отношению к нему составляет вес каждого участка (фракции).

Для просветления электрофореграмм перед обработкой их на денситометре применяют обычно следующие жидкости: а) вазелиновое масло; б) 10% раствор α -бромнафталина в вазелиновом масле (30 мл вазелинового масла смешивают с 10 мл α -бромнафталина).

При элюировании определяют величину экстинции каждой фракции и общую сумму экстинций, которую принимают за 100% (выражая результаты в относительных процентах) или же за величину содержания общего белка

(если результаты содержания отдельных фракций хотят выразить в абсолютных процентах, т.е. г%).

Сухие электрофореграммы разрезают по числу фракций, ориентируясь на самый светлый участок между ними. Полоску каждой фракции помещают в отдельную пробирку и заливают 3 мл элюирующего раствора. К альбуминовой фракции добавляют 9 мл этого раствора, на основании чего величину оптической плотности первой пробирки умножают на 3. Можно в каждую пробирку вносить и по 5 мл элюирующего раствора. Контролем служит участок фореграмм, не содержащий белок. Содержимое пробирок осторожно встряхивают и оставляют в затемненном месте на 40 — 60 мин. Определение плотности испытуемых растворов производят на ФЭКе любого типа при зеленом светофильтре. В контрольные кюветы наливают элюирующий раствор, по которому устанавливают нулевое положение гальванометра. Растворы для элюации краски из окрашенных электрофореграмм (экстрагирующие растворы) имеют следующий состав:

а) для извлечения бромфенолового синего применяют 0,01 н раствор едкого натра (0,4 г NaOH растворяют в 1000 мл дистиллированной воды). Лучше использовать 5% раствор карбоната натрия (Na_2CO_3), так как он дает более устойчивую окраску, чем раствор едкого натра;

б) для извлечения кислотного сине-черного красителя берут 0,1 н раствор едкого натра (NaOH).

Определение процентного соотношения белковых фракций методом элюирования с последующим фотометрированием считается более точным, чем проведение его с помощью денситометра.

Расчет. Сумма цифр оптических плотностей составляет 100%, а каждая фракция — X от 100.

Пример. Оптическая плотность (E) фракции альбуминов 0,52, глобулинов: α_1 — 0,02, α_2 — 0,05, β — 0,10, γ — 0,15, в сумме равна 0,84 (100%), тогда 0,52 составит X, $X = (0,52 \times 100) / 0,84 = 61,9\%$. Следовательно, альбумины составляют 61,9%.

Подобным же образом рассчитывают процентное содержание всех остальных фракций. Полученный ответ выражают в относительных процентах.

Следует отметить, что более правильным считается выражение результатов не в относительных, а в абсолютных процентах (г/л). К нему можно прийти, если сумму экстинций всех фракций отнести к концентрации общего белка сыворотки крови, тогда, пользуясь аналогичным

расчетом, легко найти действительную концентрацию альбуминов и всех подфракций глобулинов.

Пример. Общее количество белка в сыворотке крови 82 г/л. Сумма экстинций всех фракций составляет 0,84. На долю альбуминов приходится 0,52 ед оптической плотности. Если $E=0,84$ соответствует 82 г/л, то $E=0,52 \cdot X$. Отсюда: $X=(82 \times 0,52)/0,84=50$ г/л; т.е. концентрация альбуминов в сыворотке крови равна 50 г%.

Нормальное соотношение белковых фракций в сыворотке крови:

альбумины	-	3,2—5,5 г/100 мл	32—55 г/л	(56—66%)
глобулины	α_1 -	0,1—0,3 г/100 мл	1—3 г/л	(3—6%)
	α_2 -	0,6—1,0 г/100 мл	6—10 г/л	(7—10%)
	β -	0,7—1,1 г/100 мл	7—11 г/л	(7—12%)
	γ -	0,8—1,6 г/100 мл	8—16 г/л	(13—19%)

Клинико-диагностическое значение: Повышение всех фракций может наблюдаться при гипогидратации или обезвоживании, снижение всех фракций — при массивной потере белка через кишечник (например, при гастроэнтеропатиях).

Содержание альбуминов повышается при: 1) избыточном введении альбумина; 2) состояниях, сопровождающихся гипогидратацией.

Содержание альбуминов понижается при пониженном синтезе и повышенном катаболизме: врожденная анальбуминемия, недостаток белка в питании, нарушение всасывания, кишечная непроходимость, диффузное поражение печени (цирроз, гепатоцеребральная дистрофия, острый и подострый некроз паренхимы печени, хронический активный гепатит), ревматическая лихорадка, кахексия, карциноматоз, панкреатит, коллагенозы.

В сыворотке крови увеличение содержания альбумина наблюдается после длительного наложения жгута. Вертикальное положение тела вызывает гемоконцентрацию и увеличение среднего уровня альбумина на 3 г/л.

Концентрация альбумина <20 г/л сопровождается отеками. Линии Мюрке (парные, тонкие, белые полосы, расположенные поперек ногтевой пластины) появляются при длительной тяжелой гипоальбуминемии (<22 г/л).

Содержание α_1 -глобулина повышается при острых, подострых и хронических воспалительных процессах, не-

которых злокачественных опухолях. Понижается при: дефиците α_1 -антитрипсина, гипо- α_1 -липидемии, в несвежих пробах сыворотки.

Содержание α_2 -глобулина повышается при нефротическом синдроме, при многих подострых и хронических воспалительных заболеваниях, злокачественных опухолях, в стадии восстановления после термических ожогов. Понижается при сахарном диабете, иногда при панкреатите.

Содержание γ -глобулина повышается при поликлональных гаммапатиях: хронических заболеваниях печени, хронических инфекциях, некоторых аутоиммунных заболеваниях; моноклональных гаммапатиях: миеломная болезнь, макроглобулинемия.

Понижение: физиологическое — у детей в возрасте 3 — 4 месяцев, врожденная гипогаммаглобулинемия.

Примечания. 1. Широко применяется проведение электрофореза белков сыворотки крови на ацетилаццеллюлозных пленках. Замена ими бумажных полос позволяет сократить время электрофоретического деления белков сыворотки крови с 7—20 часов до 1—1,5 часов. При нанесении 0,001—0,002 мл сыворотки выявляются до 8, резко очерченных фракции (преальбумины, альбумин, три фракции γ -глобулинов).

2. Определение белковых фракций методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле. Данным методом можно получить несколько десятков фракций белков. Трудности возникают при идентификации белков.

3. При отсутствии в лаборатории аппарата для электрофореза можно использовать метод, основанный на осаждении белковых фракций нейтральными солями, с последующим фотоэлектроколориметрическим определением степени мутности растворов (турбидиметрический метод).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГАПТОГЛОБИНА

Гаптоглобин (Hb) играет важную роль в обменных процессах и принимает активное участие в защитных механизмах организма. Содержание его в сыворотке крови динамично отражает функциональное состояние печени. Все известные для определения содержания гаптоглобина в крови методы можно разделить на две группы — косвенные и прямые. Косвенные методы основаны на свойстве гаптоглобина взаимодействовать с гемоглобином, образуя с ним бильный комплекс. Связывание гемоглобина гаптоглобином приводит к изменению свойств и структуры белков, что и используется при определении концентрации Hb. К прямым методам определения концентрации гап-

глобина относится иммунологический метод, который основан на реакции Hb с антителами, полученными против него, с последующим измерением нефелометрическим способом и радиальной иммунодиффузией образованного комплекса Hb-антитело.

Чаще используются косвенные методы. К ним относятся пероксидазный, спектрофотометрический, риваноловый методы, гельфильтрация и электрофорез на различных носителях.

2.5. ПЕРОКСИДАЗНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГАПТОГЛОБИНА

Принцип. В основу метода положено свойство гаптоглобина существенно увеличивать пероксидазную активность гемоглобина после его связывания в Hp- Hb- комплекс, особенно в кислой области pH.

Реактивы. 1. Гваяколовый реактив. 1,86 г гваякола растворить в 400 мл воды, содержащей 50 мл ледяной уксусной кислоты, pH раствора довести до 4,0 с помощью 0,1 M водного раствора едкого натрия. Общий объем 500 мл.

2. Раствор метгемоглобина. К водному раствору гемоглобина (3,3 г/л) добавить равный объем 0,4 mM раствора феррицианида калия. Раствор метгемоглобина разбавить до концентрации $0,05 \pm 0,004$ mM. Для метHb человека этот раствор дает следующие значения поглощения % 578 нм — 0,219, 562 нм — 0,218, 542 нм — 0,335. Раствор метгемоглобина стабилен в течение почти полугода при -20°C .

Перекись водорода. $0,04 \pm 0,001$ n. Раствор перекиси водорода необходимо готовить непосредственно перед использованием. Точную концентрацию исходного концентрированного раствора перекиси водорода следует устанавливать методом перманнометрии еженедельно.

Подготовка пробы. Для превращения всего гаптоглобина сыворотки в Hp- Hb- комплекс необходимо смесь равных количеств сыворотки и стандартного раствора метHb инкубировать при 37°C в течение 30 минут. В качестве контрольного раствора используется смесь равных количеств метHb и физиологического раствора, инкубированная в тех же условиях.

Ход определения. 0,2 мл смеси сыворотки и метHb внести в пробирку, содержащую 2,8 мл гваякологового реактива и термостатированную при 20°C . К реакционному раствору добавить 3 мл 0,04 n раствора перекиси водорода,

затем перенести его в кювету спектрофотометра. Измерение при 470 нм начинать через 30 секунд после добавления перекиси водорода и продолжать в течение 10 минут, определяя поглощение раствора через каждые 30 с, если измерение проводится не на сканирующем спектрофотометре. Построить график зависимости поглощения раствора от времени. За единицу активности принимается скорость превращения гваякола в тетрагваякол в присутствии Нр-Нб- комплекса в начальный момент реакции, которая определяется по тангенсу угла наклона на графике.

Концентрация гаптоглобина в исследуемом растворе определяется по калибровочному графику, который строится по данным, полученным при измерении пероксидазной активности стандартных растворов очищенных препаратов гаптоглобина. Такие растворы гаптоглобина, сохранившие свою функциональную активность, не всегда доступны, поэтому калибровочный график можно построить, используя смесь сывороток от 10 здоровых индивидуумов. Вначале определяют гемоглобинсвязывающую способность этой смеси сывороток. Для этого определяют пероксидазную активность растворов (не менее 5), состоящих из одного и того же количества метНб известной концентрации и увеличивающегося количества сыворотки. По полученным значениям строят график зависимости пероксидазной активности от количества сыворотки. На основании этого определяют гемоглобинсвязывающую способность 1 или 100 мл сыворотки. Концентрацию Нб рассчитывают, исходя из того, что 1 моль метгемоглобина связывает 1 моль гаптоглобина. Затем определяют пероксидазную активность реакционных растворов, состоящих из точного количества метНб и увеличиваемого количества стандартной смеси сывороток, с известной концентрацией гаптоглобина. Строят график зависимости пероксидазной активности от концентрации Нр, которую выражают в виде гемоглобинсвязывающей способности. Этот график используется как калибровочный.

Примечание. Гемолизированные сыворотки дают завышенные результаты.

Нормальные значения. Суммарные гаптоглобины: 83—267 мг/100 мл (0,83—2,67 г/л). Новорожденные: 0—20 мг/100 мл (0 — 0,2 г/л).

Влияющие факторы: прием андрогенов (анаболических стероидов) приводит к повышенным результатам.

Клиническое значение. Значения гаптоглобина служат чувствительным показателем гемолитических состояний. Острофазовый ответ при воспалительных заболеваниях и злокачественных опухолях лучше выявляется при серийном определении гаптоглобина и других белков «острой фазы».

Резкое повышение наблюдается при ожогах, нефротическом синдроме.

Умеренное повышение отмечено при острых и хронических воспалительных состояниях, при инфекции (сепсис), злокачественных образованиях, некрозе тканей.

Снижение синтеза: при тяжелом поражении паренхимы печени (плохой прогноз) и наследственное.

2.6. ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГАПТОГЛОБИНА

Метод основан на различии электрофоретической подвижности Нр-Нб-комплекса и свободного гемоглобина.

Для электрофореза используются различные носители: крахмальный гель (Smithies, 1955), агаровый гель (Огоновский, 1966), целлюлозно-ацетатные полоски (Pantlitschko, Weipfle, 1968), полиакриламидный гель (Zwaan, Maki, 1968). Фореграммы окрашиваются реактивом, специфически проявляющем гемсодержащие белки. Концентрация гаптоглобина определяется одним из следующих способов: денситометрированием электрофореграммы или элюированием окрашенных фракций, соответствующих Нр-Нб-комплексу и гемоглобину, вычислением отношения количества связанного в комплекс Нр-Нб гемоглобина к свободному белку, определяя количество Нб, требуемое для полного насыщения всего гаптоглобина сыворотки. Для этого проводится электрофорез одновременно нескольких смесей, содержащих равные количества одной и той же сыворотки и разные количества гемоглобина. Появление свободного гемоглобина на фореграмме свидетельствует о полном насыщении всего гаптоглобина сыворотки.

2.7. КАЧЕСТВЕННЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГАПТОГЛОБИНА

Качественный метод определения гаптоглобина в сыворотке крови заключается в электрофоретическом разделении на крахмальном, полиакриламидном или агаровом гелях. Фореграммы окрашиваются на гемсодержащие компоненты, при этом проявляются Нр-Нб-комплекс и свободный гемоглобин. Электрофоретическая подвижность гемоглобина намного выше, чем Нр-Нб-комплекса. Ок-

раска фореграмм проводится следующим образом: гели после электрофореза погружают в 1% раствор бензидина в 10% уксусной кислоте. На электрофореграмме появляются голубые полосы, интенсивность которых зависит от концентрации Hb и H_r-Hb. Однако окраска нестойкая и быстро исчезает особенно при низком содержании гаптоглобина. Более прочную окраску дает фиксация в 0,001% растворе амидо-черного. Для этого гели после окраски бензидином быстро промывают дистиллированной водой и опускают в 0,001% раствор амидо-черного.

Для окрашивания H_r-Hb-комплекса можно использовать также 0,1% раствор о-дианизидина в 0,5% уксусной кислоте.

Пробы коллоидоустойчивости белков сыворотки крови

В клиничко-диагностических лабораториях широко используются методы, при которых простыми коллоидными реакциями косвенно обнаруживаются изменения в составе белков сыворотки крови. Все эти методы основаны на изменениях, наступающих в коллоидной устойчивости сыворотки, поэтому и получили известность под названием проб коллоидной устойчивости. Эти пробы, благодаря несложной технике их постановки и достаточной информативности, получили широкое распространение в диагностической практике.

2.8. ТИМОЛОВАЯ ПРОБА

Принцип. При взаимодействии сыворотки с тимолово-вероналовым буфером появляется помутнение вследствие образования глобулино-тимоло-липидного комплекса.

Реактивы.

1. 10% спиртовой раствор тимола. 10,0 г очищенного тимола растворяют в 96° этиловом спирте в мерной колбе на 100 мл.

Очистка тимола. 100,0 г тимола растворяют в 100 мл 96° этилового спирта, фильтруют. К фильтрату прибавляют 1 л холодной дистиллированной воды, сильно встряхивают и оставляют стоять 20 минут. Затем фильтруют; кристаллы, оставшиеся на фильтре, промывают 2 раза холодной дистиллированной водой, сушат — вначале на фильтровальной бумаге, потом — в течение 2—3 дней в эксикаторе над безводным хлористым кальцием до постоянного веса.

2. Буферный раствор. 2,76 г вероната (точно) и 2,06 г мединала (вероната натрия) доводят до 1 л дистиллиро-

нанной водой. Хранить в холодильнике; при появлении осадка раствор не годен к употреблению.

3. Тимолово-вероналовый буфер рН 7,55-7,6. В мерной колбе на 100 мл смешивают 80 мл буферного раствора и 1 мл 10% спиртового раствора тимола, встряхивают и доливают буферным раствором до метки. Проверяют рН.

4. Стандартный раствор:

а) раствор хлористого бария. 1,175 г хлористого бария $BaCl_2 \cdot xH_2O$ доводят до 100 мл дистиллированной водой;

б) 0,2 н серная кислота;

в) суспензия сернокислого бария: 3 мл хлористого бария наливают в мерную колбу на 100 мл и доводят до метки 0,2 н серной кислотой при температуре +10°C (при этой температуре размеры частиц преципитированного сернокислого бария дают относительно стабильный результат). Суспензию сернокислого бария готовят перед употреблением.

Ход определения.

К 4,5 мл тимолово-вероналового буферного раствора прибавляют 0,075 мл сыворотки, оставляют стоять 30 минут и затем измеряют при длине волны 630—690 нм (красный светофильтр) против тимолово-вероналового буфера, в кюветках с толщиной слоя 10 мм. Реакцию проводят при комнатной температуре.

Расчет ведется по калибровочному графику.

Построение калибровочного графика. Из стандартного раствора сернокислого бария (суспензии) готовят разведения, соответствующие единицам помутнения по Shank и Hoagland (S-H) (см. табл.2.4).

Таблица 2.4

Растворы для построения калибровочного графика

Суспензия $BaSO_4$ (мл)	0,2 н H_2SO_4 (мл)	Единицы помутнения (S-H)
1,35	4,65	5
2,7	3,3	10
4,05	1,95	15

Стандартные растворы смешивают, хорошо встряхивают и тотчас же измеряют при длине волны 630—690 нм в кюветках с толщиной слоя 10 мм против воды.

Норма — 0—4 ед (S-H).

Клинико-диагностическое значение. Тимоловая проба выше нормы (положительная) отмечается при гепатитах

различной этиологии, хронических инфекционных заболеваний (туберкулезе, бруцеллезе), коллагенозах, т.е. заболеваниях, сопровождающихся диспротеинемией с увеличением γ -глобулинов.

При механических желтухах, неосложненных вторичным гепатитом, тимоловая проба остается в пределах нормы (отрицательная).

2.9. СУЛЕМОВО-ОСАДОЧНАЯ РЕАКЦИЯ (СУЛЕМОВАЯ ПРОБА ПО ГРИНСТЕДУ)

Принцип. Сулема в присутствии мелкодисперсных коллоидов (белков) образует коллоидный раствор солей ртути. Нарушение дисперсности белковых фракций сыворотки крови вызывает осаждение грубодисперсных частиц.

Реактивы. 1. 0,1 % раствор сулемы. Готовят из кристаллической сулемы, растворяя соль в горячей дистиллированной воде. 2. 0,85% раствор хлористого натрия.

Ход определения. К 0,5 мл негемолизированной сыворотки крови добавляют 1 мл физиологического раствора и титруют 0,1 % раствором сулемы до появления стойкого помутнения. Результаты сулемовой реакции выражают количеством мл раствора сулемы, израсходованного на титрование.

Нормальные значения. У здоровых людей на титрование идет 1,6 — 2,2 мл сулемы. Если на титрование уходит меньшее количество сулемы, реакция расценивается как положительная.

Клинико-диагностическое значение. Повышена при: заболеваниях печени, особенно циррозах, при хроническом нефрите, нефрозе, пневмонии, туберкулезе легких, миеломной болезни, инфекционных заболеваниях и др.

2.10. ПРОБА ВЕЛЬТМАНА

Принцип. При добавлении к сыворотке крови раствора хлористого кальция и нагревании происходит нарушение коллоидоустойчивости белков сыворотки.

Реактивы. 0,5% раствор хлористого кальция. Готовят из 10% раствора хлористого кальция ($\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), что соответствует 5% раствору безводного хлористого кальция. Точно определить вес хлористого кальция невозможно из-за его гигроскопичности; поэтому концентрацию раствора хлористого кальция определяют по относительной плотности. 5% раствор безводного хлористого кальция имеет относительную плотность 1,040.

Для приготовления 10% раствора хлористого кальция 99,14 г $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ доводят до 1 литра дистиллированной водой и проверяют относительную плотность, доводя до 1,040. Из полученного раствора путем разведения в 10 раз готовят 0,5% раствор хлористого кальция.

Приготовление 0,5% раствора из ампульного 10% раствора хлористого кальция. Если относительная плотность ампульного раствора хлористого кальция — 1,040, то 0,5% раствор готовят разведением ампульного раствора в 10 раз.

Ход определения. К 0,1 мл сыворотки прибавляют 4,9 мл воды. Перемешивают путем опрокидывания пробирки и прибавляют 0,1 мл 0,5% хлористого кальция, встряхивают и нагревают пробирку над пламенем до однократного закипания смеси. Пробирку смотрят на свету: если хлопьев нет, то в эту же пробирку добавляют еще 0,1 мл хлористого кальция и вновь кипятят. Процедуру повторяют, пока не выпадут хлопья.

Результат оценивают, подсчитывая общее количество пошедшего на реакцию хлористого кальция.

В норме коагуляция наступает при прибавлении 0,4—0,5 мл хлористого кальция.

Примечание. Сыворотка должна быть негемолизированной.

Клинико-диагностическое значение. Если в ходе исследования затрачивается менее 0,4 мл раствора хлористого кальция, то это относят за счет повышения содержания γ -глобулинов в сыворотке крови, что характерно, прежде всего, для хронических заболеваний — цирроза, малярии, хронической пневмонии, плеврита, туберкулеза легких.

Если затрачивается больше 0,5 мл раствора хлористого кальция, то это связано с увеличением α_1 - и α_2 -глобулинов сыворотки (появлением в крови белков «острой фазы» — СРБ, гаптоглобина). Отмечается при острых воспалительных процессах — активная фаза ревматизма, экссудативный туберкулез легких, нефриты, нефрозы, острые инфекционные заболевания, злокачественные опухоли в стадии метастаз, перитонит, инфаркт миокарда.

2.11. ОСАДОЧНАЯ РЕАКЦИЯ НА РАК — ОРР (МЕТОД В.П.КОРОТКОРУЧКО)

Принцип. Под действием соляной и азотной кислот определенной концентрации белки сыворотки крови здоровых людей подвергаются обратимой денатурации, а парaprотеинемический белок сыворотки крови раковых боль-

ных — необратимой денатурации. В последнем случае в реакционной смеси образуются белковые коагулянты, что проявляется стойкой мутностью различной степени интенсивности.

Реактивы.

1. Раствор соляной кислоты с относительной плотностью при 20° С—1,0039—1,0055. Можно готовить из фиксаналя HCl (0,1 г-э), растворив содержимое ампулы дистиллированной водой в мерной колбе на 500 мл. Готовность реактива определяют, измеряя относительную плотность раствора ареометром.

2. Раствор азотной кислоты с относительной плотностью при 20° С 1,0450—1,0575. Готовность реактива определяют с помощью ареометра или, что еще лучше — пикнометра.

Ход определения. В химическую пробирку вносят 0,1 мл сыворотки крови, добавляют туда 0,5 мл соляной кислоты, легко встряхивают до полного перемешивания. Через 30 секунд добавляют 0,2 мл азотной кислоты, слегка встряхивают и через 20 секунд в реакционную смесь вносят 1,5 мл дистиллированной воды. Снова встряхивают до полного перемешивания и оставляют в штативе на 1—3 минуты, после чего определяют результат реакции. Временные промежутки, указанные в методике, необходимо строго выдерживать!

Оценка результатов. Можно проводить визуально в отраженном свете, либо с помощью фотоэлектроколориметра. У здоровых людей через 1—3 минуты реакционная смесь освобождается от мутности и становится прозрачной за счет обратимости денатурации белков, что отмечается как отрицательная ОРР.

У больных раком в реакционной смеси наблюдается стойкая мутность различной степени выраженности — от легкой опалесценции до крупного белкового коагулянта. Это означает положительную ОРР. Визуальную оценку можно заменить оценкой при помощи фотоэлектроколориметра. Колориметрирование выполняется как и любое нефелометрическое исследование при красном светофильтре (590 — 690 нм) в кюветах с толщиной слоя 3 мм. Полученную величину экстинкции рекомендуется умножить на коэффициент "100" и результат реакции выражать в условных единицах (у.е.), при этом возможно 5 типов реакции, как и при визуальной оценке (табл. 2.5).

Типы реакций ОРР

№	Тип реакции	Экстинция (Е)	Условные единицы
1	Отрицательная (-)	0,00—0,02	0—2
2	Сомнительная (+)	0,03—0,04	3—4
3	Слабоположительная (++)	0,05—0,06	5—6
4	Положительная (+++)	0,07—0,10	7—10
5	Резко положительная (++++)	0,11 и выше	11 и выше

Норма.**Отрицательная ОРР.**

Клинико-диагностическое значение. В крови раковых больных Короткоручко В.Н. обнаружил белок, который не выявляется в крови здоровых людей и людей с различными незлокачественными заболеваниями. То есть в данном случае имеет место патология со стороны белков крови по типу парапротеинемии. Метод обнаружения этого белка получил название осадочная реакция на рак (ОРР), а сам белок назван белком, положительно реагирующим в осадочной реакции на рак (БПР-ОРР), или белком, характерным для злокачественного роста. Было установлено, что данный белок по иммунологическим и физико-химическим параметрам принадлежит к иммуноглобулинам класса G.

Следует иметь в виду, что ОРР не является абсолютно достоверной. ОРР с сывороткой крови больных с неоперабельными формами рака, как правило, отрицательная. Ложноположительная ОРР нередко сопутствует целому ряду тяжелых хронических заболеваний: циррозу печени, туберкулезу, ревматизму. Ее могут спровоцировать серотерапия, вакцинация, химио- и рентгенотерапия. Поэтому при интерпретации результатов ОРР всегда необходимо соотносить полученные лабораторные данные с клиническим состоянием больного. Без этого трактовка ОРР несостоятельна!

Примечание. 1 Кровь для исследования берут натощак после двухдневной подготовки больного. Перед исследованием необходимо исключить прием антибиотиков, барбитуратов, анальгетиков, алкогольных напитков, серотерапии, вакцинации, химио- и рентгенотерапии.

2. Гемолизированные и липемические сыворотки для постановки реакции не пригодны.

2.12. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФИБРИНОГЕНА (МЕТОД СТЕРЛЕНДА)

Принцип. Тепловая коагуляция разведенной плазмы крови вызывает различной степени помутнение, которое прямо пропорционально содержанию в ней фибриногена.

Исследуемый материал. Плазма (цитрат натрия). Проба стабильна несколько месяцев, если хранить при температуре -20°C .

Реактивы. 1. Хлористый натрий, 10% раствор.

2. Стандартный раствор сульфата бария. Для приготовления его растворяют 1,15 г $\text{BaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ в 100 мл воды; 3 мл данного раствора переносят в колбу объемом 100 мл и доводят объем водой до метки. Мутность этого раствора принимается за 20 единиц.

Ход определения. Берут две пробирки, в каждую из которых вносят 0,2 мл плазмы, полученной из оксалатной или гепаринизированной крови и 3 мл 10% раствора хлористого натрия, затем смешивают. Одну пробирку помещают в водяную баню при температуре 56°C на 15 минут. Затем охлаждают смесь до комнатной температуры. После этого смесь колориметрируют на спектрофотометре в кювете объемом 1 мл на волне 650 нм или на ФЭКе (красный фильтр). Смесь во второй пробирке, не подвергшейся нагреванию, служит контролем.

Единица мутности стандартного раствора сульфата бария (1 единица Кункеля) эквивалентна 42,8 мг фибриногена в 100 мл плазмы крови.

Расчет производится по формуле:

$$\text{фибриноген в мг\%} = \frac{v_s + v_p}{v_p} \times \frac{E_1 \times u}{E_k},$$

v_s — объем плазмы в смеси; v_p — объем солевого раствора в смеси; E_1 — показатель пробы; E_k — показатель стандарта; u — величина стандарта в единицах Кункеля.

Когда уровень фибриногена превышает 20 ед. или 856 мг%, определение повторяют с разведением 0,1 мл плазмы в 3 мл физиологического раствора. Если помутнение незначительное, то определение повторяется с разведением 0,2 — 1 мл плазмы в 3 мл физиологического раствора. Соответственно вносят изменения в расчет.

Нормальные величины:

Взрослые	200—400	мг/100 мл	2,00—4,00	г/л
Новорожденные	125—300		1,25—3,00	

Диагностическая значимость. Показатель повышен при: гепатите, миеломной болезни, раке, уремии, беременности, менструации, состоянии после хирургических операций, синдроме ДВС (стадия гиперкоагуляции), воспалительных процессах (ревматизм, пневмония, туберкулез), нефрозе, ожогах.

Понижен при: заболеваниях печени, наследственной фибриногемии.

Примечание. На тромбиновое время влияет присутствие продуктов расщепления фибрина или гепарина. При высоких уровнях фибриногена оно не является точным показателем.

“Средние молекулы” как показатель интоксикации при патологических состояниях

“Метаболическая интоксикация”, развивающаяся при патологических процессах, определяется различными биохимическими сдвигами, накоплением естественных и модифицированных метаболитов. Среди них определенное место занимают метаболиты средней молекулярной массы — “молекулы средней массы” (МСМ) или “среднемолекулярные пептиды” (СМП). СМП, являясь компонентами биологических жидкостей, молекулярная масса которых составляет 500 — 5000 дальтон, обладают четко выраженной биологической активностью. Изучение у больных острыми и хроническими вирусными гепатитами, СПИДом, острым панкреотитом, нефрологическими заболеваниями и др. показало, что концентрация СМП в биологических жидкостях (крови, моче, желчи) зависит от остроты процесса и характера проводимой терапии.

Для количественного определения содержания СМП разработаны хроматографические методы, позволяющие выделить значительное количество фракций, составляющих СМП. Классическими для выделения СМП считаются сочетанные методы ультрафильтрации с гель-хроматографией на сефадексах G-15, G-25, G-50, позволяющих получить 7 — 10 пиков, которые обозначены порядковыми номерами по мере снижения молекулярной массы.

2.13. СКРИНИНГОВЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СМП (М-Д.Н.И. ГАБРИЭЛЯН, 1982)

Исследуемый материал. Сыворотка крови.

Реактивы. 1. 10% раствор ТХУК (трихлоруксусная кислота).

Ход определения. Сыворотку крови обрабатывают 10%

раствором ТХУК в соотношении 2:1. Смесь центрифугируют при скорости 3000 об/мин в течение 30 минут. Детекцию надосадка, освобожденного от грубодисперсных белков, осуществляют после предварительного разведения, при котором к 0,5 мл надосадочной жидкости добавляют 4,5 мл дистиллированной воды.

Измерение проводят на спектрофотометре в ультрафиолетовом свете при длине волны 254 нм. Уровень СМП выражают в единицах, количественно равных показателям экстинкции.

Нормальное значение. До 0,240 ед.

Примечания. 1. Методическая простота выполнения, стабильность получаемых результатов и экономическая эффективность использования данного метода, позволяет рекомендовать определение СМП для широкого практического применения, в частности для проведения профилактических обследований населения.

2. Увеличение содержания СМП свыше 0,350 ед. определяется у больных с неблагоприятным течением заболевания.

3. Увеличение содержания СМП у нефрологических больных, определяемое на фоне незначительных изменений традиционных лабораторных показателей, позволяет выделить группу риска, требующую активного проведения соответствующих лечебных мероприятий.

4. Присутствующие в надосадочной жидкости вещества небелковой природы, поглощающие свет при длине волны 254 нм, вносят искажения в истинные значения концентрации СМП.

2.14. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ СМП В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И МОЧЕ

Исследуемый материал. 1. Сыворотка крови. У больных берут натощак 2 мл крови и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 минут. Сыворотку хранят при 2—5°C до момента использования.

2. Моча. Собирается утренняя порция мочи.

Реактивы: 1. 20% раствор ТХУК (к 20 г ТХУК добавляют 80 мл дистиллированной воды). Раствор хранится при 4°C в посуде с притертой пробкой.

2. Биуретовый реактив. *Раствор А:* 2% раствор карбоната натрия в 0,1%-ом растворе гидроксида натрия; *Раствор Б:* 0,5%-ный раствор медного купороса в 1%-ом растворе цитрата натрия. *Реактив С:* 50 мл реактива А+1,0 мл реактива Б.

3. Реактив Фолина (приготовление указано в методах определения общего белка).

Ход определения. Фотоэлектроколориметр перед определением включают в соответствии с инструкцией по эксплуатации. Все растворы перед использованием выдерживают при комнатной температуре не менее 10 минут.

К 0,2 мл исследуемой сыворотки или мочи добавляют 0,2 мл 20% -ой ТХУК и центрифугируют в течение 20 минут при 4000 об/мин. Аликвоту супернатанта в объеме 0,1 мл разбавляют 0,3 мл дистиллированной воды и определяют количество пептидного материала по реакции Лорури (т.е. к 0,4 мл образца добавляют 2 мл реактива С). После перемешивания пробирки оставляют при комнатной температуре на 10 минут, затем добавляют по 0,2 мл реактива Фолина. Пробы тщательно перемешивают и оставляют на 10 минут в бане с температурой 56°C. Оптическую плотность измеряют при длине волны 750 нм.

Расчет. Концентрацию пептидов определяют по стандартной кривой, построенной для альбумина, взятого в количестве от 10 до 1000 мкг.

Нормальные значения. $10,5 \pm 1,5$ мкг.

Диагностическая значимость. Содержание СМП в крови и моче повышается при патологии почек, при вирусных и хронических гепатитах, остром панкреатите, сепсисе, перитоните, инсульте.

НЕБЕЛКОВЫЕ АЗОТИСТЫЕ КОМПОНЕНТЫ КРОВИ

Помимо белков, плазма крови содержит небелковые азотсодержащие соединения, которые не осаждаются веществами, вызывающими преципитацию белков. Они образуются при физиологическом распаде белков, а при патологических состояниях этот процесс усиливается. Азот небелковых азотсодержащих веществ называется остаточным азотом крови (ОА). Происхождение названия "остаточный азот" связано с тем, что оно относится к азотистым веществам, остающимся в плазме крови после осаждения белков трихлоруксусной кислотой. Следует помнить, что при различных способах осаждения белков, целиком или частично увлекаются также некоторые компоненты небелкового азота, поэтому состав и количество его могут быть различными в зависимости от способа осаждения белков. Чтобы избежать этих различий, нужно называть остаточным азотом тот небелковый азот, который остается после осаждения белков трихлоруксусной кислотой. Почти такой же результат дает осаждение вольфрамовой кислотой и уранилацетатом.

Небелковые азотсодержащие соединения крови вызывают больший клинический интерес, чем белки плазмы. Наиболее весомой составной частью ОА является азот мочевины. В норме он составляет приблизительно 50 %

всего ОА. У здорового человека колебания в содержании небелкового азота крови незначительны и, в основном, зависят от количества поступающих с пищей белков. При ряде патологических состояний содержание небелкового азота в крови повышается. Это состояние носит название азотемии. Азотемия, в зависимости от причин, вызвавших ее, подразделяется на ретенционную и продукционную.

Ретенционная азотемия наступает в результате недостаточного выделения с мочой азотсодержащих продуктов при нормальном поступлении их в кровяное русло. Она может быть почечной и внепочечной.

Продукционная азотемия возникает при избыточном поступлении азотсодержащих веществ в кровь, как следствие усиленного распада тканевых белков. Отмечается при лейкозе, обширных травмах, ожогах, инфекциях, кишечной непроходимости и других патологических состояниях, не связанных с функцией почек.

Процессы дезаминирования, переаминирования, декарбонирования аминокислот протекают внутри клетки, им подвержены аминокислоты, не задействованные в ходе биосинтеза белка. Часть из них экзогенного происхождения, другая часть аминокислот крови образуется в результате распада тканевых белков.

Дезаминирование — это процесс необратимого отщепления аминогруппы от аминокислоты с образованием аммиака и альфа-кетокислоты. Процесс реализуется при участии ферментов дегидрогеназ, является основным способом расщепления аминокислот в организме.

Переаминирование — это процесс обратимого переноса аминогруппы аминокислот на кетокислоты. Главной осью, вокруг которой происходят процессы переаминирования, является альфа-кетоглутаровая кислота. Она является акцептором аминогрупп от различных аминокислот, а сама при этом превращается в глутаминовую кислоту. Почти четверть содержащихся в плазме аминокислот составляют глутаминовая кислота и глутамин.

Катализируются реакции переаминирования трансаминазами (амино-трансферазами). Из всех трансаминаз наиболее хорошо изучены и получили широкое применение в клинической диагностике аспаратаминотрансфераза (АСТ) и аланинаминотрансфераза (АЛТ). АСТ катализирует обратимый перенос аминогруппы с аспарагиновой кислоты на альфа-кетоглутаровую, при этом образуются глутаминовая и щавелевоуксусная кислоты. АЛТ обеспечивает переаминирование в реакциях с участием

аминокислот, альфа-кетоглутаровой, глутаминовой и пировиноградной кислот.

Кратко охарактеризуем отдельные небелковые азотистые компоненты крови.

Мочевина — синтезируется в печени из аммиака при участии аминогруппы аспарагиновой кислоты с поглощением энергии. В ходе этого синтеза обезвреживается аммиак — токсичное вещество для организма. Физиологические колебания мочевины в крови лежат в пределах 2,5—8,3 ммоль/л.

В патологии часто встречается повышение концентрации мочевины в крови, что, в основном, связано с нарушением выделительной функции почек. При этом, по сравнению с другими компонентами, концентрация мочевины увеличивается раньше и в большей мере. Если в норме количество азота мочевины в ОА составляет около 50%, то при патологии, и особенно, в поздние сроки хронической почечной недостаточности, доля азота мочевины в ОА увеличивается и может достигать 90%.

Значительно реже встречается снижение азота мочевины ОА — при избыточном поступлении продуктов распада белков, когда над мочевиной преобладают остальные фракции ОА, особенно аминокислоты, либо при декомпенсированных поражениях печени, сопровождающихся нарушением синтеза мочевины.

Процентное содержание азота мочевины (АМ) во фракциях ОА — *urea ratio* (U.R.) можно использовать как диагностический показатель, который позволяет оценить степень тяжести заболевания. Рассчитывается U.R. следующим образом:

$$U. R. = \frac{AM \times 100\%}{OA}$$

В норме этот показатель составляет 43—48, если расчеты выполняются в мг %. Или 10—14 при расчетах в ммоль/л. Азот мочевины, входящий в U.R., легко рассчитать, зная, что азот мочевины от общего количества мочевины всегда составляет 46,6%, что обусловлено химической формулой мочевины $CO(NH_2)_2$. Ее молекулярная масса составляет 60 у.е., а двух атомов азота в молекуле мочевины — 28 у.е.

Например, рассчитать U.R. у больного с концентрацией мочевины в крови 16,0 ммоль/л и остаточного азота — 58,0 ммоль/л. Рассчитать азот мочевины. Он рассчитывается по простой арифметической пропорции:

$$\frac{16,0 \text{ ммоль/л} \cdot 100\%}{x - 46,6\%}$$

$$\text{Отсюда } X = \frac{16,6 \times 46,6}{100} = 7,46 \text{ ммоль/л}$$

2. Рассчитать U.R.

$$U.R. = \frac{7,46 \times 100\%}{58,4} = 12,86\%$$

В данном случае результат в пределах нормы.

Креатин — поступает в организм с мясной пищей, а также способен синтезироваться в почках и в печени, откуда он с током крови поступает в мышечную ткань. Здесь креатин, фосфорилируясь, превращается в креатинфосфат, а из последнего образуется креатинин. В синтезе креатина участвуют три аминокислоты: аргинин, глицин и метионин. В норме содержание креатина в сыворотке, плазме крови составляет 76—114 мкмоль/л, в моче в норме креатин отсутствует. Креатин выполняет важную физиологическую роль в организме — соединяясь с остатком фосфорной кислоты, образует креатинфосфат, богатый макроэргическими связями, который в мышечной ткани является источником энергии, обеспечивающей мышечные сокращения. Появление креатина в моче у детей связано с увеличенным его синтезом, опережающем развитие мускулатуры. Некоторые исследователи к физиологическим явлениям относят и креатинурию стариков, которая возникает как следствие атрофии мышц и неполного использования образующегося в печени креатина (Шамрай Е.Ф., Пашенко А.Е., 1970). Однако, как диагностический тест в лабораторной практике используется крайне редко. Гораздо чаще применяется производное креатина, образующееся при его дегидратации — креатинин.

Креатинин — производное креатина, конечный продукт его метаболизма. Содержание креатинина в сыворотке у здоровых людей составляет: у женщин 44—97 мкмоль/л, у мужчин — 44—115 мкмоль/л. В суточной моче в норме концентрация креатинина колеблется от 4,4 до 17,6 ммоль/сут (0,5—2,0 г).

Исследование креатинина широко используется в клинической практике, во-первых, как один из биохимических показателей для диагностики гиперазотемий; во-вторых, как клиренсовый показатель, то есть показатель фильтрационной способности почек, характеризующий степень

очистения определенного объема крови, проходящего через почки от какого-либо вещества в одну минуту. Креатинин для этих целей является наиболее удобным метаболитом, поскольку относительно почек он выступает как "беспороговое" вещество, т.е. креатинин в норме полностью фильтруется клубочковым аппаратом нефрона и абсолютно не подвергается реабсорбции в канальцевой части нефрона.

Для получения адекватных результатов в исследовании клиренса по эндогенному креатинину, очень существенным моментом является правильная подготовка больного и правильный сбор материала для анализа. По классической схеме (проба Реберга) обследуемый натощак выпивает 500 мл воды или слабого чая и сразу мочится, эту порцию мочи выливают. Отмечают время мочеиспускания и ровно через 1 час полностью собирают мочу. Объем выделенной мочи измеряют и рассчитывают "минутный диурез"

$$\frac{V_{\text{мочи}}}{60 \text{ мин}} = V \text{ мочи за 1 мин.}$$

В середине этого часа берут кровь из вены. В крови и моче определяют концентрацию креатинина. Рассчитывают клиренсовые показатели по формулам:

$$1. F \text{ (мл/мин)} = \frac{C_m}{C_k} \cdot V$$

$$2. R(\%) = \frac{F - V}{F} \cdot 100, \text{ где}$$

F — клубочковая фильтрация,

C_m и C_k — концентрация креатинина в моче и крови,

V_m — минутный диурез,

R — канальцевая реабсорбция.

Клубочковая фильтрация в норме составляет 80 — 120 мл/мин. Реабсорбция — 97—99%.

Мочевая кислота синтезируется в печени как конечный продукт обмена пуриновых оснований. Является основной формой выведения избытка пуринов из организма. Мочевая кислота мало растворима в воде. В крови содержится в виде натриевой соли, связанной с белком. Этот комплекс стабилизирует мочевую кислоту, однако он очень чувствителен к изменениям pH среды. В кислой среде связь с белком разрушается и мочевая кислота выпадает в виде

кристаллов в ткани. В этом случае возникает заболевание, которое называется подагра. Основным лабораторным тестом, характеризующим данное заболевание, является повышение концентрации мочевой кислоты в крови — гиперуриемия. В моче содержание мочевой кислоты при этом может быть в норме.

Гиперуриемия сопровождает также все формы почечной недостаточности. Однако, для характеристики почечной патологии к исследованию мочевой кислоты в крови прибегают только в тех случаях, когда определение мочевины и креатинина дает разноречивые результаты.

В норме концентрации мочевой кислоты в сыворотке крови (фосфорновольфрамовый метод) составляет: у мужчин 0,24—0,50 мкмоль/л, у женщин — 0,16—0,44 мкмоль/л. В суточном количестве мочи — 1,6—4,8 ммоль/сут.

В заключение этого раздела следует отметить, что повышение уровня мочевой кислоты может также встречаться при сердечной декомпенсации, диабетической коме, при лейкозах, гемолитических анемиях, лечении цитостатиками и других заболеваниях, сопровождающихся усиленным распадом нуклеопротеидов.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕБЕЛКОВЫХ АЗОТИСТЫХ СОЕДИНЕНИЙ

2.15. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИННОГО АЗОТА (АЗОТА АМИНОКИСЛОТ) ПО КРАУЭЛУ

Все аминокислоты, за исключением пролина и гидроксипролина, имеют группу NH_2 в альфа-позиции. Определение аминного азота является мерой концентрации в крови всех аминокислот.

Исследуемый материал: плазма.

Реактивы. 1. NaOH , 0,2N раствор; 0,8 г NaOH растворяют в 100 мл воды.

2. Бористый натрий. 2% раствор. 2,0 г бористого натрия растворяют в 100 мл воды.

3. Бета-нафтохинон-4-сульфонат натрия, 0,5% раствор. 500 мг вещества растворяют в 100 мл воды, добавляют 2 г активированного угля и фильтруют. Раствор должен быть бледно-желтым.

4. Буферный раствор. Смешивают 100 мл 50% раствора уксусной кислоты (50 мл ледяной уксусной кислоты разводят в 50 мл воды) со 100 мл 5% раствора ацетата натрия, pH 4,5 — 5,0.

5. Тиосульфат натрия 4% раствор.

6. Стандартный раствор аминокислот, содержащий 10 мг в 100 мл аминного азота. 187,8 мг пролина, 412,8 мг глицина растворяют в 0,1 N соляной кислоте и доводят кислотой до 1 л. В раствор соляной кислоты должны быть добавлены 2,0 г бензойной кислоты.

7. 0,1% раствор фенолфталеина в этиловом спирте.

8. Вольфрамовая кислота. В день проведения исследования смешивают равные объемы 0,15 N раствор серной кислоты и 2,2% раствор вольфрамового натрия (0,15N раствор серной кислоты готовят растворением 4,17 мл концентрированной кислоты в 1 литре).

Ход определения. 0,05 мл плазмы или сыворотки крови вносят в 0,2 мл воды. Добавляют 1 мл вольфрамовой кислоты. Смешивают и центрифугируют 5 минут при 2000 об/мин. 1 мл отцентрифугированной жидкости помещают в пробирку с меткой 2 мл, добавляют 1 каплю фенолфталеина, затем 0,05 мл 0,2N NaOH. Раствор приобретает розовое окрашивание. Если необходимо, каплями добавляют NaOH до появления стойкого розового окрашивания. Затем добавляют 0,25 мл 2% раствора бромистого натрия и смешивают. рН раствора должен быть примерно 9,3. Добавляют 0,1 мл раствора бета-нафтохинон-4-сульфоната натрия. Тщательно смешивают и нагревают в течение 10 минут при температуре 100°C. Охлаждают до комнатной температуры. Добавляют 0,25 мл уксусно-кислотного буферного раствора, затем 0,25 мл раствора тиосульфата натрия. Доводят раствор до объема 2 мл водой. рН окончательного раствора должен равняться 4,0 — 5,0. Колориметрируют при длине волны 480 мкм. Контролем служит вода, обработанная таким же образом, что и сыворотка.

Стандарт. 0,05 мл стандартного раствора аминокислот, содержащего 10 мг% аминокислот, обрабатывают так же, как и сыворотку крови, добавляя 0,2 мл воды и 1 мл вольфрамовой кислоты.

Расчет производят по формуле:

аминный азот в мг/100 мл = ОП неизвестного раствора × 10 ОП стандарта.

Нормальные величины. 4,0—6,0 мг/100 мл (2,86—4,28 ммоль/л).

Диагностическая значимость. Повышено содержание при тяжелых поражениях печени, особенно при скоротечном токсическом некрозе паренхимы печени, при ожогах, шоке, после кровотечений. Понижено — при недостаточности белкового питания, при нефрозах, после введения глюкозы, инсулина, гормона роста, андрогенов.

Примечания. 1. Бета-нафтохинон-4-сульфонат натрия может медленно разлагаться в сухом виде. Поэтому при его растворении может появиться окрашивание, которое устраняется фильтрованием через активированный уголь. Реактив стоек на протяжении нескольких недель при хранении в холодильнике.

2. Использование в качестве стандарта смеси аминокислот имеет целью создание комплекса спектров поглощения аминокислот, так как каждая отдельно взятая аминокислота, содержащаяся в крови, имеет свой спектр поглощения.

3. Интенсивность окрашивания начинает уменьшаться через 30 минут, поэтому раствор должен быть подвергнут измерению в пределах этого времени.

4. Значения концентрации для сыворотки примерно на 10% выше, чем для плазмы, по-видимому, за счет высвобождения аминокислот в процессе свертывания.

Определение аминного азота в моче. Используются те же реактивы, что и для плазмы и сыворотки.

Исследуемый материал. Моча суточная (консерванты — тимол или HCl). Хранить охлажденной.

Методика. К 1,0 мл мочи добавляют 1,0 мл вольфрамовой кислоты. Смешивают, фильтруют или центрифугируют и выпаривают до 1/2 первоначального объема. Берут 0,5 мл жидкости и разводят в 1 мл воды. Дальнейшую обработку реактивами производят так же, как и для плазмы крови. В качестве контроля берут 1 мл воды.

Приготовление и контроля, и стандарта осуществляется так же, как описано при определении аминного азота в плазме крови. Расчет производится по той же формуле.

Нормальные величины. 50—200 мг/сут (3,57—14,28 ммоль/сут).

Коэффициент перевода: мг/100 мл в ммоль/л — 0,714, обратно — 1,40;

мг/сут в ммоль/сут — 0,0714, обратно — 14,0.

Диагностическая значимость. Повышены при почечной недостаточности, остром канальцевом некрозе, истощении, галактоземии, болезни Вильсона, синдроме Фанкони.

2.16. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТАТОЧНОГО АЗОТА КРОВИ ГИПОБРОМИТНЫМ МЕТОДОМ (М-Д РАППОПОРТА — ЭЙХГОРНА)

Принцип. При действии на азотистое соединение щелочного раствора гипобромита азот выделяется в виде газа. Остаток гипобромита определяется йодометрически.

Реактивы. 1. Реактив Абрамсона (осаждающий раствор). В мерную колбу емкостью 1 л вносят 4,48 г фольфрамовокислого натрия (NaWO_4), 2,0 г лимоннокислого натрия ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot x\text{2H}_2\text{O}$), 6,4 г сернокислого натрия безводно-

го (Na_2SO_4). Растворяют приблизительно в 800 мл воды, добавляют 44,8 мл 1н раствора серной кислоты и 2,0 г сернокислого кадмия (CdSO_4). Затем доводят объем до 1 л дистиллированной водой.

Проверка реактива Абрамсона. 1. В центрифужную пробирку набирают 5,0 мл вновь приготовленного осаждающего раствора, вносят в него 0,1 мл крови. Перемешивают, центрифугируют. Снимают пипеткой центрифугат и добавляют к нему несколько капель 20% раствора сульфосалициловой кислоты. Центрифугат должен оставаться прозрачным. Если появляется стойкое помутнение, значит в центрифугате остается белок и реактив Абрамсона к использованию непригоден.

2. Дезаминирующий гипобромитный раствор. Он состоит из смеси реактивов А и Б.

Раствор А (борно-фтористая смесь) состоит из растворов A_1 , A_2 , A_3 .

Раствор A_1 : 84,5 г борной кислоты и 25,6 г едкого натрия растворяют в 500 мл воды, кипятят в течение 30 минут и после охлаждения доливают дистиллированной водой до 1 л.

Раствор A_2 : насыщенный раствор фтористого натрия (NaF). 5,0 г фтористого натрия растворяют в 100 мл горячей воды и горячий раствор фильтруют через бумажный фильтр.

Раствор A_3 : 27% раствор едкого натра (NaOH).

Раствор А (борно-фтористая смесь): смешивают 250 мл раствора A_1 , 150 мл раствора A_2 и 50 мл раствора A_3 , то есть в соотношении 5:3:1. Смесь стойкая. Борная кислота связывает сахар крови, редуцирующие свойства которой мешали бы опыту. В присутствии ионов борной кислоты гипобромит не действует на глюкозу.

Раствор Б (бромовый раствор): 3,2 г бромистого калия KBr и 0,28 г NaBrO_3 — бромноватокислого натрия растворяют в небольшом количестве воды (можно KBrO_3) в мерной колбе на 100 мл, добавляют 10 мл 1 н серной кислоты H_2SO_4 и выдерживают в темном месте в течение 30 минут. Затем доливают водой до метки. Реактив стоек до 1 месяца при хранении в холодильнике в сосуде из темного стекла с притертой пробкой.

Гипобромитный раствор готовят непосредственно перед употреблением, смешивая 9 частей раствора А и 1 часть раствора Б.

Проверка бромового раствора. Готовят гипобромитный раствор из 9 частей проверенной борно-фтористой

смеси и 1 части вновь приготовленного бромного раствора. С таким гипобромитным раствором проделывают все манипуляции, как для холостой пробы метода определения остаточного азота. На титрование должно уйти 8,5—10,0 мл 0,005 н раствора гипосульфита натрия. Если уходит меньшее количество раствора гипосульфита, то бромовый раствор необходимо переделать.

Проверка борно-фтористой смеси: готовят гипобромитный раствор из 9 частей вновь приготовленной борно-фтористой смеси и 1 части проверенного бромового раствора. Проводят все манипуляции как для холостой пробы. На титрование должно уйти, как и в предыдущем случае, 8,5 — 10,0 мл 0,005 н раствора гипосульфита натрия.

3. 0,005 н раствора гипосульфита натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$).

4. 5% раствор йодистого калия (KI). Раствор хранят в темной посуде.

5. 1% водный раствор крахмала.

6. 18% раствор соляной кислоты. Концентрированная соляная кислота с относительной плотностью 1,19 разводится дистиллированной водой 1:1.

Ход определения.

Ингредиенты	Опытная проба, мл	Холостая проба, мл
Реактив Абрамсона	5,0	4,0
Капиллярная кровь	0,1	—

Тщательно перемешивают. Через 10 минут центрифугируют в течение 5—10 минут при 1500 об/мин. Центрифугат переносят в конические колбочки для титрования.

Центрифугат	4,0	—
Раствор гипобромита	5,0	5,0

Перемешивают, выдерживают 2—3 минуты.

5% раствор KI	0,5	0,5
18% раствор HCl	3,0	3,0
1% раствор крахмала	2—3 капли	2—3 капли

Перемешивают. Выдерживают 2—3 минуты и титруют из бюретки 0,005 н раствором гипосульфита натрия до обесцвечивания реакционной смеси. Титрование начинают с холостой пробы.

Примечание. Холостую пробу ставят в параллелях. Одну из параллелей, как указано выше, титруют перед серией опытных проб, вторую — по завершении титрования всех опытных проб. Из количества раствора гипосульфита, ушедшего на титрование каждой из холостых проб, выбирают среднearифметическое значение, которое используют для дальнейших расчетов.

Расчет. Разность в количестве гипосульфита, затраченного на титрование холостой пробы и опыта, умножают на коэффициент "30" для выражения результатов исследования в мг%.

Например, на титрование холостых проб затрачено в среднем 9,8 мл раствора гипосульфита натрия, а на титрование опыта — 8,6 мл. Тогда содержание остаточного азота составляет:

$$(9,8 - 8,6) \times 30 = 36 \text{ мг\%}$$

Норма. Содержание остаточного азота крови 20—40 мг%.

Клинико-диагностическое значение. Определение остаточного азота в крови имеет меньшую диагностическую значимость, чем определение его фракций, так как содержание мочевой кислоты или креатинина дает более точное представление о характере нарушения азотистого обмена. Кроме того, отдельные фракции остаточного азота могут свидетельствовать о нарушении функции почек раньше по сравнению с другими показателями.

Наибольшее клиническое значение определение остаточного азота имеет при заболеваниях почек. Увеличение содержания остаточного азота происходит пропорционально степени поражения почечной паренхимы. Длительно удерживающийся высокий уровень остаточного азота при нефрите является прогностически неблагоприятным признаком.

Уровень остаточного азота крови повышается при потере большого количества жидкости (колиэнтерит, токсическая диспепсия и др.), в случае ожогов, при тяжелых заболеваниях печени, а также при лихорадках, непроходимости кишечника и после оперативных вмешательств.

2.17. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЧЕВИНЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И В МОЧЕ (ПО ЦВЕТНОЙ РЕАКЦИИ С ДИАЦЕТИЛМОНООКСИМОМ)

Принцип. Мочевина образует с диацетилмонооксимом в присутствии тиосемикарбазида и солей железа в кислой среде окрашенное соединение, интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию мочевины в сыворотке крови и в моче.

Исследуемый материал. Сыворотка или плазма. Если исследование не выполнено в течение нескольких часов, сыворотку охладить.

Реактивы.

1. 10% раствор трихлоруксусной кислоты.

2. 2,5% водный раствор диацетилмонооксида. Реактив стоек.

3. 0,25% водный раствор тиосемикарбазида. Для приготовления реактива можно пользоваться также тиосемикарбазидом солянокислым; последний в виде 0,32% водного раствора. Оба реактива стойки при хранении в темной посуде при комнатной температуре.

4. Раствор хлорного железа. Основной раствор хлорного железа — 5 г растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды и доводят водой до 100 мл. Подкисляют добавлением 1 мл концентрированной серной кислоты.

Из основного раствора готовят рабочий раствор хлорного железа: 1 мл основного раствора хлорного железа доводят до 100 мл дистиллированной водой, затем добавляют 8 мл концентрированной серной кислоты и 1 мл 85% ортофосфорной кислоты. Хранят в темной посуде не более 2 недель.

5. Цветной реактив. К 30 мл рабочего раствора хлорного железа добавляют 20 мл дистиллированной воды, 1 мл 2,5% раствора диацетилмонооксида и 0,25 мл 0,25% раствора тиосемикарбазида. Цветной реактив готовят каждый раз перед употреблением.

6. Стандартный раствор мочевины. 16,65 ммоль/л. Растворяют 100 мг мочевины в дистиллированной воде в мерной колбе на 100 мл. В качестве растворителя можно использовать 0,2% раствор бензойной кислоты (0,2 г кристаллической бензойной кислоты растворяют в 100 мл дистиллированной воды при интенсивном перемешивании и нагревании на водяной бане).

Стандарт, приготовленный на растворе бензойной кислоты, более стабилен, чем водный. Оба раствора при работе должны давать небольшие колебания экстинкции на ФЭКе. В противном случае следует приготовить новый стандартный раствор. 1 мл стандартного раствора содержит 0,166 ммоль мочевины.

Ход определения.

Ингредиенты	Опытная проба, мл	Стандартная проба, мл	Холостая проба, мл
Сыворотка крови	0,2	—	—
Стандартный раствор	—	0,2	—
Дистиллированная вода	0,8	0,8	0,5
ГХУ	1,0	1,0	—

Опытную и стандартную пробы перемешивают, выдерживают 15—20 минут, затем центрифугируют при 1500 об/мин в течение 10 минут.

Центрифугат	0,5	0,5	—
Цветной реактив	5,0	5,0	5,0

Перемешивают, помещают в кипящую водяную баню на 20 минут. Затем охлаждают 2—3 мин под водопроводной водой. Колориметрируют при длине волны 500—560 нм (зеленый светофильтр) против холостой пробы, в кювете толщиной слоя 10 мм.

Расчет производят по формуле:

$$X = \frac{E_{\text{оп}} \times 16,65}{E_{\text{ст}}}$$

X — концентрация мочевины в ммоль / л в сыворотке крови,

$E_{\text{оп}}$ — экстинция опытной пробы,

$E_{\text{ст}}$ — экстинция стандартной пробы,

16,65 — концентрация мочевины в стандартном растворе в ммоль/л.

Определение мочевины в моче. Перед определением профильтрованную мочу (из суточного количества) разводят физиологическим раствором в соотношении 1:25 или 1:50. Определение проводят аналогично определению мочевины в сыворотке крови, но вместо сыворотки берут 0,2 мл разведенной мочи.

Параллельно обрабатывают стандартную пробу, как описано для определения мочевины в сыворотке крови.

Расчет мочевины на суточное количество мочи производят по следующей формуле:

$$X = \frac{C_{\text{ст}} \times E_{\text{оп}} \times A \times K}{E_{\text{ст}} \times B}$$

X — количество мочевины в суточной моче в ммоль,

$E_{\text{оп}}$ — экстинция опытной пробы,

$E_{\text{ст}}$ — экстинция стандартной пробы,

$C_{\text{ст}}$ — количество мочевины в стандарте в ммоль,

A — суточное количество мочи,

B — количество мочи, взятой для анализа,

K — коэффициент разведения мочи.

Норма: для сыворотки 2,5 — 8,3 ммоль/л, для мочи — 330—580 ммоль мочевины в суточной моче.

Примечания:

1. Измерения на ФЭКе проводят не позже, чем через 15 минут после охлаждения проб, ввиду неустойчивости окраски.
2. Из-за неустойчивости окрашенного комплекса мочевины с диацетилмонооксимом и зависимости окраски от условий нагревания не рекомендуется строить калибровочный график. Стандартную пробу определяют параллельно с каждой серией опыта.
3. При определении мочевины в сыворотке крови выше 16,65 ммоль/л сыворотку разводят физиологическим раствором, а результаты умножают на коэффициент разведения.
4. При определении содержания мочевины в моче, начиная с величины экстинкции 0,13 — 0,15 следует увеличить разведение мочи.
5. Пересчет показателей мочевины на содержание азота в моче проводят путем умножения на фактор 0,466.

2.18. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЧЕВИНЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ УРЕАЗНЫМ МЕТОДОМ ПО РЕАКЦИИ С ФЕНОЛ-ГИПОХЛОРИТОМ

Принцип. Мочевина под действием уреазы разлагается на углекислый газ и аммиак. Аммиак определяется колориметрически по образованию окрашенных продуктов с гипохлоритом и фенолом.

Исследуемый материал. Сыворотка или плазма. Не допускать высоких концентраций фторида натрия, поскольку он ингибирует уреазу.

Реактивы. 1. Раствор ЭДТА — динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (Трилон-В). 1 г ЭДТА растворяют в 90 мл дистиллированной воды, доводят рН до 6,0 0,5 н раствором едкого натрия и доливают водой до 100 мл. Раствор используют для приготовления раствора уреазы.

2. Раствор уреазы рН 6,0. 0,02 г уреазы растворяют в 50 мл раствора ЭДТА, проверяют рН. Уреазу хранят в холодильнике, в плотно закрытой упаковке. Раствор уреазы стабилен в течение месяца при хранении в холодильнике, в посуде с плотно закрытой пробкой.

3. Раствор фенола и нитропруссид натрия (цветной реактив). 0,25 г нитропруссид натрия (чда) растворяют в 500 мл дистиллированной воды, добавляют 50 мл или 54 г фенола (чда) и доливают дистиллированной водой до 2 л. Стабилен в течение месяца при хранении в холодильнике в посуде темного стекла.

4. Основной раствор гипохлорита натрия. 100 г хлорной извести (CaOCl_2) размешивают в течение 15 мин с 170 мл дистиллированной воды, после чего прибавляют, непрерывно перемешивая, раствор, состоящий из 170 мл дистиллированной воды и 70 г углекислого натрия (Na_2CO_3). Масса сначала густеет, затем разжижается. Оставляют стоять до сле-

дующего дня. Надосадочную жидкость (гипохлорит натрия) сливают и фильтруют через промытый дистиллированной водой фильтр. Хранят в холодильнике в посуде из темного стекла. Срок годности раствора — 1—2 месяца.

Определение активности хлора.

1 мл основного раствора гипохлорита натрия смешивают с 100 мл дистиллированной воды. К 100 мл этого раствора добавляют 5,0 мл свежеприготовленного 5% раствора йодистого калия (KI) и 10 мл 6 н раствора соляной кислоты. Титруют 0,1н раствором тиосульфата натрия. Как только раствор приобретает слабо-желтую окраску, добавляют 10 капель 1% крахмала и титруют до обесцвечивания.

Концентрацию гипохлорита натрия рассчитывают по хлору:

$$K = a \cdot 0,709,$$

где K — концентрация активного хлора, в граммах на 100 мл гипохлорита натрия;

a — количество тиосульфата натрия, пошедшее на титрование (мл);

0,709 — коэффициент пересчета.

После установления концентрации активного хлора основной раствор гипохлорита натрия разводят так, чтобы концентрация хлора равнялась 0,5 г на 100 мл. Раствор гипохлорита натрия с концентрацией хлора 0,5 г на 100 мл смешивают с равным объемом 5 н раствора едкого натра и используют для реакции. Активность хлора проверяют не реже 1 раза в две недели.

5. 0,1н раствор тиосульфата натрия. 25 г тиосульфата натрия растворяют в 1 л дистиллированной воды ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).

6. 5 н раствор едкого натра.

7. 6 н раствор соляной кислоты.

8. 5% раствор йодистого калия.

9. 7 ммоль/л, стандартный раствор мочевины: 42 мг высушенной до постоянного веса мочевины растворяют в мерной колбе на 100 мл 0,2% раствором бензойной кислоты. 1 мл раствора мочевины содержит 0,4 мг мочевины (мочевину можно растворять в дистиллированной воде, но раствор будет менее стабилен). Раствор хранят в холодильнике.

10. 0,2% раствор бензойной кислоты. 0,2 г кристаллической бензойной кислоты растворяют в 100 мл дистиллированной воды при интенсивном перемешивании и нагревании до полного растворения кристаллов.

Ход определения.

Ингредиенты	Опытная проба, мл	Стандартная проба, мл	Холостая проба, мл
Сыворотка крови	0,01	—	—
Стандартный раствор	—	0,01	—
Дистиллированная вода	—	—	0,01
Раствор уреазы	0,25	0,25	0,25

Пробирки закрывают пробками, инкубируют 15 мин при 37° С.

Цветной реактив	5,0	5,0	5,0
Р-р гипохлорита натрия	0,5	0,5	0,5

Перемешивают, выдерживают 20 минут в термостате при 37° С.

Колориметрируют при длине волны 500—560 нм (зеленый светофильтр) в кювете толщиной слоя 10 мм против холостой пробы. Окраска стабильна в течение нескольких часов.

Расчет производят по формуле: $X = \frac{E_{оп} \cdot 7}{E_{ст}}$, где

X — концентрация мочевины в ммоль/л,

$E_{оп}$ — экстинция опытной пробы,

$E_{ст}$ — экстинция стандартной пробы,

7 — концентрация мочевины в стандартном растворе в ммоль/л.

Нормальные величины:

	Азот мочевины, мг/100 мл	Мочевина	Азот мочевины, мкмоль/л	Мочевина
Кровь из пуповины	21—40	44,9—85,6	7,5—14,3	7,5—14,3
Недоношенные, I неделя:	3—25	6,4—63,5	1,1—8,9	1,1—8,9
Новорожденные	4—12	8,6—25,7	1,4—4,3	1,4—4,3
Дети	5—18	10,7—38,5	1,8—6,4	1,8—6,4
Взрослые	7—18	15—38,5	2,5—6,4	2,5—6,4
>60 лет	8—11	17,1—44,9	2,9—7,5	2,9—7,5

Факторы, влияющие на показатели мочевины (нефротоксичные лекарственные препараты, кортикостероиды, избыток тироксина), могут дать повышенные результаты. Прием соматотропных гормонов понижает уровень мочевины.

Примечания:

1. Построение калибровочного графика не рекомендуется, так как интенсивность окраски проб зависит от условий опыта. Поэтому правильной обрабатывать калибровочные пробы одновременно с опытными и вести расчет по формуле.

2. Серия проб не должна превышать 10.

3. Если сыворотка мутная или окрашенная, то ставят дополнительную холостую пробу, в которую добавляют сыворотку и все реактивы до инкубации. Экстинкцию этой холостой пробы вычитают из онагной.

4. Для исследования мочевины удобно пользоваться готовыми наборами реактивов.

Клинико-диагностическое значение. Увеличивается концентрация мочевины в сыворотке крови при гломерулонефрите, гломерулосклерозе, хроническом нарушении функции почек, хронической непроходимости мочевых путей, при усиленном распаде белков (злокачественные новообразования), при обезвоживании организма, при диете с высоким содержанием белка.

Понижается концентрация мочевины в крови при: диете с низким содержанием белка и высоким содержанием углеводов; при повышенной утилизации белка (в поздние сроки беременности, у детей в возрасте до 1 года, при акромегалии); тяжелых заболеваниях печени, отравлении лекарствами; нарушении всасывания (целиаксия).

Увеличивается концентрация мочевины в моче при гипертиреозе, богатом белками пищевом рационе, лихорадочных состояниях. Уменьшается мочевины в моче при почечной недостаточности, при лечении анаболическими гормонами, инсулином.

2.19. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КРЕАТИНИНА В КРОВИ И МОЧЕ ПО ЦВЕТНОЙ РЕАКЦИИ ЯФФЕ (М-Д ПОППЕРА)

Принцип. Креатинин реагирует с пикриновой кислотой в щелочной среде с образованием окрашенных соединений. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации креатинина.

Исследуемый материал. Сыворотка или плазма. Проба стабильна в охлажденном виде в течение суток. Для длительного хранения рекомендуется ее заморозить.

Реактивы.

1. Насыщенный раствор пикриновой кислоты. Товарная пикриновая кислота содержит 15—20% влажности; кислоту не сушить! **Взрывоопасно!** 2 г пикриновой кислоты растворяют в 100 мл воды при нагревании на водяной горячей бане. После этого раствор оставляют стоять на 24 часа, периодически перемешивая. Затем раствор фильтруют. Реактив стоек. Хранят в темной посуде.

2. Основной стандартный раствор 8,8 ммоль/л креатинина. 100 мг креатинина доводят до 100 мл 0,1 н раство-

ром соляной кислоты. Хранят в холодильнике в посуде с притертой пробкой. Для определения креатинина сыворотки крови рабочий стандартный раствор 0,088 ммоль/л получают разбавлением основного раствора дистиллированной водой в 100 раз. 1 мл раствора содержит 0,01 мг креатинина.

3. 10% раствор едкого натрия.
4. 0,1 н раствор соляной кислоты.

Ход определения.

Ингредиенты	Опытная проба, мл	Стандартная проба, мл	Холостая проба, мл
Сыворотка крови	2,0	—	—
Стандартный р-р	—	2,0	—
Пикриновая кислота	6,0	6,0	4,0

Перемешивают, выдерживают 5 минут и помещают на 15—20 секунд в кипящую водяную баню, затем центрифугируют.

Центрифугат	4,0	4,0	—
10% NaOH	0,2	0,2	0,2

Тщательно перемешивают. Если после подщелачивания реакционная смесь мутнеет вследствие выпадения фосфатов, то пробы следует повторно центрифугировать.

Дистиллированная вода	5,8	5,8	5,8
-----------------------	-----	-----	-----

Через 10 минут колориметрируют при длине волны 500—560 нм, в кювете с толщиной 20 мм против холостой пробы.

Расчет выполняют по стандартному раствору, либо по калибровочному графику. Если расчет производится по стандартному раствору, то концентрацию креатинина находят по формуле:

$$X \text{ мкмоль / л} = \frac{E_{\text{оп}} \cdot 0,088 \text{ ммоль/л}}{E_{\text{ст}}} \text{ (88 мкмоль / л), где}$$

X — концентрация креатинина в исследуемом материале;

$E_{\text{оп}}$ — экстинция опытных проб;

$E_{\text{ст}}$ — экстинция стандартных проб;

0,088 ммоль/л — концентрация креатинина в стандартной пробе.

Для расчетов по калибровочному графику из рабочего стандартного раствора креатинина готовят разведения, как указано в ниже приведенной таблице (табл. 2.6), и через

10 минут производят измерения при тех же условиях, что и опытные пробы.

Таблица 2.6.

Данные к построению калибровочного графика для определения креатинина

№№ пробирок	Рабочий стандартный раствор креатинина, мл	Содержание креатинина в пробе, мг	Раствор пикриновой кислоты, мл	Раствор NaOH, мл	Дистиллированная вода	Концентрация креатинина в пробе, ммоль/л, (мкмоль/л)
1.	0,4	0,004	3,0	0,2	до объема	0,035 (35)
2.	0,8	0,008	3,0	0,2	10 мл	0,070 (70)
3.	1,6	0,016	3,0	0,2	—"	0,140 (140)
4.	2,4	0,024	3,0	0,2	—"	0,210 (210)
5.	3,2	0,032	3,0	0,2	—"	0,290 (290)
6.	4,0	0,040	3,0	0,2	—"	0,360 (360)

Основной закон фотометрии (прямолинейная зависимость) соблюдается при концентрации креатинина от 0,026 до 0,440 ммоль/л (от 26 до 440 мкмоль/л).

Нормальные величины:

	мг/100 мл	мкмоль/л
Кровь из пуповины	0,6—1,2	53—106
Новорожденные: 1—4 дня	0,3—1,0	27—88
Дети до 1 года	0,2—0,4	18—35
Дети	0,3—0,7	27—62
Подростки	0,5—1,0	44—88
Взрослые, муж.	0,6—1,2	53—106
жен.	0,5—1,1	44—97

Влияющие факторы. Применение нефротоксичных препаратов повышает содержание креатинина.

Диагностическая значимость. Повышение: нарушение функции почек (острое и хроническое) любого происхождения (дефицит перфузии, заболевания почек, обтурация мочевых путей ниже уровня почек); активная акромегалия и гигантизм, гипертиреоз, кишечная непроходимость, непроходимость мочевых путей.

Понижение: Слабость (обусловленная возрастом или уменьшением мышечной массы), беременность (особенно I и III триместры).

2.20. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КРЕАТИНИНА В МОЧЕ

Исследуемый материал. Моча. Проба стабильна в охлажденном состоянии до 4 дней. Для более длительного хранения заморозить.

Ход определения:

Ингредиенты	Опытная проба, мл	Стандартная проба, мл	Холодная проба, мл
Суточная моча	0,5	—	—
Основной стандартный раствор креатинина 8,8 ммоль/л (8800 мкмоль/л)	—	0,5	—
Пикриновая кислота	3,0	3,0	3,0
Тщательно перемешивают 10% раствор NaOH	0,2	0,2	0,2

Выдерживают при комнатной температуре в течение 10 минут, доводят объем до 100 мл дистиллированной водой. Колориметрируют при длине волны 500—560 нм, в кювете толщиной 20 мм против холодной пробы.

Расчет проводят по формуле:

$$X = \frac{8,8 \text{ ммоль/л} \cdot E_{\text{оп}} \cdot a}{E_{\text{ст}} \cdot б}, \text{ где}$$

X — количество креатинина в суточной моче (ммоль/л);
8,8 ммоль/л (8800 мкмоль/л) — концентрация основного стандартного раствора креатинина;

$E_{\text{оп}}$ — экстинция опытной пробы;

$E_{\text{ст}}$ — экстинция стандартной пробы;

a — суточное количество мочи;

б — количество мочи, взятой для анализа.

Нормальные величины:

	мг/(кг·сут)	мкмоль/(кг·сут)
Дети до 1 года	8—20	71—177
Дети	8—22	71—194
Подростки	8—30	71—265
Взрослые, муж.	14—26	124—230
жен.	11—20	97—177

(снижается до 10 мг/ (кг·сут) в возрасте 90 лет)

Влияющие факторы: Повышение — кортикостероиды.
Понижение — андрогены и анаболические стероиды, осазидные диуретики.

Диагностическая значимость. Повышение содержания креатинина отмечено при физических нагрузках, акромегалии, гигантизме, сахарном диабете, гипотиреозе.

Снижается при: гипертиреозе, анемии, параличе, мышечной атрофии, остром дерматомиозите, хронических заболеваниях почек, лейкозах.

Примечания:

1. Если концентрация креатинина в сыворотке крови выше 0,44 ммоль/л, то сыворотку следует разводить физиологическим раствором, а результаты соответственно умножить на разведение.

2. Измерение следует проводить не позже, чем через 20 минут после прибавления едкого натра.

3. Белок не мешает определению креатинина до 1,5 г на 100 мл мочи. При большем содержании белка его необходимо удалить до анализа.

4. В качестве консервантов для мочи можно применять тимол и толуол, которые не мешают определению креатинина.

5. При определении содержания креатинина в моче, начиная с величины экстинкции 0,22 — 0,25, мочу следует разводить, а результат умножить на разведение.

6. Креатинин не является чувствительным показателем заболевания почек в ранней стадии. На уровень креатинина в плазме не влияет характер принимаемой пищи. Липемия и гемолиз вызывают ложное увеличение, а желтуха — ложное снижение результатов; кетоацидоз обуславливает ложное увеличение результатов.

2.21. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЧЕВОЙ КИСЛОТЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПО РЕАКЦИИ С ФОСФОРНОВОЛЬФРАМОВЫМ РЕАКТИВОМ

Принцип. Мочевая кислота восстанавливает фосфорновольфрамовый реактив с образованием комплекса голубого цвета. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации мочевой кислоты.

Исследуемый материал. Сыворотка.

Реактивы. 1. 0,7 н серная кислота, чда. К 200 мл дистиллированной воды добавляют 10 мл концентрированной серной кислоты и доводят объем до 500 мл.

2. Раствор натрия вольфрамовокислого ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, чда). 50,0 г $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ растворяют в небольшом количестве воды, затем доводят объем до 500 мл.

3. 10,3% натрий углекислый (Na_2CO_3). Растворяют 51,5 г углекислого натрия в небольшом количестве дистиллированной воды и доводят водой до 500 мл.

4. Фосфорновольфрамовый реактив. В круглодонную колбу вместимостью 1,5 л вносят 40,0 г натрия вольфрамовокис-

лого и 300 мл дистиллированной воды. Добавляют 32 мл 85% ортофосфорной кислоты и несколько стеклянных бусинок. Кипятят в течение 2-х часов на песочной бане с обратным холодильником. Охлаждают до комнатной температуры и доливают дистиллированной водой так, чтобы общий объем был 1 литр. Добавляют 32,0 г сернокислого лития. Раствор стабилен при хранении в холодильнике.

5. Основной стандартный раствор мочево́й кислоты 1г/л. Растворяют 0,6 г углекислого лития в 150 мл дистиллированной воды, фильтруют и нагревают до 60° С. Взвешивают 1,0 г мочево́й кислоты, вносят в предварительно нагретую мерную колбу на 1 л, вливают теплый раствор углекислого лития и быстро встряхивают. После растворения мочево́й кислоты колбу охлаждают до комнатной температуры, добавляют 20 мл раствора формалина, наливают 300—350 мл дистиллированной воды. Добавляют несколько капель раствора метилового оранжевого, затем, встряхивая, медленно добавляют 20—22 мл 0,35 моль/л серной кислоты до изменения цвета в розовый, доливают колбу до метки дистиллированной водой. Раствор стабилен при хранении в холодильнике в посуде из темного стекла. 1 мл раствора содержит 1 мг мочево́й кислоты.

6. Рабочий стандартный раствор мочево́й кислоты. 1 мл основного калибровочного раствора доводят до 200 мл дистиллированной водой. 1 мл содержит 0,005 мг мочево́й кислоты. Стабилен в течение 2 недель при хранении в холодильнике.

Ход определения.

<i>Ингредиенты</i>	<i>Опытная проба, мл</i>	<i>Стандартная проба, мл</i>	<i>Холодная проба, мл</i>
Дистиллированная вода	8,0	—	—
Сыворотка	1,0	—	—
Серная кислота	0,5	—	—
Раствор натрия вольфрамово-кислого	0,5	—	—

Перемешивают, через 5—10 минут фильтруют через бумажный фильтр в химическую пробирку.

Фильтрат	3,0	—	—
Дистиллированная вода	—	—	3,0
Рабочий стандартный раствор	—	3,0	—
Раствор углекислого натрия	1,5	1,5	1,5
Перемешивают			
Фосфорно-вольфрамовый реактив	1,0	1,0	1,0

Перемешивают. Колориметрируют через 30 минут в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 590—700 нм (красный светофильтр) против холостой пробы.

Расчет проводят по формуле:

Концентрация мочевой кислоты (ммоль/л) $= \frac{E_{оп} \cdot C_k \cdot 10}{E_{ст}} \cdot K = \frac{E_{оп} \cdot 50,059}{E_{ст}}$, где

$E_{оп}$ — экстинция опытной пробы;

$E_{ст}$ — экстинция стандартной пробы;

C_k — концентрация рабочего стандартного раствора в мг в 1 мл (0,5);

10 — пересчет на сыворотку (в опытную пробу берут 0,3 мл сыворотки, т.е. в 10 раз меньше, чем в стандартную пробу). K — коэффициент пересчета в единицы СИ мг/100 мл ммоль — 0,059 = 10/168,1 (пересчет на 1 литр сыворотки, 168,1 — относительная молекулярная масса мочевой кислоты).

Нормальные величины:

	мг/100 мл	ммоль/л
мужчины	4,5—8,2	0,27—0,48
женщины	3,0—6,5	0,18—0,38
мужчины	4,2—8,0	0,25—0,47
>60 лет		
женщины	3,2—7,3	0,19—0,43

Влияющие факторы: повышается содержание при приеме следующих препаратов: диазоксида, диуретиков, адреналина, норадреналина, этанола, салицилатов, никотиновой кислоты, кортикостероидов, некоторых противоопухолевых препаратов.

На результаты исследования влияют присутствие веществ, влияющих на реакцию с фосфовольфрамом — глутатион, глюкоза, цистин, тирозин, триптофан, фенолы, аскорбиновая кислота, метаболиты кофеина.

Клинико-диагностическое значение.

Увеличивается содержание мочевой кислоты в крови при подагре, остром и хроническом нефрите, талассемии, эритремии, пернициозной анемии, лейкозах, миеломной болезни, гемолитической желтухе, инфаркте миокарда, диабете, голодании, псориазе, отравлении свинцом, приеме мочегонных препаратов, синдроме Дауна.

Понижается уровень мочевой кислоты в крови после приема пиперазина, атофана, АКТГ, антикоагулянтов, инсулина.

Примечание. Пища, богатая пуринами (печень, почки), может вызвать повышение уровня мочевой кислоты.

ФЕРМЕНТЫ

Энзимология — наука о ферментах. Она рассматривает болезни как результат нарушения структуры и функции ферментов. В клинико-диагностических лабораториях определение активности ферментов используется как маркер патологических процессов.

Ферменты — это специфические белки, выполняющие в организме роль биологических катализаторов. Ферменты могут быть как простыми, так и сложными белками. Простые при гидролизе дают только аминокислоты, сложные распадаются на аминокислоты и соединения небелкового характера. Белковый компонент сложного белка — фермента называется апоферментом. Небелковый компонент получил название кофермента. Многие коферменты представлены витаминами или их производными. К настоящему времени известно свыше 300 отдельных ферментов, в состав которых входят в качестве коферментов витамины или их производные. Поэтому при гиповитаминозах нарушается деятельность многих ферментных систем.

Классификация ферментов. Согласно действующей классификации ферменты делятся на шесть главных классов:

1. Оксидоредуктазы. Сюда относятся ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции (ЛДГ, каталаза, пероксидаза, малатдегидрогеназа и др.).

2. Трансферазы. Это ферменты, катализирующие реакции переноса различных химических группировок и атомов (АЛТ, АСТ, γ -ГТП).

3. Гидралазы — ферменты, катализирующие расщепление внутримолекулярных связей органических веществ при участии молекул воды (ЩФ, КФ).

4. Лиазы — ферменты катализа обратимых реакций отщепления различных групп от субстратов не гидролитическим путем.

5. Изомеразы — ферменты, катализирующие реакции изомеризации.

6. Лигазы — ферменты, катализирующие синтез органических веществ с использованием энергии АТФ.

Свойства ферментов:

1. В ходе реакции, ферменты, выступая в качестве катализаторов, практически не меняют свою структуру и могут вступать в реакцию с новыми молекулами субстрата.

2. Максимальная активность ферментов проявляется в температурном диапазоне от 20° до 37°С. При более низких температурах активность их резко снижается, при высоких — ферменты, как и все белки, инактивируются.

3. Наибольшую активность ферменты проявляют в области рН 6,0 — 8,0, кроме желудочных ферментов: пепсин активен при рН менее 2,0, гастропепсин — 3,0.

4. Каждый фермент катализирует определенную химическую реакцию.

5. Скорость химической реакции находится в прямой зависимости от концентрации фермента.

Так как активность ферментов меняется в зависимости от температуры, рН среды, концентрации субстратов и коферментов при определении активности ферментов необходимо строго соблюдать одни и те же условия. Ферментативную реакцию принято проводить при температуре, лежащей в пределах 25—40°С. Обычно активность ферментов в сыворотке крови определяют при 37°С.

О количестве фермента судят не в единицах массы, как о других биологических компонентах крови, а по его активности, то есть по специфичности и скорости катализируемой им реакции. Активность фермента можно определить либо по скорости накопления продуктов ферментативной реакции, либо по скорости убыли субстрата. За единицу активности фермента (Е) принято то количество его, которое катализирует превращение одного микромоля субстрата (или образование одного микромоля продукта реакции) в минуту при заданных условиях. При этом указывается температура, при которой проводилась ферментативная реакция. В сыворотке или плазме крови активность выражается в единицах на 1 литр, в тканях — на 1 мг белка. $1 \text{ Е/л} = \text{мкмоль/мин. л.}$ В системе СИ за единицу активности фермента принят катал (кат) — это такое количество фермента, которое катализирует превращение 1 моля субстрата за 1 секунду. Для удобства расчетов в практике используются нанокаталами (нкат), или микрокаталами (мккат). В расчете на 1 литр биологического материала $\text{кат/л} = \text{моль/сек.л}$ или $\text{мккат/л} = \text{мкмоль/сек.л}$; $\text{нкат/л} = \text{нмоль/сек.л}$.

$$\text{Е/л} = 16,67 \text{ нкат/л}, \quad 1 \text{ нкат} = 0,06 \text{ Е/л.}$$

По диагностической ценности ферменты подразделяются на: 1) органоспецифические — ферменты, катали-

зирующие химические превращения, характерные для одного или немногих органов; 2) неспецифические – катализирующие реакции, характерные для многих органов.

К органоспецифическим ферментам можно отнести изоферменты. Изоферментами называют группу или семейство ферментов, катализирующих одну и ту же реакцию, но отличающихся по целому ряду физико-химических свойств (электрофоретическая подвижность, адсорбционные свойства, оптимум рН, термостабильность, сродство к субстрату и т.д.) (37,38,40). Наибольшую практическую значимость приобрели изоферменты ЛДГ. Целый ряд исследователей подчеркивают, что характер изоферментного спектра ЛДГ и тип обмена веществ в ткани коррелируют между собой. В тканях с преимущественно аэробным обменом веществ (сердце, мозг, почки) наибольшей активностью обладают ЛДГ₁ и ЛДГ₂, т.е. изоферменты Н-формы. В тканях с выраженным анаэробным обменом веществ (печень, скелетная мускулатура и др.) преобладают ЛДГ₃ и ЛДГ₄, т.е. изоэнзимы М-формы.

Следует помнить, что для анализа активности ферментов и изоферментов требуется негемолизованная сыворотка крови, даже следы гемолиза могут привести к серьезным ошибкам. Сыворотку крови отделять от сгустка необходимо не позже 2 часов с момента взятия крови. Стабильность ферментов при хранении сыворотки зависит от температуры (табл.2.7.), наличия или отсутствия стабилизирующих веществ.

При интерпретации результатов исследования активности ферментов следует учитывать, что они зависят от пола обследуемого, возраста и физиологического состояния.

Таблица 2.7

Потеря ферментативной активности при хранении сыворотки

Ферменты		24 часа (%)	48 часов (%)	3 дня (%)	5 дней (%)	7 дней (%)
АСТ	4° С	2	5	8	10	12
	25° С	2	6	10	11	13
АЛТ	4° С	2	5	10	14	20
	25° С	8	12	17	19	39
ЛДГ	4° С	0	4	8	9	12
	25° С	0	1	2	10	15
ГГТ	4° С	0	0	0	0	0
	25° С	0	0	0	0	0
ЩФ	4° С	0	0	0	0	0
	25° С	0	0	0	0	0
КФ	4° С	0	0	0	0	0
	25° С	0	2	3	6	10

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

Для определения активности ферментов можно применять колориметрические, спектрофотометрические, флуорометрические, монометрические и другие методы. В практике чаще используются первые два метода.

По способу измерения скорости ферментативной реакции различают:

1) измерение по конечной точке (end point method). При этом, определяют содержание продуктов реакции в инкубационной среде после фиксированного времени инкубации и остановки ферментативной реакции;

2) кинетическое измерение (kinetic measurement) с многоточечным измерением абсорбции в ходе ферментативной реакции;

3) измерение по начальной скорости (initial rate), когда скорость реакции нелинейна, скорость изменения абсорбции снижается во времени;

4) двухточечное измерение (two point) — при этом способе выбирают линейный участок кривой, определяют абсорбцию дважды — в начале измерения и в конце.

2.22. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ (К.Ф. 1.1.1.27) В СЫВОРОТКЕ КРОВИ (М-Д СЕВЕЛА, ТОВАРЕК)

Принцип. L-лактат под действием ЛДГ сыворотки крови в присутствии НАД окисляется в пируват. При реакции пирувата с 2,4-динитрофенилгидразином образуется окрашенный гидразон пировиноградной кислоты, интенсивность окраски которого пропорциональна активности фермента.

Реактивы. 1. 0,45М раствор молочнокислого натрия. В мерную колбу емкостью 100 мл вносят 5 мл 80% молочной кислоты, несколько капель индикатора 1% спиртового раствора фенолфталеина, добавляют 2 н раствор едкого натрия до появления слаборозовой окраски (рН 7,5), доводят объем дистиллированной водой до метки. Хранят в посуде из темного стекла в холодильнике. Реактив стабилен в течение месяца.

2. 2 н раствор едкого натрия.

3. 1% спиртовой раствор фенолфталеина.

4. 0,03М пиродифосфорнокислого натрия, рН 8,8. В мерную колбу емкостью 500 мл вносят 6,69 г пиродифосфорнокислого натрия ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды, добавляют 1 н раствор соляной кислоты до получения рН 8,8 и доводят

водой до метки. Стабилен в течение месяца при хранении в холодильнике.

5. Раствор никотинамид-аденин-динуклеотида (НАД). Готовят из расчета 3 мг НАД на 1 мл дистиллированной воды. Раствор стабилен в течение месяца при хранении в холодильнике.

6. Раствор 2,4-динитрофенилгидразина (2,4-ДНФГ). 19,8 мг 2,4-ДНФГ растворяют в 8,5 мл концентрированной соляной кислоты при нагревании на кипящей водяной бане под вытяжной вентиляцией. После остывания раствор количественно переносят в мерную колбу на 100 мл и доводят объем водой до метки. Готов к использованию на второй день после приготовления. Хранят в посуде из темного стекла в холодильнике. Раствор годен в течение года.

7. 0,4 н раствор едкого натрия.

8. 1 н раствор соляной кислоты.

9. Стандартный раствор пировинограднокислого натрия ($\text{CH}_3\text{COCOONa}$). 11 мг кристаллического пирувата натрия помещают в мерную колбу на 100 мл, растворяют в небольшом количестве воды, а затем доводят объем водой до метки. 1 мл раствора содержит 110 мкг пирувата натрия, что соответствует 88 мкг пировиноградной кислоты. Раствор используется для построения калибровочного графика.

Ход определения.

Реагенты	Опытная проба (мл)	Холодная проба (мл)
Сыворотка крови (разведенная 1:2)	0,1	—
Раствор НАД	0,3	0,3
Прогревают 5 минут при 37°C		
0,03 м раствор пироглутарнокислого натрия	0,8	0,8
0,45 М раствор молочнокислого натрия	0,2	0,2
Инкубировать пробы 15 минут при 37°C в водяном термостате		
Раствор 2,4-ДНФГ	0,5	0,5
Сыворотка крови разведенная (1:2)	—	0,1
Выдерживают 20 минут при комнатной температуре		
0,4 н раствор NaOH	5,0	5,0

Перемешивают и через 10 минут измеряют на ФЭКе при длине волны 500—560 нм (зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 10 мм, против холодной пробы.

Расчет активности ЛДГ проводят по калибровочному графику.

Построение калибровочного графика. Из стандартного раствора пировинограднокислого натрия готовят ряд разведений (табл. 2.8.) Затем в пробирки приливают по 0,5 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина. Далее стандартные пробы обрабатывают и измеряют, как опытные. Холостую пробу ставят, как стандартную, но вместо стандартного раствора добавляют дистиллированную воду.

Таблица 2.8

Данные для построения калибровочного графика

№	Рабочий стандартный р-р пирувата натрия (мг)	0,03 М р-р пировинограднокислого натрия (мл)	Н ₂ О дист	Содержание пировиноградной кислоты в стандартной пробе (мкг)	Активность ЛДГ	
					Е/л	мккат/л
1	0,1	0,8	0,5	0,88	20	0,33
2	0,2	0,8	0,4	1,76	40	0,66
3	0,4	0,8	0,2	3,52	80	1,33
4	0,6	0,8	—	5,28	120	2,0
5	0,8	0,6	—	7,04	160	2,66

Перерасчет активности ЛДГ на мкмоль пировиноградной кислоты на 1 литр сыворотки за 1 минуту инкубации при 37°С (Е/Л) производят по формуле:

$$E / L = \frac{C \cdot (30 \cdot 10^3)}{88 \cdot 15}, \text{ где}$$

- М — мкг пировиноградной кислоты в пробе;
- 30 · 10³ — коэффициент перерасчета на 1 л сыворотки;
- 15 — коэффициент перерасчета на 1 мин инкубации;
- 88 — вес 1 мкмоль пировиноградной кислоты в мкг.

Нормальные величины: 13,3—66,7 Е/Л (0,2—1,1 мккат/л; 0,8—4,0 мкмоль/мл.ч).

Влияющие факторы. ↑ Гемолиз (даже незначительный), обезболивающие препараты, клофибрат, дикумарин, этанол, наркотические анальгетики, сульфаниламиды, фториды. ↓ Оксалаты и мочевина.

Клинико-диагностическое значение. Активность фермента повышена при мегалобластной и парнициозной анемиях, инфаркте миокарда, некротических поражениях почек, гепатите, циррозе, панкреатите, злокачественных новообразованиях, лейкозах, гипоксии, лейкозах.

Примечания. При исследовании рекомендуется использовать только свежую сыворотку.

2.23. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ С ПРИМЕНЕНИЕМ ОПТИЧЕСКОГО ТЕСТА ВАРБУРГА (31)

Принцип. В результате окисления молочной кислоты с участием НАД образуются пировиноградная кислота и НАДН. Образующийся НАДН имеет спектр поглощения с максимумом в области длины волны 340 нм.

Реактивы. 1. 0,1 М раствор пирофосфатного буфера рН 8,8. 13,3 г $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_8$ растворяют в 100 мл дистиллированной воды, устанавливают рН до 8,8 с помощью 1 н НСl и доводят объем до 500,0 мл дистиллированной водой. Раствор стабилен при хранении в холодильнике.

2. 0,16 М лактат натрия. 180 мг лактата натрия растворяют в 10 мл дистиллированной воды. Раствор готовят перед началом работы.

3. 0,05 М НАД. 33 мг НАД растворяют в 1 мл дистиллированной воды. Раствор готовят перед началом работы.

Ход определения. Буфер, лактат, НАД и исследуемые сыворотки прогревают в течение 5 минут при температуре 30°С. После этого в кювету ФЭКа (ширина 10 мм) приливают реактивы и сыворотку в следующем порядке: пирофосфатный буфер 0,75 мл (для МКМФ-02) и 2,25 (для КФК-2), лактат натрия — соответственно 0,5 и 1,5 мл, НАД — 0,15 и 0,45 мл, сыворотку — 0,1 и 0,3 мл.

Сразу после добавления сыворотки содержимое кюветы перемешивают стеклянной палочкой, помещают в рабочее отделение ФЭКа, измеряют экстинцию (E_1) против дистиллированной воды и тотчас засекают время по секундомеру. Ровно через 3 минуты (точно!) отмечают экстинцию (E_2).

Расчет.

$$A = \frac{(E_2 - E_1) \cdot V_{\text{пр}}}{\epsilon \cdot l \cdot v_{\text{сыв}} \cdot t}, \text{ где:}$$

ϵ — средний молярный коэффициент светопоглощения ($3,1 \cdot 10^6$ моль⁻¹см²);

l — рабочая длина кюветы (1 см);

$v_{\text{пр}}$ — конечный объем пробы (МКМФ-02 — 1,5 мл; КФК-2 — 4,5 мл);

$v_{\text{сыв}}$ — объем сыворотки (МКМФ-02 — 0,1 мл; КФК-2 — 0,3 мл);

t — время инкубации реакционной смеси (3 минуты);

Конечная формула расчета активности ЛДГ:

$$A = 1613 \cdot (E_2 - E_1) \text{ Е/л}$$

Нормальные величины. 23 — 90 Е/л.

Примечание. 1. Данный метод сокращает время определения ферментативной активности в сравнении с методом Севела и Товарека, требует минимального количества реактивов, исключает необходимость построения калибровочного графика. 2. Метод позволяет проводить измерение на ФЭКе.

2.24. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ТРАНСАМИНАЗ АЛТ(К.Ф. 2.6.1.2) и АСТ(К.Ф.2.6.1.1) (ПО М-ДУ РАЙМАНА, ФРЕНКЕЛЯ, 1957)

Исследуемый материал. Сыворотка. Проба стабильна 24 часа при комнатной температуре и 1 неделю при 4°C.

Принцип. В результате переаминирования, происходящего под действием АСТ и АЛТ, образуется шавелевоуксусная и пировиноградная кислоты. Шавелевоуксусная кислота способна в процессе ферментативной реакции превращаться в пировиноградную кислоту. При добавлении 2,4-динитрофенилгидразина в щелочной среде образуется окрашенный гидразон пировиноградной кислоты, интенсивность окраски которого пропорциональна количеству образовавшейся пировиноградной кислоты.

Реактивы. 1. Раствор субстрата для определения АСТ, рН 7,4. В мерную колбу емкостью 100 мл вносят 2,66 г DL-аспарагиновой кислоты, 29,2 мг альфа-кетоглутаровой кислоты. После растворения в небольшом объеме дистиллированной воды добавляют 21 мл 1н раствора едкого натрия и 1,2 г двузамещенного фосфорнокислого натрия ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), однозамещенного фосфорнокислого калия (KH_2PO_4) — 0,2 г. Доводят рН до 7,4, добавляя по каплям 1 н раствор NaOH. Затем объем доводят до метки.

2. Раствор субстрата для определения АЛТ, рН 7,4. В мерную колбу емкостью 100 мл вносят DL-аланина — 1,78 г, альфа-кетоглутаровой кислоты — 29,2 мг, растворяют в небольшом количестве воды, добавляют двузамещенного фосфорнокислого натрия ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) — 1,2 г, однозамещенного фосфорнокислого калия (KH_2PO_4) — 0,2 г. При необходимости доводят объем до рН 7,4. Объем колбы доводят до метки.

Приготовленные субстраты для АСТ и АЛТ разливают по 5 — 10 мл в небольшие флаконы и сохраняют в замороженном виде в холодильной камере. Перед употреблением раствор должен полностью оттаять.

Примечание. Если вместо DL-аспарагиновой кислоты берется L-аспарагиновая кислота, а вместо DL-аланина — L-аланин, то навеска уменьшается в два раза.

3. Раствор 2,4-дифенилгидразина (2,4-ДНФГ). 19,8 мг 2,4-ДНФГ растворяют в 8,5 мл концентрированной соляной кислоты при нагревании на кипящей водяной бане в вытяжном шкафу. После остывания раствор количественно переносят в мерную колбу на 100 мл и доводят объем до метки. Раствор готов к использованию на второй день. Годен в течение 1 года.

4. 0,4 н раствор едкого натрия. 16 г NaOH растворяют в дистиллированной воде. Доводят объем до 1 литра.

5. Стандартный раствор пировинограднокислого натрия ($\text{C}_2\text{H}_3\text{C}_2\text{O}_4\text{Na}$). 11 мг кристаллического пирувата натрия помещают в мерную колбу на 100 мл, растворяют в небольшом количестве воды, доводят объем водой до метки. 1 мл раствора содержит 110 мкг пирувата натрия, что соответствует 88 мкг пировиноградной кислоты. Раствор используется для построения калибровочного графика.

Ход определения.

Ингредиенты	Опытная работа (мл)		Холостая проба (мл)
	АСТ	АЛТ	
Субстратный раствор (при 37°C)	0,5	0,5	0,5
Сыворотка крови	0,1	0,1	—

Перемешивают, помещают в сузовоздушный термостат при 37°C на 1 час.

2,4-ДНФГ	0,5	0,5	0,5
Сыворотка крови	—	—	0,1

Перемешивают, выдерживают 10 минут при комнатной температуре. Колориметрируют при длине волны 500—560 нм (зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 10 мм, против холостой пробы.

Расчет активности трансаминаз производят по калибровочному графику (табл. 2.9).

Таблица 2.9

Данные для построения калибровочного графика

№	0,9% NaCl	Станд. р-р пирувата натрия (мл)	Субстратный р-р для АСТ или АЛТ (мл)	Содержание пировиноградной кислоты		Активность трансаминаз, ммоль/ч.л.	
				мкг	ммоль	АСТ	АЛТ
1	0,1	0,05	0,45	4,4	0,05	0,5	1,0
2	0,1	0,10	0,40	8,8	0,10	1,0	2,0
3	0,1	0,15	0,35	13,2	0,15	1,5	3,0
4	0,1	0,20	0,30	17,6	0,20	2,0	4,0
5	0,1	0,25	0,25	22,0	0,25	2,5	5,0

В пробирки наливают по 0,5 мл раствора 2,4-ДФГ, далее пробы обрабатывают, как опытные. По результатам измерений строят калибровочный график, единый для АСТ и АЛТ.

Нормальные значения. АСТ—0,1—0,45 ммоль/ч.л. (1,7—7,5 Ед/л)

АЛТ—0,1—0,68 ммоль/ч.л. (1,7—11,3 Ед/л)

Влияющие факторы. ↑ Прием гепатотоксичных и вызывающих холестаза препаратов, внутримышечные инъекции (умеренное повышение).

Диагностическая значимость. Активность ферментов повышается при некрозе печеночных клеток любой этиологии, обширной травме скелетных мышц, тепловом ударе, миозите, миокардите, циррозе печени, инфаркте миокарда, дистрофии, миопатии, гемолитических болезнях.

2.25. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ (КФ 3.1.3.1) (МЕТОД KING, ARMSTRONG)

Принцип. Щелочная фосфатаза расщепляет финилфосфат с образованием фенола и фосфата. При этом, в результате взаимодействия фенола с 4-аминофеназоном, в присутствии перйодата натрия, образуется красное окрашивание с интенсивностью прямо пропорциональной активности фермента.

Исследуемый материал. Сыворотка. Немедленно охладить.

Реактивы. 1. Буферный раствор, рН 10,0. В мерной колбе емкостью 500 мл растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды 1,6 г карбоната натрия, 0,84 г бикарбоната натрия, 0,51 г 4-аминофеназона. Объем доводят до метки водой. Раствор стабилен при хранении в холодильнике в течение месяца.

2. Субстратно-буферный раствор. 64 мг динатриевой соли фенолфосфата растворяют в 50 мл буферного раствора. Готовят перед употреблением.

3. Окислительный раствор. 2,5 г перйодата натрия (NaIO_3) растворяют в 250 мл дистиллированной воды в мерной колбе на 500 мл и доводят водой до метки. Хранить в холодильнике.

4. Основной стандартный раствор фенола 50 ммоль/л. 470 мг фенола растворяют в 20—30 мл дистиллированной воды в мерной колбе емкостью 100 мл и доводят водой до метки.

5. Рабочий стандартный раствор фенола. 2,5 ммоль/л. 2,5 мл основного стандартного раствора (реактив 4) пере-

носят в мерную колбу емкостью 50 мл и доводят дистиллированной водой до метки. Стабилен в течение недели при хранении в холодильнике.

Ход определения.

Ингредиенты	Опытная проба (мл)	Холостая проба (мл)
Субстратно-буферный раствор	2,4	2,4
Довести до температуры 37°C		
Сыворотка крови	0,08	—

Перемешать, инкубировать 10 минут при 37°C в водяной бане.

Окислительный раствор	2,4	2,4
Сыворотка крови	—	0,08

Выдерживают 5 минут при комнатной температуре для развития окраски.

Колориметрируют при длине волны 500—560 нм в кюветках с толщиной слоя 10 мм против холостой пробы.

Расчет активности ЩФ производят по калибровочному графику. Для построения графика из рабочего раствора фенола (2,5 ммоль/л) готовят разведения в соответствии с таблицей 2.10.

В пробирки отбирают по 0,08 мл полученных стандартных растворов, добавляют 2,4 мл буферного раствора, 2,4 мл окислительного раствора, выдерживают 5 минут при комнатной температуре и колориметрируют в условиях, аналогичных опытной пробе.

Раствор сравнения: смешивают 0,08 мл дистиллированной воды, 2,4 мл буферного и 2,4 мл окислительного раствора.

Таблица 2.10

Данные для построения калибровочного графика

№	Стандартный раствор фенола (мл)	Дистиллированная вода (мл)	Активность фермента		
			ммоль/с.л.	мккат/л	Е/л
1	0,1	1,9	415	0,415	24,9
2	0,2	1,8	830	0,830	49,8
3	0,4	1,6	1660	1,660	99,6
4	0,8	1,2	3320	3,320	199,2
5	1,6	0,4	6640	6,640	398,4

Нормальные значения

	Е/л	мкат/л	нмоль/с.л.
Дети	72—378	1,2—6,3	1200—6300
Взрослые: муж.	54—137	0,9—2,29	900—2290
жен.	44—126	0,74—2,10	740—2100

Влияющие факторы. К повышению приводят альбумин, полученный из плацентарной плазмы, гепатотоксичные лекарственные препараты.

К понижению — фториды, оксалаты, фосфаты, соли цинка, марганец, цитраты, цианиды, соединения, содержащие сульфгидрильные группы, ЭДТА.

Примечания. 1. Сыворотка крови не должна быть гемолизированной; 2. При активности пробы выше 600 Е/л ее разбавляют 0,9% раствором хлорида натрия. Результат умножают на кратность разведения.

Клинико-диагностическое значение. ↑ Повышенный метаболизм в костной ткани (при заживлении переломов); гиперпаратиреоз, остеопороз. Заболевания почек: почечный рахит, обусловленный витамин-Д-резистентным рахитом, сочетающимся с вторичным гиперпаратиреозом. Заболевания костей: метастазы рака в кости, остеогенная саркома, миеломная болезнь. Заболевания печени: инфекционный мононуклеоз, внепеченочный холестаз, цитомегаловирусная инфекция у детей, холангит, печеночная желтуха, портальный цирроз, абсцесс печени. Другие заболевания: внепеченочный сепсис, язвенный колит, тиреотоксикоз, кишечные бактериальные инфекции.

↓ Гипотиреоз, цинга, выраженная анемия, кретинизм, накопление радиоактивных веществ в костях, гипофосфатаземия.

2.26. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПО ГИДРОЛИЗУ Р-НИТРОФЕНИЛФОСФАТА (метод Бессея, Лоури, Брока)

Принцип. Субстрат — р-нитрофенилфосфат натрия — гидролизует ферментом сыворотки крови с образованием р-нитрофенола, дающего в щелочной среде желтое окрашивание. Интенсивность окраски пропорциональна активности фермента.

Реактивы. 1. Субстратный раствор: 0,4% раствор р-нитрофенилфосфата натрия в 0,001 N растворе соляной кислоты рН 6,5 — 8,0.

2. Буферный раствор. 0,05 М глициновый буфер с добавлением катализатора $MgCl_2$ — 95 мг/л. 375 глицина и 10 мг $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ растворяют в 42 мл 0,1 н раствора NaOH и доводят объем дистиллированной водой до 100 мл.

Вместо глицинового буфера можно использовать 0,05 М вероналовый буфер, рН 10,5, с добавлением хлористого магния 95 мг/л. Реактив хранят в холодильнике.

3. Субстратно-буферный раствор для определения активности щелочной фосфатазы готовят смешиванием равных частей растворов 1 и 2. РН данного раствора должен быть 10,5.

4. 0,02 н раствор едкого натрия. Раствор готовят на дистиллированной воде, освобожденной от углекислого газа путем предварительного кипячения.

1. Стандартный раствор р-нитрофенола. Растворяют 69,6 мг химически чистого р-нитрофенола в 0,02 н растворе NaOH и доводят этим же раствором объем до 100 мл. 1 мл этого основного раствора, содержащего 5мкМ р-нитрофенола, доводят 0,02 н раствором NaOH до 100 мл. 1 мл полученного рабочего раствора содержит 0,05 мкМ р-нитрофенола.

Ход определения.

<i>Ингредиенты</i>	<i>Опытная проба (мл)</i>	<i>Контрольная проба (мл)</i>
Субстратно-буферный раствор Инкубируют 5 минут при 37°C	1,0	1,0
Сыворотка крови	0,1	—

Содержимое пробирок перемешивают и инкубируют 30 мин при 37°C. После инкубации пробирки переносят в ледяную баню

Сыворотка крови	—	0,1
NaOH 0,02 н	10,0	10,0

Через 5 минут пробы колориметрируют на ФЭКе при длине волны 400—420 нм (фиолетовый фильтр) в кювете, толщиной слоя 10 мм, против соответствующего контроля. Контроль ставится на каждую сыворотку.

Расчет. Находят разность экстинций между опытной и контрольной пробами и по калибровочной кривой получают результаты, выраженные в мкМ р-нитрофенола, высвобожденного из натриевой соли р-нитрофенилфосфата под действием щелочной фосфатазы сыворотки крови за 30 минут ферментной реакции. Для перерасчета на 1 мл

сыворотки крови и за время реакции 1 час результат умножают на 10 и на 2. При этом получают ответ в мкМ р-нитрофенола (на 1 мл/ч). Активность фермента, образующего в данных условиях 1 мкМ р-нитрофенола, соответствует 1 ед. Бессея, Лоури, Брока. Таким образом, выраженная в единицах Бессея активность щелочной фосфатазы численно равна количеству мкМ р-нитрофенола, которое выделилось бы в процессе часовой реакции при взаимодействии субстрата с 1 мл сыворотки.

Таблица 2.11

Данные к построению калибровочного графика для определения активности ЩФ

№	Стандартный раствор р-нитрофенола		0,02 н NaOH (мл)	Единицы Бессея, Лоури, Брока
	в мл	Содержание р-нитрофенола в пробе, мкМ		
1	1,0	0,05	10,1	1
2	2,0	0,10	9,1	2
3	3,0	0,15	8,1	3
4	5,0	0,25	6,1	5
5	7,0	0,35	4,1	7

Построение калибровочной кривой. К 1,2,3,5,7 мл рабочего стандартного раствора, содержащего соответственно 0,05; 0,10; 0,15; 0,25; 0,35 мкМ р-нитрофенола, добавляют NaOH 0,02 н до объема 11,1 мл. После 10-минутного стояния измеряют оптическую плотность против NaOH 0,02 н при фиолетовом светофилт্রে в кювете толщиной слоя 10 мм. Строят кривую, откладывая на оси ординат значения экстинкции, а на оси абсцисс — количество мкМ р-нитрофенола.

Примечание. Сыворотка крови не должна быть гемолизированной. Кровь для исследования нужно брать через несколько дней после прекращения приема сульфаниламидов и антибиотиков.

Норма активности ЩФ в сыворотке крови: дети — 1,0 — 6,0 ед. Бессея.

Взрослые — 1,0 — 3,0 ед.

2.27. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ

Принцип. Основан на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс.

Реактивы. 1. 4% раствор молибдата аммония;

2. 0,03% раствор перекиси водорода.

Ход определения.

<i>Ингредиенты</i>	<i>Опытная проба (мл)</i>	<i>Холодная проба (мл)</i>
0,03% р-р перекиси водорода	2,0	2,0
Сыворотка крови	0,1	—
Вода дистиллированная	—	0,1
Через 10 минут		
4% р-р молибдата аммония	1,0	1,0

Интенсивность развившейся окраски измеряют на спектрофотометре при длине волны 410 нм против контрольной пробы.

Расчет. Активность каталазы рассчитывают по формуле:

$$E = (A_{\text{хол}} - A_{\text{оп}}) \cdot V \cdot t \cdot K \text{ (мкат/л)}, \text{ где:}$$

E — активность каталазы в мкат/л;

$A_{\text{хол}}$ и $A_{\text{оп}}$ — экстинция холостой и опытной проб;

V — объем вносимой пробы (0,1 мл);

t — время инкубации (600 с);

K — коэффициент миллимолярной экстинции перекиси водорода, равный $22,2 \cdot 10^3 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Нормальные значения. $16,8 \pm 6,16$ мкат/л.

Клиническое значение. Повышена активность при заболеваниях печени, у больных с переломами трубчатых костей, при панкреатитах, холециститах, мозговых травмах.

Глава 3

ОБМЕН ЛИПИДОВ

Химическое строение липидов. Липиды — это неоднородная группа веществ, включающая в себя простые и сложные жиры. И те, и другие по химической структуре представляют собой сложные эфиры, состоящие из спирта и высших жирных кислот. Вся группа имеет общие физические свойства — нерастворимы в воде, растворимы только в органических растворителях. Липиды обладают общими биологическими функциями. Являясь основными компонентами биологических мембран, липиды влияют на их проницаемость и активность многих мембранных

ферментов, участвуют в передаче нервного импульса, со-
здании межклеточных контактов.

Структурная характеристика липидов. Классификация
липидов основана на структурных особенностях липидов.
Различают следующие основные классы липидов:

1. *Простые липиды.* В этот класс входят глицериды, пред-
ставляющие собой сложные эфиры глицерина и высших
жирных кислот и воска — сложные эфиры высших жир-
ных кислот и одно- или двухатомных спиртов.

2. *Сложные липиды.* В эту обширную группу входят:
а) фосфолипиды — липиды, содержащие помимо жирных
кислот и спирта, остаток фосфорной кислоты. Иногда в их
состав входят азотистые основания и другие компоненты;
б) гликолипиды; в) стероиды; г) другие сложные липи-
ды. К этому классу можно отнести и липопротенны.

3. *Предшественники и производные липидов.* Сюда отно-
сятся жирные кислоты, глицерол, стеролы, альдегиды жир-
ных кислот, углеводороды, жирорастворимые витамины и
гормоны.

Нейтральные жиры — это сложные эфиры трехатом-
ного спирта глицерина и жирных кислот. Глицерин пред-
ставляет собой бесцветную вязкую жидкость, сладкова-
тую на вкус, хорошо растворяющуюся в воде в любых со-
отношениях. Как трехатомный спирт, глицерин имеет в
своей молекуле три спиртовые группы (-ОН), по месту
которых и происходит его взаимодействие с жирными
кислотами. При этом, соединение может произойти сразу
с тремя молекулами жирных кислот — в этом случае об-
разуется триглицерид.

Триглицериды, в состав которых входит однородная жир-
ная кислота, называются простыми. Если в образовании
молекулы триглицерида участвовали различные жирные кис-
лоты, то такой триглицерид называется смешанным. При
этерификации жирными кислотами только двух спиртовых
групп глицерина образуется диглицерид, а при этерифика-
ции только одной спиртовой группы — моноглицерид.

Жирные кислоты, входящие в состав природных триг-
лицеридов, представляют собой, как правило, неразветв-
ленную цепь атомов с одной карбоксильной группой. Уг-
леводородный радикал жирной кислоты содержит четное
число атомов углерода. Встречаются жирные кислоты
насыщенные и ненасыщенные.

Насыщенные жирные кислоты имеют углеводородный
радикал, в котором все атомы углерода насыщены водо-
родом. Из них в организме чаще обнаруживаются:

масляная кислота — $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_2 - \text{COOH}$
 пальмитиновая кислота — $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{14} - \text{COOH}$
 стеариновая кислота — $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{16} - \text{COOH}$
 лигноцериновая кислота — $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{22} - \text{COOH}$.

Ненасыщенные жирные кислоты в углеводородном радикале содержат отдельные атомы углерода, имеющие свободные химические связи, не занятые водородом. В этом случае между соседними атомами углерода образуются двойные связи. Такие кислоты в химическом отношении более активны, так как по месту двойных связей может присоединиться новое химическое вещество. Ненасыщенные жирные кислоты, которые имеют больше одной двойной связи, в организме не синтезируются, поступают только с пищей. Поэтому они называются незаменимыми. Входят в состав витамина F. Полиненасыщенным жирным кислотам придается особое значение в клинической практике для профилактики и борьбы с атеросклерозом. Объясняется это тем, что полиненасыщенные жирные кислоты способствуют уменьшению концентрации в плазме крови липопротеидов низкой плотности, которые являются транспортной формой холестерина. Соответственно, снижается и концентрация самого холестерина в крови. Полиненасыщенными жирными кислотами богаты растительные масла. Кроме того, ненасыщенные жирные кислоты являются предшественниками простогландинов.

Простогландины (ПГ) — это биологически активные вещества, по характеру воздействия на организм сравнимые с гормонами. Однако, в отличие от гормонов ПГ обладают локальным эффектом действия, т.е. непосредственно в месте своего образования. Обнаружены ПГ практически во всех органах и тканях организма человека и животных (за исключением эритроцитов), хотя, первоначально предполагаемым методом их синтеза считалась только предстательная железа, что нашло свое отражение в названии этой группы веществ. ПГ влияют на все виды обмена веществ, гемодинамику почек, сократительную деятельность гладкой мускулатуры, тормозят секреторную функцию желудка и т.д.

По химической структуре ПГ представляют собой циклические полиненасыщенные жирные кислоты. Различают четыре группы ПГ: А, В, С, Е, которые включают в себя 14 разных ПГ. Предшественником ПГ является арахидоновая кислота.

Жирные кислоты определяют физико-химические свойства триглицеридов, в состав которых они входят. Так,

жиры животного происхождения, состоящие преимущественно из насыщенных жирных кислот, имеют более высокую точку плавления и при комнатной температуре остаются твердыми. Жиры растительного происхождения — масла, в своем составе содержат, в основном, ненасыщенные жирные кислоты, что определяет их низкую точку плавления и жидкую консистенцию при обычной температуре.

Нейтральные жиры человеческого организма встречаются в форме протоплазматического и резервного жира.

Протоплазматический жир входит в состав клеток всех органов, его содержание остается стабильным в течение всей жизни. Резервный жир запасается в организме преимущественно в жировых депо — подкожной клетчатке, околопочечной области, брызжейке, сальнике и подвержен значительным колебаниям в зависимости от возраста, пола, условий питания, двигательной активности.

Триглицериды, циркулирующие в крови, могут быть как экзогенного, так и эндогенного происхождения. Экзогенные триглицериды — это триглицериды пищи, поступающие в кровь в результате пищеварения. Эндогенные триглицериды — это специфические триглицериды для данного организма, синтезированные в самом организме.

СЛОЖНЫЕ ЛИПИДЫ

Фосфолипиды. Подразделяются на глицериды и неглицериды. К первым относятся вещества, в которых спиртом является глицерин. Наиболее интересными представителями фосфолипидов — глицеридов являются *лецитин и кефалин*. В состав этих веществ, кроме глицерина и двух молекул жирных кислот, входит фосфорная кислота и азотистое основание. В лецитине азотистое основание — холин, а в кефалине — этаноламин. Оба этих вещества входят в структуру клеточных и субклеточных мембран, в значительном количестве находятся в тканях мозга, нервов, печени, сердца.

Фосфолипиды — неглицериды, как явствует из их названия, в качестве спирта содержат уже не глицерин, а другие спирты — ненасыщенный аминоспирт — сфингозин, либо сахароспирт — инозит. Фосфолипиды, имеющие сфингозин, называются сфинголипидами. Большую часть их составляют сфингомиелины. Они участвуют в образовании оболочек нервных клеток. Фосфолипиды, содержащие инозит, найдены в организме в мозге, печени,

легких. К этой группе фосфолипидов относится кардиолипин. Он входит в состав мембран клеточных органелл — митохондрий.

Фосфолипиды, циркулирующие в крови, в числе других функций выполняют и роль стабилизаторов холестерина в плазме крови. Они препятствуют кристаллизации холестерина, с выпадением его из плазмы, и осаждению на стенках кровеносных сосудов. Нормальное соотношение фосфолипидов и холестерина в плазме составляет 1,5 : 1,0, то есть концентрация фосфолипидов в норме в полтора раза больше, чем концентрация холестерина. Физиологические пределы колебаний фосфолипидов в сыворотке (плазме) крови составляют 6,63—10,53 ммоль/л.

Гликолипиды. Содержат аминоспирт сфингозин, жирную кислоту и углеводные включения. Фосфорная кислота и азотистые основания отсутствуют. Гликолипиды подразделяют на три группы: цереброзиды, сульфатиды (содержат остаток серной кислоты), ганглиозиды. Обнаружены в мембранах клеток преимущественно мозговой ткани, причем цереброзиды и сульфатиды в белом веществе, а ганглиозиды — в сером веществе мозга.

Стероиды. Основным элементом структуры стероидов является циклопентанпергидрофенантрен, состоящий из конденсированных трех шестичленных и одного пятичленного колец. Такая стероидная структура обнаружена в стероидных гормонах, желчных кислотах, витамине Д и холестерине. Наиболее распространенными среди стероидов следует назвать стерины. Главным представителем стеринов является холестерин. Это циклический спирт, в основе которого тоже лежит циклопентанпергидрофенантеновая структура, имеющая одну спиртовую группу. К ней может присоединяться жирная кислота с образованием эфирсвязанного холестерина (холестерида). В такой форме холестерин значительно легче выводится из организма. Холестерин входит в состав клеточных мембран. Является предшественником целого ряда биологически активных веществ, таких как половые гормоны, кортикостероидные гормоны, витамин Д₃, желчные кислоты.

Холестерин, имеющийся в крови, приблизительно, на 2/3 состоит из этерифицированной формы. Методы исследования, доступные в клинических лабораториях, позволяют определять только общее содержание холестерина. Измерить отдельно концентрации этерифицированной и неэтерифицированной формы на сегодняшний день не представляется возможным. Нормальное содержание об-

щего холестерина в сыворотке (плазме) крови составляет 4,42—7,02 ммоль/л.

Биологическая роль липидов

1. *Энергетическая.* При полном распаде 1 г жира выделяется 9,3 ккал энергии, что более чем в два раза выше по сравнению с углеводами и белками. Энергообеспечение организма за счет жиров происходит, в основном, при дефиците углеводов в организме, либо при ситуациях, требующих от организма повышенных энергозатрат. В этих целях используется резервный жир жировых депо.

2. *Пластическая.* Жиры и, прежде всего, сложные жиры, участвуют в построении мембран клеток всех органов и тканей организма. Являются предшественниками ряда биологически активных веществ — гормонов, витаминов, желчных кислот.

3. *Защитная.* Подкожно-жировая клетчатка предохраняет организм от переохлаждения. Жиры смазывают кожу, предупреждая ее высыхание и растрескивание. Жиры защищают внутренние органы от механических повреждений (жировые капсулы вокруг почек, глазных яблок).

Переваривание жиров в желудочно-кишечном тракте. Расщепление нейтральных жиров осуществляет группа ферментов, известных под общим названием липаз. В зависимости от места синтеза в организме различают липазы: желудочную, панкреатическую, кишечную, клеточную. Они обладают неодинаковой ферментной активностью, но результат их воздействия на триглицериды однотипный — триглицериды расщепляются на глицерин и высшие жирные кислоты.

В слюне липаза отсутствует, поэтому в ротовой полости переваривание жиров не происходит. Начинается процесс пищеварительного расщепления триглицеридов в желудке под воздействием желудочной липазы. Но активность ее невелика из-за сильно кислой реакции содержимого желудка и отсутствия условий для эмульгирования жиров. Поэтому желудочная липаза воздействует только на хорошо эмульгированные жиры, а в таком виде в желудок могут поступать только жиры молока и яичного желтка. Желудочная липаза имеет преимущественное значение у детей грудного возраста при вскармливании молоком.

Основное расщепление триглицеридов происходит в верхних отделах тонкого кишечника под действием липазы, продуцируемой поджелудочной железой. В этом про-

цессе принимает участие также кишечная липаза, но активность ее незначительная. Поджелудочная железа выделяет в кишечник сок, богатый бикарбонатами, что создает оптимальную для липазы слабо щелочную реакцию среды. Панкреатическая липаза выделяется в кишечник в неактивном состоянии. Ее активация происходит под влиянием желчных кислот, поступающих в кишечник в составе желчи из печени.

Фосфолипиды гидролизуются в тонком кишечнике под воздействием панкреатических фосфолипаз на составные компоненты: спирт, жирные кислоты, азотистое основание и фосфорную кислоту.

Продукты первичного синтеза: триглицериды, фосфолипиды, холестерин, там же, в клетках кишечника соединяются с небольшим количеством белка и образуют хиломикроны. Это стабильные сферические частички диаметром от 100 до 5000 нм. Содержание триглицеридов в хиломикронах преобладает и может достигать до 80% всей их массы. Из-за относительно крупного диаметра хиломикроны вначале поступают в лимфатические сосуды кишечника, затем в грудной лимфатический проток и оттуда в венозную кровь. Лишь небольшая часть наиболее мелких хиломикронов, состоящих из липидов с короткими радикалами жирных кислот, могут непосредственно всасываться через капиллярную стенку кровеносных сосудов кишечника и поступать в систему воротной вены печени. Насыщение крови хиломикронами — алиментарная гиперлипемия, наступает уже через 1—2 часа после приема пищи и достигает максимума через 2—3 часа. Если в это время взять кровь из вены, то сыворотка будет иметь молочновидный характер, это так называемая хилезная сыворотка. Хилезность обусловлена отражением света крупными жировыми шариками, какими являются хиломикроны. Просветляется сыворотка крови, т.е. освобождается от хиломикронов, приблизительно через 3—4 часа после приема пищи. Время просветления зависит от количества жиров, принятых с пищей. Наибольшую роль в этом процессе, как и в жировом обмене вообще, играют печень и жировая ткань.

ЛИПИДЫ ПЛАЗМЫ КРОВИ

Липопротеиды. В плазме крови можно обнаружить все типы липидов, а также продукты их превращения — свободные жирные кислоты (СЖК) и кетоновые тела. Особенностью циркуляции липидов в крови, связанной с их

нерастворимостью в воде, является то, что и триглицериды, и холестерин, и фосфолипиды в свободном виде в плазме крови не существуют. Они связаны с белками плазмы — апопротеинами, образуя липид-белковые комплексы, известные под названием липопротеиды (ЛП). ЛП — это транспортная форма липидов в крови, водорастворимость этих комплексов обеспечивает активное включение липидов плазмы в процессы метаболизма. Все ЛП содержат в себе одновременно триглицериды, фосфолипиды и холестерин, но в различных количественных соотношениях. Различаются между собой ЛП также по размеру комплексов, по плотности, по группам апопротеинов и величине электрического заряда апопротеинов.

При разделении методом электрофореза получают следующие классы ЛП (в порядке продвижения их от линии старта): хиломикроны, пре- β -ЛП, β -ЛП, α -ЛП. Электрофоретическая номенклатура получила наибольшее распространение в клинической практике, так как на ней базируется классификация типов гиперлипидемий по Фредериксону, принятая ВОЗ.

Все классы ЛП в большей или меньшей степени содержат холестерин. Но наиболее атерогенными из них являются ЛПНП (липопротеиды низкой плотности) и ЛПВП (липопротеиды промежуточной плотности). Единственный неатерогенный класс ЛП — это ЛПВП (липопротеиды высокой плотности). Более того, они активно участвуют в выведении холестерина из клеток путем этерификации его, что облегчает доставку холестерина в печень, откуда он в составе желчи выводится в кишечник и удаляется из организма. Все другие ЛП, наоборот, транспортируют холестерин в клетки. Кроме того, ЛПВП являются транспортной формой фосфолипидов в крови. А мы уже отмечали, что ФЛ способствуют поддержанию холестерина во взвешенном состоянии, препятствуя его выпадению из кровяного русла.

Свободные жирные кислоты (СЖК). Свободные жирные кислоты используются в организме как источник энергии при дефиците углеводов, либо при состояниях организма, сопровождающихся повышенной затратой энергии. Главным эндогенным источником СЖК служит резервный жир, содержащийся в жировых депо, в меньшей мере фосфолипиды мембран клеток. Принято считать, и это очень характерное сравнение, что триглицериды жировых депо выполняют в обмене липидов такую же роль, как гликоген печени в обмене углеводов, а СЖК по своей

роли напоминают глюкозу, которая образуется в процессе фосфорилиза гликогена. Освобождающиеся в процессе липолиза триглицеридов СЖК поступают в кровяное русло, связываются с белком плазмы альбумином и транспортируются к клеткам различных органов и тканей. Поступая внутрь клеток, СЖК подвергаются там β -окислению с образованием необходимой для жизнедеятельности организма энергии. Эти процессы происходят внутри клеток всех тканей, за исключением ткани головного мозга. Энергетическое питание головного мозга в экстремальных ситуациях обеспечивается за счет кетоновых тел. Количественное содержание СЖК в плазме крови невелико, в норме оно составляет 0,08—0,3 г/л. В нормально функционирующем организме накопление их не происходит, СЖК ядовиты, особенно, для ткани головного мозга. Увеличивается их образование только в случае необходимости и используются они сразу по мере своего синтеза. Регулируется этот процесс ЦНС и эндокринной системой. Патологическое увеличение концентрации СЖК в крови — гиперлипидемия, имеет место при диабете, после введения адреналина и глюкокортикоидов, а также при нефрозах и голодании.

Кетоновые тела. Под термином “кетоновые тела” подразумевают ацетоуксусную кислоту, β - оксимасляную кислоту и ацетон. Образуются кетоновые тела в печени. Основной путь их синтеза начинается с ферментативного превращения двух молей ацетилкоэнзима А (ацетил-КоА) в ацетоацетил-КоА, к нему присоединяется еще одна молекула КоА и образуется ОМГ-КоА (β -окси- β - метилглутарил-КоА). Последний расщепляется на ацетил-КоА и ацетоуксусную кислоту. Ацетоуксусная кислота частью восстанавливается в β -оксимасляную кислоту, а частью декарбоксилируясь, образует ацетон. Из печени кетоновые тела током крови доставляются к клеткам различных тканей, где окисляются в цикле Кребса с освобождением энергии.

Усиливается процесс образования кетоновых тел при недостатке в организме углеводов, когда главным источником энергии являются тканевые резервы жиров. Такие условия возникают при голодании или при рвотах, при сахарном диабете. В последнем случае, несмотря на гипергликемию, из-за дефицита инсулина глюкоза не поступает внутрь клеток и поэтому не может обеспечить пополнение энергоресурсов организма.

Кетонемия является, как бы, защитной реакцией организма, которая поддерживает энергетический гомеостаз.

Кетоновые тела обеспечивают энергией все ткани организма, кроме печени, а для головного мозга являются единственным источником энергии (в условиях отсутствия глюкозы). Предполагают, что образование кетоновых тел действует как часть регуляторного механизма с обратной связью, предотвращая мобилизацию жирных кислот из жировых депо.

При кратковременном увеличении кетоновых тел компенсаторные возможности организма предотвращают развитие ацидоза (сдвиг реакции внутренней среды организма в кислую сторону). Но длительная чрезмерная продукция кетоновых тел, когда ткани не успевают их утилизировать, приводит к снижению концентрации бикарбонатов в плазме и развитию ацидоза, который блокирует нормальное течение всех видов обмена веществ.

ПАТОЛОГИЯ ОБМЕНА ЛИПИДОВ

1. Нарушение процессов переваривания и всасывания жиров. Может быть связано с недостаточным поступлением панкреатической липазы в кишечник, либо с нарушением выделения желчи в кишечник. В этих случаях полностью или частично страдает процесс пищеварительного расщепления жиров. Воспалительные заболевания желудочно-кишечного тракта (энтериты, энтероколиты) блокируют процесс нормального всасывания продуктов расщепления жира.

В перечисленных ситуациях основная масса жира, поступившего с пищей, теряется с калом (стеаторея), который приобретает характерный серовато-белый цвет.

2. Жировая инфильтрация печени. Развивается в результате переполнения гепатоцитов жировыми каплями, что приводит к разрушению клеток и образованию в печени жировых кист. Со временем жировые кисты обрастают соединительной тканью, развивается жировая дистрофия печени. Это может быть связано как с чрезмерным поступлением жиров с пищей, так и с процессами, усиливающими липолиз жиров в жировых депо (стрессы, злоупотребления алкоголем, заболевания, истощающие запасы гликогена в печени — хронические инфекции, туберкулез, сахарный диабет, голодание).

3. Кетонемия. Кетонурия.

4. Ожирение. Патология, связанная с повышенным отложением жира во всем организме. В этиологии заболевания играет роль энергетический дисбаланс, когда коли-

чество энергии, поступающей в организм в составе пищи, намного превышает расход энергии в организме. Ожирение может также развиваться в результате гормональных нарушений, связанных с усилением процессов синтеза жира.

5. Атеросклероз. Это общее заболевание организма, связанное не только с поражением артерий, но и нарушением всего обмена веществ. Предрасполагают к развитию атеросклероза целый ряд факторов: отягощенная наследственность, длительные нервные напряжения, гипертония, ожирение, сахарный диабет, курение, адинамия. Хотя в этом плане разработано несколько гипотез, отправными моментами в которых являются: избыток липидов, недостаток антиоксидантов, аутоимунные процессы. Однако, мнения ученых сходятся в том, что одним из главных факторов в развитии атеросклероза является длительная гиперхолестеринемия.

Гиперлиппротеидемии, методика типирования. Под термином гиперлиппротеидемии (ГЛП) понимают — повышение содержания определенных классов ЛП в плазме крови. ГЛП могут быть первичные — связанные с наследственной патологией и вторичные, возникающие на фоне заболеваний внутренних органов.

В соответствии с принятой ВОЗ классификацией Федриксона и соавт. (1965г.) различают пять типов ГЛП (таблица 3.1.)

Таблица 3.1.

Классификация Федриксона

Тип ГЛП	Электрофоретическая картина	Нарастающие липопротеиды
I	Повышение хиломикронов	Хиломикроны
II A	Повышение β -липопротеидов	ЛПНП
II B	Повышение пре- β -липопротеидов и β -липопротеидов	ЛПОНП ЛПНП
III	Широкая β -полоса	ЛПНП
IV	Повышение пре- β -липопротеидов	ЛПОНП
V	Повышение хиломикронов и пре- β -липопротеидов	Хиломикроны ЛПОНП

Для установления типа ГЛП в лаборатории проводят исследование сыворотки крови пациента. Сыворотка исследуется визуально и химически. Визуально сыворотка

оценивается на наличие мутности сразу после взятия крови и через 24 часа после взятия крови и отстаивания сыворотки в холодильнике. Химически исследуется комплекс тестов, объединенных в, так называемую, липидограмму. Из числа обязательных тестов в липидограмму входят: триглицериды, общий холестерин, холестерин α -липопротеидов. Эти тесты исследуются химическим путем, а на их основе рассчитываются по формулам показатели, характеризующие концентрацию холестерина β -липопротеидов, пре- β -липопротеидов и коэффициент атерогенности. Как правило, такой подход к типированию является достаточным для установления типа нарушения липидного обмена. Непосредственно методики и формулы для расчетов приведены ниже, в разделе "методы исследования". Приведенная липидограмма может быть выполнена любыми доступными в лабораториях тестами: общими липидами, фосфолипидами, β -липопротеидами, электрофорезом липидных фракций. Но, за редким исключением, сколько-нибудь существенной дополнительной информации в ход типирования они не вносят. Приводим характерные изменения лабораторных показателей для каждого из пяти типов ГЛП.

I тип — гиперхиломикронемия. Редко встречающийся тип ГЛП, обусловленный генетической патологией. Сыворотка крови сразу после взятия имеет молочновидный характер, резко хилезная. После отстаивания в течение суток в холодильнике в сыворотке всплывают хиломикроны, образуя кремообразный слой, под которым сама сыворотка остается прозрачной. Химически определяется резко увеличенная концентрация триглицеридов. Общий холестерин, холестерин β -ЛП, пре- β -ЛП и α -ЛП в норме. Коэффициент атерогенности в норме.

Клинически этот тип проявляется ксантоматозом — множественным появлением ксантом, которые представляют собой выпуклые образования на коже величиной от булавочной головки до лесного ореха, вначале оранжевого цвета, а затем соломенно-желтые. Сопутствует панкреатит, сахарный диабет.

II тип подразделяется на 2 подтипа: IIA и IIB. Подтип IIA — гипер- β -липопротеидемия. Сыворотка крови после взятия и после отстаивания 24 часа в холодильнике прозрачная. Химически определяется значительно увеличенная концентрация общего холестерина и холестерина β -ЛП, которая, однако, по отношению к общей массе β -ЛП не превышает границ нормы (45% от всей массы β -

ЛП). Триглицериды, холестерин пре- β -ЛП и α -ЛП в пределах нормы. Коэффициент атерогенности увеличен.

Подтип II Б — гипер-пре- β и β -липопротеидемия. Сыворотка крови после взятия слегка мутная, либо опалесцирующая, после отстаивания в течение суток в холодильнике характер мутности не изменяется. Химически исследуется значительно увеличенная концентрация общего холестерина, холестерина β -ЛП.

Незначительно увеличены триглицериды и холестерин пре- β -ЛП. Холестерин α -ЛП в норме. Коэффициент атерогенности увеличен.

Клинически II тип проявляется атеросклерозом, ИБС.

III тип — характеризуется появлением в крови липопротеидов промежуточной плотности (ЛППП), не имеющих у здорового человека. Сопровождается этот тип ЛПП появлением перегруженных холестерином β -ЛП. Содержание холестерина по отношению к общей массе β -ЛП значительно превышает верхний предел нормы (45%). Это можно установить, дополнив липидограмму исследованием β -ЛП по методу Бурштейна—Самая. Если проводится электрофорез липидных фракций, то ЛППП проявляются на электрофореграмме в виде широкой полосы, образующейся от слияния пре- β -ЛП и β -ЛП. При визуальной оценке сыворотка крови сразу после взятия может иметь незначительную мутность, характер которой не изменяется после суточного отстаивания в холодильнике. Химически определяется значительно увеличенная концентрация общего холестерина и холестерина β -ЛП, превышающая, как отмечалось, соотношение с общей массой β -ЛП. Незначительно увеличены триглицериды и холестерин пре- β -ЛП. Холестерин α -ЛП в норме. Коэффициент атерогенности увеличен.

Клинически III тип проявляется атеросклерозом, ИБС, облитерирующим эндартеритом и гангренами конечностей, ксантоматозом.

IV тип — гипер-пре- β -липопротеидемия. Сыворотка крови после взятия мутная, вплоть до хилезной. После 24-часового отстаивания в холодильнике характер мутности не изменяется. Химически определяются значительно увеличенные концентрации триглицеридов и холестерина пре- β -ЛП. Общий холестерин в норме или незначительно увеличен. Холестерин β -ЛП в норме, либо незначительно увеличен. Холестерин α -ЛП в норме. Коэффициент атерогенности в норме, либо незначительно увеличен.

Клинически IV тип сочетается с сахарным диабетом, ожирением, ИБС, атеросклерозом, отмечаются отдельные ксантомы в коже.

V тип — гиперхиломикронемия и гипер-пре- β -липопротеидемия. Сыворотка крови после взятия имеет молочно-белый характер, резко хилезная. После отстаивания в холодильнике в течение 24 часов в сыворотке всплывает кремообразный слой хиломикронов, под ним сыворотка остается мутной. Химически определяется резко увеличенная концентрация триглицеридов и холестерина пре- β -ЛП. Общий холестерин в норме, холестерин β -ЛП и α -ЛП в норме. Коэффициент атерогенности в норме или незначительно увеличен.

Клинически V тип проявляется ксантоматозом, увеличением печени и селезенки, панкреатитом. Ишемическая болезнь сердца и атеросклероз наблюдаются редко.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА

3.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТРИГЛИЦЕРИДОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПО ЦВЕТНОЙ РЕАКЦИИ С АЦЕТИЛАЦЕТОНОМ

Принцип. Триглицериды экстрагируют из сыворотки крови смесью гептана и изопропанола. Освобожденный в результате щелочного гидролиза триглицеридов глицерин окисляют до формальдегида метапериодатом натрия. Формальдегид образует с ацетилацетоном окрашенное соединение (3,5-диацетил, 1,4-дигидролутидин), интенсивность которого пропорциональна концентрации триглицеридов.

Реактивы.

1. Гептан, хч.
2. Изопропиловый спирт, хч.
3. Серная кислота, чда, хч, 0,04М. К небольшому количеству дистиллированной воды добавляют 2,2 мл концентрированной серной кислоты, смешивают и после охлаждения доводят объем дистиллированной водой до 1 л.

4. Едкий калий, чда, хч, 17,5г КОН растворяют в 50 мл дистиллированной воды. Раствор стабилен в течение 2—3 месяцев при хранении в посуде из темного стекла при комнатной температуре.

5. Натрий йоднокислый мета (метапериодат натрия Na IO₃).

6. Уксусная кислота 5%. 5 мл ледяной уксусной кислоты помещают в мерную колбу на 100 мл и доводят до метки дистиллированной водой.

7. Периодатный реактив. 0,6 г NaIO_4 растворяют в 100 мл 5% раствора уксусной кислоты. Реактив стабилен в течение 2—3 месяцев при хранении в посуде из темного стекла при комнатной температуре.

8. Аммоний уксуснокислый, чда, хч 2М. 154,0 г уксуснокислого аммония растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды и доводят объем до 1 л, рН 8,6.

9. Ацетилацетон, чда.

10. Ацетилацетоновый реактив. 1,5 мл ацетилацетона доводят до 200 мл 2М раствором уксуснокислого аммония. Реактив стабилен в течение 2—3 месяцев при хранении в посуде из темного стекла, в холодильнике.

11. Стандартный раствор триолеина, 2,3 ммоль/л. Растворяют 200 мг триолеина в изопропиловом спирте в мерной колбе на 100 мл.

Ход определения.

Компоненты	Опытная проба, мл	Стандартная проба, мл	Холодная проба, мл
Сыворотка	0,5	—	—
Вода дистиллированная	—	0,5	0,5
Стандартный раствор	—	0,5	—
Гептан	2	2	2
Изопропиловый спирт	3,5	3,5	3,5
Серная кислота 0,04 ммоль/л	1	1	1

Перемешивают 20 секунд, оставляют стоять на 5 мин, центрифугируют 10 мин

Верхний слой жидкости	0,4	0,4	0,4
Изопропиловый спирт	2	2	2
Едкое кали, раствор	1 капля	1 капля	1 капля

Перемешивают 15 секунд, нагревают на водяной бане при 70°C 10 мин и после охлаждения добавляют:

Периодатный реактив	0,2	0,2	0,2
Ацетилацетоновый реактив	1,0	1,0	1,0

Нагревают 10 мин на водяной бане при 70°C и сразу измеряют в кювете 5 мин при длине волны 400—500 нм (синий светофильтр) против холодной пробы.

Расчет проводят по формуле:

$$\begin{array}{l} \text{Концентрация} \\ \text{триглицеридов} \\ \text{(ммоль/л)} \end{array} = \frac{E_{\text{оп}} \cdot C_{\text{к}} \cdot K}{E_{\text{ст}}}$$

где: $E_{\text{оп}}$ — экстинция опытной пробы,
 $E_{\text{ст}}$ — экстинция стандартной пробы,
 $C_{\text{к}}$ — концентрация стандартного раствора в мг на 100 мл (200,0),
 K — коэффициент пересчета в единицы СИ — мг/100 мл в ммоль/л равен $10/875 = 0,11$ (10 пересчет на 1 л сыворотки, 875 относительная молекулярная масса триолеина).

Нормальные величины: 0,55—1,65 ммоль/л (50—150 мг/100 мл).

3.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТРИГЛИЦЕРИДОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ (ВАРИАНТ МЕТОДА М.ФЛЕТЧЕР, 1968).

Принцип. Триглицериды экстрагируют из сыворотки крови изопропанолом с одновременным выведением из реакционной смеси фосфолипидов путем осаждения их оксидом алюминия. Триглицериды гидролизуются щелочью. Образующийся при этом глицерин окисляется до формальдегида с помощью метапериодата натрия. Формальдегид определяют по цветной реакции с ацетилацетоном. Интенсивность окраски реакционной смеси пропорциональна содержанию триглицеридов.

Реактивы.

1. Изопропиловый спирт.
2. Окись алюминия (Al_2O_3) по Брокману.
3. 10% раствор едкого кали (КОН). 10,0 г КОН растворяют в 75 мл дистиллированной воды, осторожно добавляя гранулы щелочи в воду, перемешивая и охлаждая. Затем объем раствора доводят до 100 мл изопропанолом. Реактив стабилен при хранении в сосуде из темного стекла при комнатной температуре.
4. Окислительный реактив. 7,7 г безводного ацетата аммония ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) растворяют в 70 мл воды. Прибавляют 6,0 мл ледяной уксусной кислоты (CH_3COOH) и 65 мг метапериодата натрия (NaIO_4). Можно использовать KIO_4 . Объем реактива доводят до 100 мл дистиллированной водой.

Устойчив при хранении в посуде из темного стекла в холодильнике.

5. Ацетилацетоновый реактив. 0,4 мл ацетилацетона растворяют в 100 мл изопропанола. Стабилен при хранении в посуде из темного стекла в холодильнике.

6. Стандартный раствор триолеина — 2,3 ммоль/л. В мерной колбе на 100 мл растворяют 200 мг триолеина в изопропиловом спирте.

Ход определения.

Реакцию проводят в пробирках с притертыми пробками

Ингредиенты	Опытная проба, мл	Стандартная проба, мл	Холостая проба, мл
Сыворотка крови	0,15	—	—
Стандартный раствор	—	0,15	—
Дистиллированная вода	—	—	0,15
Изопропанол	5,0	5,0	5,0

Мерной ложечкой во все пробирки добавляют по 0,5 г окиси алюминия. Содержимое пробирок встряхивают в течение 2—3 минут. Затем центрифугируют 10 минут при 3000 об/мин.

Центрифугат	2,0	2,0	2,0
Раствор КОН	0,6	0,6	0,6

Перемешивают. Пробирки закрывают пробками и помешают на 5 минут в водяную баню при температуре 65—70°C. Охлаждают.

Окислительный реактив	1,5	1,5	1,5
Ацетилацетоновый реактив	1,5	1,5	1,5

Перемешивают. Пробирки закрывают пробками и помещают на 15 минут в водяную баню при температуре 65—70°C. Пробы охлаждают и колориметрируют при длине волны 405—430 нм (синий светофильтр) в кювете с толщиной слоя 10 мм против холостой пробы.

Расчет. Производят по простой арифметической пропорции, по формуле:

$$T_{г} \text{ (ммоль/л)} = \frac{E_{оп} \cdot 2,3}{E_{ст}}, \text{ где}$$

2,3 — концентрация триолеина (ммоль/л) в стандартном растворе.

Норма. Содержание триглицеридов в сыворотке крови в среднем колеблется в пределах 0,55—1,65 ммоль/л. Но

верхняя граница нормы зависит от возраста, пола, особенностей жизни.

Примечание. При исследовании концентрации триглицеридов в сыворотке крови любым из приведенных методов следует соблюдать следующие условия:

1. Пробирки должны быть обезжирены предварительным ополаскиванием изопропанолом.

2. При концентрации триглицеридов выше 4,5 ммоль/л сыворотку разводят дистиллированной водой 1:1, исследование повторяют, а результат умножают на кратность разведения (2).

3. Для выполнения исследования по методу Флетчера удобно пользоваться готовыми наборами реактивов фирмы "Лахема".

Клинико-диагностическое значение.

Исследование концентрации триглицеридов используется в комплексе с другими тестами для типирования гиперлиппротеинемий.

Кроме того, возрастание содержания триглицеридов в сыворотке крови определяется при нефротическом синдроме, гипотиреозе, беременности, жировой инфильтрации печени, панкреатите, алкоголизме. Концентрация триглицеридов снижается при гипертиреозе.

3.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО ХОЛЕСТЕРИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПО РЕАКЦИИ ЛИБЕРМАН—БУРХАРД (МЕТОД ИЛЬКА)

Принцип. Холестерин в присутствии уксусного ангидрида и смеси уксусной и серной кислот дает зеленое окрашивание с интенсивностью, пропорциональной концентрации холестерина.

Реактивы.

1. Реактив Либерман—Бурхард. Смешивают 1 часть ледяной уксусной кислоты, 5 частей уксусного ангидрида и 1 часть концентрированной серной кислоты, выдерживающей пробу Савая. В виду того, что реакция идет с выделением тепла, реактив готовят в термостойком стакане, который помещают в ледяную баню. Серную кислоту добавляют в последнюю очередь, небольшими порциями при постоянном помешивании. Вся посуда, соприкасающаяся с реактивом, должна быть абсолютно сухой, без следов влаги. Правильно приготовленный реактив должен быть прозрачным, бесцветным или слегка желтоватой окраски. Хранят в холодильнике в посуде из темного стекла с притертой пробкой.

2. Хлороформ.

3. Абсолютный этиловый спирт.

4. Стандартный раствор холестерина — 5,2 ммоль/л. 200 мг холестерина растворяют в мерной колбе емкостью 100 мл в 2,5 мл хлороформа и доводят до метки абсолютным спиртом. Приготовленный раствор хранят в холодильнике, в посуде из темного стекла с притертой пробкой и с дополнительной герметизацией парафином.

Ход определения.

Ингредиенты	Опытная проба, мл	Стандартная проба, мл
Сыворотка крови	0,1	—
Стандартный р-р холестерина	—	0,1
Реактив Либерман—Бурхард	2,1	2,1

Реактив добавляют к сыворотке крови (стандарту) по стенке пробирки медленно. Затем пробирки энергично встряхивают и помещают в термостат на 20 минут при температуре 37° С. По окончании инкубации сразу же колориметрируют при длине волны 590—690 нм (красный светофильтр), в кювете с толщиной слоя 5 мм против воды. Расчет выполняют по формуле, исходя из простой арифметической пропорции:

$$\text{Холестерин, ммоль/л} = \frac{E_{\text{оп}} \cdot 5,2}{E_{\text{стандарта}}}, \text{ где}$$

5,2 ммоль/л — концентрация стандартного раствора холестерина.

Норма. Содержание холестерина в сыворотке крови в среднем колеблется в пределах 3,0 — 6,5 ммоль/л. Но верхняя граница нормы, как и для липидов, зависит от возраста, пола, особенностей жизни пациента.

Примечания.

1. Сыворотка крови должна быть свободна от гемолиза.
2. Расчет результатов исследования холестерина следует производить только по параллельно обрабатываемому с опытными пробами стандартному раствору холестерина. Неприемлемым для данного метода является расчет результатов по калибровочному графику. Дело в том, что в ходе выполнения метода Илька возможно влияние трудно учитываемых изменений условий опыта (время и температура термостатирования, время выполнения колориметрирования от момента окончания инкубации). Все это значительно влияет на интенсивность окрашивания опытных проб и при использовании калибровочного графика может привести к серьезным ошибкам в результате исследования.

Клинико-диагностическое значение.

Исследование холестерина используется в комплексе с другими тестами для типирования гиперлипидемий.

Длительное увеличение концентрации холестерина в крови (гиперхолестеринемия) способствует развитию атеросклероза. Гиперхолестеринемия встречается при механических желтухах, нефрите, нефрозе, сифилисе, гипотиреозе, авитаминозах. Уменьшение концентрации холестерина (гипохолестеринемия) наблюдается при туберкулезе, сыпном тифе, паренхиматозной желтухе, гипертиреозе, анемиях, голодании.

3.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХОЛЕСТЕРИНА В α -ЛИПОПРОТЕИДАХ СЫВОРОТКИ КРОВИ

Принцип. α -Липопропротеиды (α -ЛП) остаются в сыворотке или плазме крови после того, как пре- β -ЛП и β -ЛП осаждены гепарином в присутствии ионов марганца. В надосадочной жидкости определяют содержание холестерина.

Реактивы.

1. 1М раствор хлористого марганца ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$). 197,91г хлорида марганца 4-водного растворяют в мерной колбе на 1 л. Раствор стабилен при хранении в холодильнике ($4^\circ C$) в посуде из темного стекла.

2. Гепарин, содержащий 5000 МЕ в 1 мл. Хранят при $4^\circ C$.

3. Реактивы, необходимые для определения холестерина по методу Илька (смотри определение холестерина по методу Илька).

Ход определения.

Реакцию проводят в центрифужных пробирках, помещенных в ледяную баню.

<i>Ингредиенты</i>	<i>Опытная проба, мл</i>	<i>Стандартная проба, мл</i>
Сыворотка крови	1,0	—
Гепарин	0,04	—
Тщательно перемешивают		
Раствор хлорида марганца	0,05	—

Тщательно перемешивают (сыворотка мутнеет) и оставляют стоять в ледяной бане на 30 минут. Затем пробы центрифугируют 30 минут при 3000 об/мин и температуре $4^\circ C$. Если отсутствует рефрижераторная центрифуга, то для соблюдения температурного режима центрифугирования в центрифужные держатели пробирок можно наколоть кусочки льда, уравновесив держатели.

Центрифугат	0,1	—
Стандартный раствор холестерина	—	0,1
Реактив Илька	2,1	2,1

Тщательно перемешивают. Термостатируют 20 минут при температуре 37° С и сразу колориметрируют при длине волны 590—690 нм (красный светофильтр) в кювете с толщиной слоя 5 мм против дистиллированной воды.

Расчет. По простой арифметической пропорции, как указано в методе Илька.

Норма. 0,9 — 1,9 ммоль/л в сыворотке крови.

Примечания.

1. Для исследования можно использовать как сыворотку крови, так и плазму. Сыворотка (плазма), снятая со сгустка крови, может храниться при температуре 4°С в течение недели. Не рекомендуется замораживать сыворотку, так как это приводит к занижению результатов.

2. Верхний слой сыворотки, содержащий α -ЛП, следует удалить сразу после центрифугирования, так как при согревании α -ЛП начинают выпадать в осадок.

3. При работе с липемическими сыворотками их рекомендуется разводить в 2 раза физиологическим раствором (NaCl), иначе осаждение может быть неполным.

Клинико-диагностическое значение.

Холестерин α -ЛП является одним из основных показателей, используемых в процессе типирования гиперлипопропротеидемий.

Снижение концентрации холестерина α -ЛП в клинической практике рассматривается как фактор риска в развитии ишемической болезни сердца, вызванной коронарным атеросклерозом. Снижается уровень холестерина в α -ЛП при ожирении, курении, адинамии, предрасполагающих к развитию ишемической болезни сердца. Выраженное снижение холестерина в α -ЛП отмечается в остром периоде вирусного гепатита.

Повышение содержания холестерина в α -ЛП установлено у лиц, систематически занимающихся физическими тренировками. Гиперальфахолестеринемия может быть обусловлена наследственно. В этих случаях значительно реже наблюдается ишемическая болезнь сердца и инфаркт миокарда.

3.5 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХОЛЕСТЕРИНА ПРЕ- β -ЛИПОПРОТЕИДОВ И β -ЛИПОПРОТЕИДОВ ПУТЕМ РАСЧЕТА

1. Содержание холестерина в пре-ЛП может быть рассчитано из следующего соотношения:

$$\text{ХС пре-}\beta\text{-ЛП} = \frac{\text{ТГ}}{5,2,29}, \text{ где}$$

ТГ — концентрация триглицеридов (ммоль/л) в исследуемой крови;

5 — эмпирически найденный коэффициент;

2,29 — поправочный коэффициент, введенный в формулу для адекватного выражения результатов расчета в ммоль/л.

(Изначально соотношение ТГ/5 было предложено при выполнении расчетов в единицах массы — мг %, а в связи с переходом на единицы молярной концентрации — ммоль/л, значение рассчитываемого ХС пре- β -ЛП получалось заниженным, что привело к необходимости вводить поправочный коэффициент 2,29).

2. Холестерин β -ЛП вычисляется по формуле:

$$\text{ХС } \beta\text{-ЛП} = \text{Общий ХС} - (\text{ХС пре-}\beta\text{-ЛП} + \text{ХС } \alpha\text{-ЛП})$$

Эта формула применима в случае, если содержание ТГ не превышает 4,4 ммоль/л и исключается III тип гиперлипопротеидемий.

3. При комплексном исследовании липидного обмена целесообразно рассчитывать такой показатель, как "Коэффициент атерогенности (К)". Коэффициент отражает соотношение циркулирующих и неатерогенных липопротеидов.

$$K = \frac{\text{Общий ХС} - \text{ХС } \alpha\text{-ЛП}}{\text{ХС } \alpha\text{-ЛП}}$$

В норме коэффициент атерогенности колеблется в пределах 2,86—4,46 ммоль/л.

Повышение данного коэффициента свидетельствует о преобладании атерогенных липопротеидов, что является фактором риска в развитии атеросклероза.

3.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ β -ЛИПОПРОТЕИДОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ТУРБИДИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ (ПО БУРШТЕЙНУ, САМАЙ)

Принцип. При добавлении к сыворотке крови хлористого кальция и гепарина нарушается коллоидная устойчивость белков сыворотки крови, входящих в состав β -липопротеидов и пре- β -липопротеидов. Образуется гепарин-липопротеиновый комплекс, выпадающий в осадок;

что проявляется помутнением реакционной смеси. Степень мутности пропорциональна содержанию β - и пре- β -липопротеидов.

Реактивы.

1. 0,025 М (2,8%) раствор хлористого кальция. 0,5475 г 6-водного хлористого кальция ($\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) или 0,3675 г 2-водного хлористого кальция ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды в мерной колбе на 100 мл и доводят объем дистиллированной водой до метки. (Предпочтительнее пользоваться высушенным до постоянного веса CaCl_2).

Для приготовления 0,025 М раствора хлористого кальция можно использовать ампульный 10% раствор CaCl_2 с относительной плотностью = 1,040. Вносят 2,8 мл 10% ампульного раствора CaCl_2 в мерную колбу на 100 мл и доводят дистиллированной водой до метки. Стабилен при хранении в холодильнике.

2. Раствор гепарина активностью 100 МЕ в 1 мл. Препараты гепарина, содержащие 5000 МЕ, 10000 МЕ и 20000 МЕ в 1 мл разводят соответственно в 5, 10 и 20 раз дистиллированной водой так, чтобы раствор содержал 1000 МЕ в 1 мл.

Ход определения.

<i>Ингредиенты</i>	<i>Опытная проба, мл</i>
Сыворотка крови	0,2
Раствор CaCl_2	2,0
Раствор гепарина	0,04

Перемешивают и в промежутке времени до 4 минут, не более, измеряют оптическую плотность пробы при длине волны 590—690 нм (красный светофильтр) в кювете с толщиной слоя 5 мм против дистиллированной воды.

Расчет. Содержание β -ЛП (и пре- β -ЛП) выражают в условных единицах — единицах экстинции, умноженных на 100.

Норма. Проба Бурштейна—Самой в норме составляет 0,35—0,55 ед. экстинции или, после умножения на коэффициент — 100—35—55 у.е.

Примечания.

1. Кровь исследуют у пациента после 12 часов голодания.
2. При высоких концентрациях β -ЛП сыворотку разводят физиологическим раствором, полученные результаты умножают на кратность разведения.

3. Расчет можно вести по калибровочному графику, построенному по калибровочному раствору β -ЛП. Однако выделение чистых β -ЛП для получения калибровочного раствора технически трудно. Поэтому было предложено выражать результаты в условных единицах.

4. Согласно некоторым публикациям были попытки на основании исследования калибровочных растворов β -ЛП эмпирически вывести коэффициент пересчета для выражения результатов анализа β -ЛП в единицах массы. Так, например, предлагался коэффициент 116, на который нужно было умножать единицы экстинкции, для того чтобы в результате исследования получить концентрацию β -ЛП в мг/100 мл сыворотки. Нормальное содержание β -ЛП, в этом случае, оценивалось как: 400—600 мг/100 мл.

Клинико-диагностическое значение. Повышение уровня β -ЛП в крови встречается при атеросклерозе, диабете, гипотиреозе, механических желтухах, мононуклеозе, β_1 -плазмотоме, ожирении, гиперхолестеринемии. Уменьшение β -ЛП в крови отмечено при β_2 -плазмотоме.

3.7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРЕКИСНОГО ГЕМОЛИЗА ЭРИТРОЦИТОВ

Принцип. Снижение уровня антиоксидантов в организме увеличивает аутоокисление липидов мембран эритроцитов, что снижает их устойчивость к гемолизу.

Реактивы.

1. Буферный раствор, рН 7,4. 136 г $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 30 г NaOH растворить в 1 л дистиллированной воды.

2. 17% раствор NaCl .

3. Рабочий реактив рН 7,4 : смешать 50 мл раствора 1 и 50 мл раствора 2, затем довести объем реактива до 1 л дистиллированной водой. Перед использованием реактив встряхивается для насыщения кислородом 1—2 минуты.

Ход определения. К 0,1 мл крови прибавляется 7,5 мл рабочего реактива, проба центрифугируется 10 мин при 1500 об/мин при 15°C. Осадок эритроцитов после удаления надосадочной жидкости ресуспендируется в 7,5 мл рабочего реактива. По 1 мл суспензии эритроцитов разливается в 2 пробирки, содержащие по 4 мл рабочего раствора и в пробирку, содержащую 4 мл дистиллированной воды (холостая проба на 100% гемолиз). Все пробы инкубируются при 37°C в течение 4 часов, после чего взбалтываются и центрифугируются (10 мин, 1500 об/мин).

Оптическая плотность надосадочной жидкости измеряется на фотоэлектроколориметре при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм против воды.

Величина гемолиза рассчитывается по формуле:

$$\% \text{ гемолиза} = \frac{(E_{\text{пробы 1}} + E_{\text{пробы 2}}) \cdot 100}{2 \cdot E_{\text{холостой пробы}}}$$

Норма. Перекисный гемолиз эритроцитов в норме не превышает 10--15%.

3.8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ ВОССТАНОВЛЕННОГО ГЛУТАТИОНА В ЭРИТРОЦИТАХ КРОВИ (МЕТОД Э.БАТЛЕРА, О.ДЮБОНА, Б.КЕЛЛИ, 1963 г.)

Принцип. Восстановленный глутатион, при взаимодействии с реактивом Элмана (5,5-дитиобис-2-нитробензойная кислота), образует соединение (2 нитромеркаптобензойная кислота), окрашенное в желтый цвет, интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию глутатиона.

Реактивы.

1. Осаждающий реактив. В мерном стакане на 500 мл растворить последовательно в небольшом объеме дистиллированной воды: ледяной метафосфорной кислоты — 6,68 г, трилона Б — 0,8 г, хлористого натрия — 120,0 г. Довести объем дистиллированной водой до 400 мл.

2. 0,3М раствор Na_2HPO_4 .

3. Реактив Элмана. 0,04% раствор 5,5-дитиобис-2-нитробензойной кислоты в 1% растворе цитрата натрия 3-х замещенном.

4. Стандартный раствор восстановленного глутатиона — 5 ммоль/л. Из него путем разведения готовят 9 рабочих растворов: 0,1 ммоль/л; 0,5 ммоль/л; 1,0 ммоль/л; 1,5 ммоль/л; 2,0 ммоль/л и т.д. до 8,5 ммоль/л.

5. Раствор антикоагулянта. Используется либо 6% раствор этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), либо трилона Б в 0,15М растворе КСI pH 7,3—7,4 (до нужного pH доводить с помощью добавляемого по каплям 5% раствора КОН).

Ход определения.

Подготовительный этап:

А) Получение эритроцитарной массы. В чистую центрифужную пробирку, содержащую 1 мл антикоагулянта, набирают 4 мл венозной крови. Кровь самопроизвольно стекает в пробирку из иглы, введенной в локтевую вену (в шприц не набирать во избежание гемолиза эритроцитов).

Набранную кровь центрифугируют 15 минут при 3000—3500 об/мин. Плазму крови удаляют и добавляют в пробирку физиологический раствор в соотношении с эритроцитарной массой 1:3. Тщательно перемешивают содержи-

мое пробирки и вновь центрифугируют 15 минут при 3000—3500 об/мин. Отсосав прозрачный слой физиологического раствора, подобным образом промывают эритроциты трижды.

Б) Приготовление гемолизата эритроцитов 1:10. 0,2 мл эритроцитарной массы вносят в 1,8 мл дистиллированной воды. Перемешать стеклянной палочкой.

<i>Ингредиенты</i>	<i>Опытная проба, мл</i>	<i>Холодная проба, мл</i>
Гемолизат эритроцитов 1:10	2,0	—
Осаждающий реактив	3,0	3,0
Дистиллированная вода	—	2,0

Перемешивают и выдерживают 5 минут при комнатной температуре, затем центрифугируют 15 минут при 3000—3500 об/мин, после чего отфильтровывают надосадочную жидкость.

<i>Центрифугат</i>	<i>2,0</i>	<i>2,0</i>
0,3 М Na_2HPO_4	8,0	8,0
Реактив Эйлмана	0,1	0,1

Через 5 минут колориметрируют опытную пробу против холодной пробы при длине волны 412 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Расчет количества восстановленного глутатиона в эритроцитах производят по калибровочной кривой. Она строится путем введения в методику, вместо гемолизата эритроцитов, рабочих растворов восстановленного глутатиона: 0,1 ммоль/л; 0,5 ммоль/л; 1,0 ммоль/л и т.д. до 5,0 ммоль/л. На каждое разведение готовится по три параллели.

Норма. Содержание восстановленного глутатиона в эритроцитах крови практически здоровых людей имеет четко выраженную возрастную зависимость.

<i>Возраст</i>	<i>20—44 лет</i>	<i>45—69 лет</i>	<i>60—74 лет</i>	<i>75—90 лет</i>
Содержание восстановленного глутатиона	1,65—2,25	1,65—2,95	1,93—2,70	2,25—2,75

Клинико-диагностическое значение. Процессы биологического окисления в клетках в норме состоят из ряда последовательных ферментативных реакций дегидрирования,

то есть отщепления атомов водорода от окисляемого вещества, а кислород в норме присоединяется не к самому окисляемому веществу, а к освобожденным атомам водорода с образованием молекул воды. Недостаток антиоксидантов в организме приводит к непосредственному присоединению кислорода к окисляемым веществам с образованием свободных радикалов, перекисей, альдегидов, которые в химическом плане агрессивны и токсичны. В этом случае нарушается нормальное течение физиологических процессов: блокируется депонирование энергии в форме молекул АТФ, энергия рассеивается в виде тепла. Повреждаются клеточные мембраны, ферменты, структурные белки, что в частности, проявляется в деструкции эластических волокон артериальной стенки и предрасполагает к развитию атеросклероза. Этому способствует и гиперхолестеринемия, возникающая за счет нарушения перекисями липидов процессов утилизации стероидов в желчные кислоты, которые в норме осуществляются в гепатоцитах.

Насыщенность организма антиоксидантами является важным прогностическим и диагностическим показателем для характеристики состояния здоровья и болезни организма и, особенно, состояния сердечно-сосудистой системы.

К группе *антиоксидантов* относят вещества, ингибирующие реакции неферментативного свободнорадикального окисления липидов, белков, мукополисахаридов и нуклеиновых кислот. Среди антиоксидантов принято различать вещества прямого и непрямого действия. Антиоксиданты прямого действия — токоферол, аскорбиновая кислота, биофлавоноиды — непосредственно элиминируют свободные радикалы. Антиоксиданты непрямого действия — глутаминовая и липоевая кислоты, метионин и некоторые синтетические препараты — повышают уровень антиоксидантной активности тканей. Важным компонентом антиоксидантной системы является восстановленный глутатион, который обладает как прямым, так и непрямым антиоксидантным действием.

Тест перекисного гемолиза эритроцитов характеризует уровень содержания токоферола и других липидных антиоксидантов в эритроцитах. Повышение процента гемолиза эритроцитов пропорционально снижению антиоксидантной обеспеченности организма. Наблюдается при атеросклерозе, сахарном диабете.

Снижение уровня восстановленного глутатиона в эритроцитах характерно для ишемической болезни сердца и

инфаркта миокарда, причем снижение уровня восстановленного глутатиона коррелирует со степенью выраженности некротического процесса в миокарде.

3.9. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩИХ ЛИПИДОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПО ЦВЕТНОЙ РЕАКЦИИ С СУЛЬФОФОСФОВАНИЛИНОВЫМ РЕАКТИВОМ

Принцип. Продукты распада ненасыщенных липидов образуют с реактивом, состоящим из серной, ортофосфорной кислот и ванилина, соединение, интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию общих липидов в сыворотке крови.

Реактивы. 1. Серная кислота, концентрированная, для пробы Саваяля.

2. Ортофосфорная кислота, концентрированная.

3. 0,6% водный раствор ванилина. 0,6 г ванилина растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды при нагревании на водяной бане; после охлаждения объем доводят до 100 мл. Раствор стабилен при хранении при комнатной температуре.

4. Фосфорнованилиновая смесь. 4 части концентрированной ортофосфорной кислоты смешивают с 1 частью 0,6% раствора ванилина. Смесь хранят в посуде из темного стекла при комнатной температуре.

5. Хлороформ, х.ч. или для наркоза.

6. Основной (1200 мг%) стандартный раствор триолеина. Навеску 1200 мг триолеина переносят в мерную колбу на 100 мл и доводят объем хлороформом до метки. Раствор хранят в холодильнике, в посуде из темного стекла с притертой пробкой.

Ход определения.

<i>Ингредиенты</i>	<i>Опытная проба, мл</i>	<i>Контрольная проба, мл</i>
Сыворотка крови	0,05	—
Вода дистиллированная	—	0,05
Концентрированная серная кислота	2,5	2,5

Содержимое пробирок перемешивают и помещают на 10 минут в кипящую водяную баню. Охлаждают водопроводной водой до комнатной температуры. Из каждой пробирки отбирают по 0,2 мл смеси, которую переносят в другие пробирки, содержащие по 3 мл фосфорнованили-

новой смеси. После тщательного перемешивания пробы оставляют на 45 минут в темноте при комнатной температуре. Экстинцию измеряют на ФЭКе при зеленом свето- фильтре (длина волны 500—560 нм) в кювете с толщиной слоя 5 мм против контрольной пробы.

Построение калибровочного графика. Из основного раствора готовят рабочие стандартные растворы (табл. 3.2.)

Таблица 3.2

Растворы для построения калибровочного графика

№	Основной стандартный раствор триолеина (мл)	Хлороформ (мл)	Концентрация общих липидов, мг%
1	0,17	0,83	200
2	0,33	0,67	400
3	0,50	0,50	600
4	0,67	0,33	800
5	0,83	0,17	1000
6	1,00	—	1200

Из каждого разведения берут по 0,05 мл рабочего стандартного раствора и далее пробы обрабатывают, как опытные. По полученным данным строят калибровочный график.

Расчет по формуле: $\text{Содержание общих липидов, мг\%} = E_{\text{оп}}/E_{\text{ст}} \cdot C_{\text{ст}}$

E — экстинция опытной и стандартных проб;

C — концентрация основного стандартного раствора (1200 мг%).

Примечание. 1. Исследование проводить натощак!; 2. Сыворотку можно хранить в холодильнике в течение 3—6 дней (не замораживая); 3. При концентрации общих липидов больше 1200 мг% сыворотку следует развести дистиллированной водой, а результат умножить на разведение.

Нормальные значения. 400 — 800 мг%.

Клинико-диагностическое значение. Содержание общих липидов увеличивается при: сахарном диабете, биллиарном циррозе печени, остром и хроническом нефрите, ожирении, атеросклерозе, гипотиреозе, панкреатите и др.

ХАРАКТЕРИСТИКА УГЛЕВОДОВ И МЕТОДЫ ИХ ИССЛЕДОВАНИЯ

Углеводы — это обширный класс органических соединений, составляющий приблизительно половину всех известных в настоящее время органических веществ. В человеческом организме на их долю приходится около 2% сухой массы тела. Метаболизм углеводов в организме человека складывается, в основном, из следующих процессов:

1. Расщепление поступающих с пищей полисахаридов в желудочно-кишечном тракте до моносахаридов. Всасывание моносахаридов из кишечника в кровь.

2. Синтез и распад гликогена в тканях, прежде всего в печени.

3. Анаэробное и аэробное расщепление глюкозы.

4. Взаимопревращение гексоз.

5. Аэробный метаболизм пирувата. Этот процесс выходит за рамки углеводного обмена, однако, может рассматриваться как завершающая его стадия — окисление пирувата.

6. Процесс глюконеогенеза (образование углеводов из продуктов распада белков и др.). Это, в первую очередь, пировиноградная и молочная кислоты, глицерин, аминокислоты и ряд других соединений.

Биологическая роль углеводов. 1. *Энергетическая функция.* Это наиболее важная функция углеводов. Углеводы — основной поставщик энергии в организме, а для деятельности головного мозга глюкоза является, чуть ли не единственным источником энергии. При значительной и продолжительной гипогликемии (снижение уровня глюкозы в крови) в головном мозге возникают необратимые изменения.

2. *Пластическая роль.* Углеводы в виде гетерополисахаридов входят в состав клеточных мембран, участвуют в построении опорно-двигательного аппарата. Участвуют в синтезе нуклеотидов.

3. *Защитная роль.* Углеводы и, в частности, мукополисахариды являются частью слизи, секретлируемой различными железами для предохранения внутренних стенок полых органов от повреждений. Глюкуроновая кислота служит своего рода смазкой для трущихся поверхностей суставов. Она же способствует обезвреживанию и выведению из организма токсических веществ.

Переваривание углеводов в желудочно-кишечном тракте. Весь процесс переваривания углеводов в ЖКТ сводится к расщеплению высокомолекулярных углеводов, которыми богаты пищевые продукты, до моносахаридов.

Частичное расщепление сложных углеводов происходит уже в полости рта, где они подвергаются, главным образом, действию амилазы слюны. При этом полисахариды расщепляются только до крупных обломков — декстринов и не далее, так как слюна действует лишь на поверхности пищевого комка и время ее действия очень коротко. В желудке переваривания углеводов не происходит из-за сильно кислой реакции его содержимого, подавляющего действие амилазы слюны.

Дальнейшее и более полное переваривание углеводов происходит в тонком кишечнике под действием амилазы поджелудочной железы, которая рефлекторно выбрасывает также сок, богатый карбонатами. Этим создается слабощелочная реакция среды в тонком кишечнике, благоприятная для активности фермента амилазы. Амилаза гидролизует углеводы до олигосахаридов.

Продолжают расщепление ферменты дисахаридазы, которые вырабатываются железами слизистой тонкого кишечника. К этим ферментам относятся: сахараза, расщепляющая сахарозу на глюкозу и фруктозу; мальтаза, действующая на мальтозу с образованием двух молекул глюкозы; лактаза, гидролизующая лактозу на глюкозу и галактозу. Образовавшиеся моносахариды всасываются через стенку тонкого кишечника в кровь. Поступая по воротной вене в печень, фруктоза, галактоза и другие моносахариды преобразуются большей частью в глюкозу. Значительная часть глюкозы превращается в гликоген, который откладывается в печеночных клетках в форме своеобразных, видимых под микроскопом гранул. При повышении энергозатрат в организме при участии ЦНС обычно происходит усиление распада гликогена и образования глюкозы.

Здесь следует сделать небольшое отступление и акцентировать внимание именно на том, что в крови находятся только моносахариды и, главным образом, глюкоза. Это важно в дальнейшем для правильного понимания принципа исследования глюкозы в крови, моче, ликворе. Выражение «исследовать сахар» применительно к биологическим жидкостям — неверно. Это всего лишь дань устоявшейся традиции. Исходя из вышеизложенного материала, должно быть ясно, что сахара, то есть сахарозы ни в кро-

ви, ни в других жидкостях организма быть не может, так как сахара не всасывается через стенку тонкого кишечника. В биологических жидкостях возможным является исследование только на глюкозу.

Внутриклеточное усвоение глюкозы. Часть глюкозы, оставшаяся после определенных преобразований, поступает в большой круг кровообращения и током крови доставляется к клеткам различных органов и тканей. Там, внутриклеточно, а именно, в таких органеллах клетки, как митохондрии, происходит расщепление глюкозы до CO_2 и H_2O с накоплением значительного количества энергии в виде молекул АТФ. Расщепление глюкозы может протекать двумя путями: анаэробным, то есть без участия кислорода, и аэробным — в присутствии кислорода, при условии достаточного насыщения им тканей.

Анаэробный путь расщепления глюкозы называется гликолиз. Это короткий ферментативный путь расщепления глюкозы до молочной и пировиноградной кислот. Энергетически он малоэффективен, так как из 4 образующихся здесь молекул АТФ только 2 накапливаются впрок, а другие 2 молекулы АТФ расходуются в течение самого процесса гликолиза. Несмотря на низкий энергетический выход, процесс гликолиза имеет большое значение в органах, функционирующих в условиях гипоксии, то есть недостатка кислорода, например, в работающей мышце.

Дальнейшая утилизация образовавшейся в ходе гликолиза пировиноградной кислоты возможна либо аэробным путем в цикле Кребса, либо путем ресинтеза гликогена в печени. В обоих случаях используется пировиноградная кислота, а молочная преобразуется в пировиноградную.

Конечные продукты гликолиза, а также фермент, катализирующий взаимный переход пировиноградной и молочной кислот — лактатдегидрогеназа, могут быть исследованы в сыворотке крови в условиях клинических лабораторий.

Аэробный путь расщепления глюкозы. Установлены 2 основных аэробных механизма расщепления глюкозы: не прямой и прямой. Непрямой путь расщепления глюкозы преобладает. Это, так называемый, цикл трикарбоновых кислот (ЦТК) или цикл Кребса. В ЦТК происходит полное расщепление молекулы глюкозы до углекислого газа и воды и аккумулируется 36 молекул АТФ, то есть это основной путь образования энергии в организме. ЦТК условно подразделяют на 3 этапа:

- 1) гликолитический;
- 2) образования из пирувата ацетилкоэнзима А;
- 3) окисление ацетилкоэнзима А в цикле трикарбоновых кислот.

Прямой путь окисления глюкозы — пентозофосфатный путь. Состоит из шести повторяющихся циклов последовательного отщепления от молекулы глюкозы каждого из ее углеродных атомов с образованием в каждом цикле углекислого газа и воды. В ходе прямого окисления глюкозы в организме образуются моносахариды — пентозы, которые используются в синтезе нуклеиновых кислот. Образуется восстановленный НАДФ, необходимый как кофермент в ферментативных реакциях синтеза нуклеиновых кислот, жирных кислот, холестерина или выделяется АТФ (36 молекул). Пентозофосфатный путь наряду с ЦТК возможен в различных тканях, но преобладает в половых железах, коре надпочечников, хрусталике глаза, лактирующей молочной железе.

РЕГУЛЯЦИЯ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА

Механизмы стабилизации уровня глюкозы в крови. В крови здорового человека содержание глюкозы является показателем довольно стабильным, не зависящим от приема пищи, фазы активности, либо покоя и других физиологических состояний организма. Возможные колебания концентрации глюкозы невелики и регулируются центральной нервной системой (ЦНС) и эндокринной системой, под контролем которых находятся и органы механизмы стабилизации уровня глюкозы в крови. Инсулин — единственный гормон гипогликемического действия (снижает уровень глюкозы в крови). Адреналин, глюкагон, АКТГ, СТГ, глюкокортикоиды повышают уровень глюкозы в крови (гипергликемическое действие). В регуляции содержания глюкозы крови центральная роль принадлежит печени.

Роль ЦНС. В прошлом веке К.Бернар установил наличие сахарного центра на дне четвертого желудочка продолговатого мозга, затем были установлены центробежные пути передачи из него возбуждения. Схему центральной регуляции углеводного обмена можно представить следующим образом: понижение уровня глюкозы в крови сопровождается раздражением клеток «сахарного центра», которое передается по симпатической нервной системе к надпочечникам и вызывает повышенную продукцию адреналина. Последний активизирует фосфоорилазу, фермент,

расщепляющий гликоген в печени. Освобождающаяся глюкоза поступает в кровь и компенсирует состояние гипогликемии.

При повышении концентрации глюкозы в крови также возбуждается «сахарный центр», но импульсы при этом распространяются по парасимпатическим нервным волокнам к поджелудочной железе, стимулируя секрецию инсулина. Он способствует внутриклеточной утилизации глюкозы, что приводит к снижению ее концентрации в крови.

Эндокринная регуляция. Наиболее выраженным влиянием на углеводный обмен обладают гормоны поджелудочной железы и надпочечников. Поджелудочная железа секретирует инсулин и глюкагон. Инсулин вырабатывается β -клетками островков Лангерганса—Соболева поджелудочной железы. Это гормон белковой природы, состоящий из двух полипептидных цепей, структура которых расшифрована. Гипогликемический эффект действия инсулина реализуется, прежде всего, за счет активации им всех процессов утилизации глюкозы: инсулин обеспечивает фосфорилирование глюкозы; способствует транспорту глюкозы через клеточную мембрану внутрь клетки; активирует процессы внутриклеточного расщепления глюкозы. Кроме того, инсулин активирует фермент гликогенсинтазу, способствуя синтезу гликогена в печени; тормозит активность фермента липазы, расщепляющего жиры, и стимулирует переход глюкозы в жир; тормозит глюконеогенез — образование глюкозы из неуглеводов и, прежде всего, из белков. Избыток инсулина в крови нейтрализуется ферментом инсулиназой, который разрушает инсулин.

Глюкагон — вырабатывается α -клетками островкового аппарата поджелудочной железы. Также является гормоном белковой природы. Повышает концентрацию глюкозы в крови, активируя фосфорилазу печени, которая вызывает расщепление гликогена.

Гормоны надпочечников. Производятся корковым и мозговым слоем надпочечников. Гормоны коркового слоя — глюкокортикоиды (кортизол, кортизон, кортикостерон) повышают концентрацию глюкозы в крови путем активации глюконеогенеза. Гормоны мозгового слоя — *катехоламины* (адреналин, норадреналин, дофамин, ДОФА) повышают уровень глюкозы в крови за счет расщепления гликогена в печени под влиянием активированной фосфорилазы. Катехоламины, в отличие от глюкагона, активи-

вируют не только печеночную фосфорилазу, но и фосфорилазу мышц, хотя для эффекта гипергликемии это не имеет существенного значения, так как при расщеплении мышечного гликогена глюкоза в кровь не выделяется. Но из мышечного гликогена образуется молочная кислота, которая большей частью ресинтезируется в гликоген печени, восполняя, в известной мере, затраченные его количества при компенсации гипогликемии.

ПАТОЛОГИЯ ОБМЕНА УГЛЕВОДОВ

Глюкоза является одним из важнейших компонентов крови. Количество ее в крови отражает состояние углеводного обмена в организме. Глюкоза почти поровну распределяется между плазмой и форменными элементами крови с некоторым превышением ее концентрации в плазме.

Учитывая, что наибольшее значение в обмене углеводов придается глюкозе, рассмотрим патологию, характерную для этого моносахарида.

В патологии обмена глюкозы возможны такие состояния как: гипергликемия и гипогликемия. *Гипергликемия* — означает концентрацию глюкозы в крови, превышающую нормальную величину. *Гипогликемия* — это падение концентрации глюкозы в крови ниже нормального уровня. Гипергликемия сопровождается такое тяжелое заболевание обмена веществ, как сахарный диабет.

Сахарный диабет. Это заболевание, связанное с недостаточным выделением гормона поджелудочной железы инсулина и гиперпродукцией всех других желез внутренней секреции. Однозначно ответить на вопрос, касающийся этиологии данного заболевания на сегодняшний день не представляется возможным. Есть целый ряд факторов, предрасполагающих к развитию сахарного диабета. Это, прежде всего, отягощенная наследственность. Сюда же следует отнести тяжелые психические травмы, избыточное питание и ожирение, заболевание печени и поджелудочной железы, нарушения обмена мочевой кислоты, цинка, развитие аутоиммунных процессов с выработкой антител к инсулину и другие.

В патогенезе сахарного диабета на первый план выходит нарушение процессов внутриклеточного усвоения глюкозы. Из-за дефицита инсулина или его функциональной неполноценности страдает как этап активации глюкозы, так и процесс транспорта глюкозы внутрь клетки через

клеточную мембрану. Глюкоза накапливается в крови, создавая гипергликемию, нередко превышающую почечный порог, что приводит к глюкозурии. Накапливаясь в межклеточной жидкости, глюкоза вызывает эффект дегидратации клеток, когда вода из клеток поступает в окружающую среду, имеющую большее осмотическое давление. Это явление лежит в основе полиурии, которая сопровождает сахарный диабет. Таким образом, на фоне значительной гипергликемии, ткани испытывают дефицит глюкозы и, как следствие этого, энергетический голод. Эта причина, а также изначальная недостаточность инсулина, вызывает усиление процессов липолиза, глюконеогенеза. Организм стремится пополнить свои энергетические ресурсы, мобилизуя резервы, депонированные в жировых депо и за счет распада белков. В результате, наряду с нарушением углеводного обмена, развиваются нарушения жирового и белкового обмена. Однако, несмотря на интенсификацию процессов липолиза, полного расщепления жиров до конечных продуктов не происходит из-за недостатка энергии в организме. Накапливаются недоокисленные продукты распада жирных кислот — кетоновые тела (β -оксимасляная кислота, ацетоуксусная кислота и ацетон). Кроме того, их количество увеличивается и за счет угнетения процесса синтеза жиров. При дефиците энергии процессы синтеза обрываются на начальных этапах, на уровне образования кетоновых тел. Увеличение количества кетоновых тел и снижение pH крови, связанное с повышенным выделением щелочных ионов (натрий, калий, аммоний) из организма с мочой при полиурии, приводит к ацидозу — сдвигу реакции внутренней среды организма в кислую сторону. Это, в свою очередь, нарушает нормальное течение всех реакций обмена веществ.

Метаболический дисбаланс по мере снижения компенсаторных возможностей организма приводит к различным осложнениям, которые сопровождают сахарный диабет. Эти осложнения могут развиваться остро, либо хронически. К острым осложнениям сахарного диабета относятся комы. Они возникают внезапно и представляют непосредственную угрозу для жизни больного.

Гипергликемическая кома — развивается в результате значительного увеличения концентрации глюкозы в крови и всегда сопровождается кетозом. От больного и, особенно, в выдыхаемом им воздухе ощущается запах ацетона. В лабораторной диагностике основными критериями такой комы являются выраженная гипергликемия, кето-

немия, глюкозурия, ацетонурия, падение резервной щелочности крови. Причиной возникновения комы может быть недостаточная доза введенного инсулина, либо погрешности в режиме питания.

Гиперосмолярная кома — развивается только на фоне гипергликемии, без кетоза. При лабораторном обследовании больного определяется высокая гипергликемия, глюкозурия, гипернатриемия.

Гипогликемическая кома — возникает в результате резкого снижения концентрации глюкозы в крови, из-за передозировки инсулина или несвоевременного приема пищи после введения инсулина. Симптоматика, характерная для данного состояния, обусловлена обеднением нервной ткани глюкозой. Транспорт глюкозы в клетки нервной ткани обеспечивается не только инсулином, но и за счет простой диффузии. Так что, гипергликемия, характерная для больных сахарным диабетом, в известной мере, компенсирует питание глюкозой нервных клеток. Резкое же снижение концентрации глюкозы в крови вызывает нарушение нормальной функции ЦНС, что проявляется внезапной и полной потерей сознания, судорогами, потливостью. Длительная гипогликемия приводит к необратимым изменениям в ЦНС и гибели головного мозга. При лабораторном обследовании определяется гипогликемия. Глюкозурия и ацетонурия отсутствуют. Резервная щелочность крови в норме.

Хронические осложнения сахарного диабета развиваются на фоне метаболических нарушений, формируются в течение многих лет, проявляются в виде ангиопатий, склерозировании сосудов, катарактой, невритами. Грозными осложнениями сахарного диабета являются ишемическая болезнь сердца с переходом в инфаркт миокарда, гангрены конечностей, хроническая почечная недостаточность.

Другие формы нарушения обмена глюкозы. Гипергликемия может развиваться при панкреатитах, гипертиреозе, болезни Иценко—Кушинга, передозировке гормональных препаратов, применяемых в лечебных целях.

Гипогликемия может быть связана с нарушением процессов переваривания и всасывания углеводов. Например, при дефиците панкреатической амилазы, сопровождающем заболевание поджелудочной железы. При наследственных энзимопатиях или ингибировании ферментов, продуцируемых слизистой кишечника с последующим нарушением переваривания дисахаридов. К гипогликемии при-

водят также энтероколиты, поносы. Различные формы гликогенозов приводят к гипогликемии, из-за нарушения процессов синтеза и расщепления гликогена. Гипогликемия может быть следствием гиперинсулинизма, то есть повышенной продукции инсулина. Например, при развитии инсуломы — аденомы инсулярного аппарата поджелудочной железы.

Тесты толерантности к глюкозе (ТТГ). Толерантность (устойчивость) организма к глюкозе изучают, главным образом, для выявления патологии поджелудочной железы и нарушений углеводного обмена. Проводятся данные тесты методом глюкозной или сахарной нагрузки. Следует подчеркнуть, что прибегают к углеводной нагрузке только в случае, если уровень глюкозы в крови натощак находится в пределах физиологической нормы.

На основании проведенного исследования строят гликемическую кривую, для чего полученные результаты определения глюкозы в пробах наносят на систему координат, в которой ось абсцисс представляет время взятия пробы, а ось ординат — значения концентрации глюкозы в крови.

У здорового человека, в результате приема углеводной нагрузки, развивается пищевая гипергликемия, но нормально функционирующая поджелудочная железа усиливает выработку инсулина в крови натощак, через 30 минут после приема нагрузки концентрация глюкозы превышает норму, через 1 час после нагрузки отмечается максимальный подъем уровня глюкозы в крови, но не превышающий почечный порог глюкозы, через 2 часа уровень глюкозы возвращается к норме и через 3 часа — в исходное значение. В моче, собранной во время нагрузки, глюкоза не определяется.

В гликемической кривой принято различать 2 фазы: гипергликемическую и гипогликемическую. На первую фазу, гипергликемическую, приходится участок кривой, лежащий в промежутке времени от момента приема нагрузки до максимального подъема уровня глюкозы в крови, то есть через 1 час после приема нагрузки. Формируется гипергликемия на этом участке кривой — через 30 минут, за счет рефлекторного расщепления гликогена в печени под воздействием сигналов, поступающих из ротовой полости и других участков пищеварительного канала (отсюда следует принимать нагрузку медленно, в течение 5 минут). Печень как бы готовится к приему больших количеств углеводов. На отрезке кривой от 30 минут до 1 часа развивается истинно

пищевая гипергликемия за счет всосавшейся из кишечника в кровь глюкозы, принятой с нагрузкой. Вторая фаза условно названная гипогликемической охватывает участок кривой от 1 часа до 3-х часов, после нагрузки. Здесь концентрация глюкозы в крови снижается и приходит к норме за счет усиленного выделения инсулина в ответ на раздражение здоровой поджелудочной железы. Для правильной трактовки результатов проведения ТТГ важен характер гликемической кривой, хотя в отдельных руководствах рекомендуется также рассчитывать и различные коэффициенты, например, коэффициент Бодуэна, равный отношению цифры максимального подъема глюкозы к ее изначальному значению, то есть натоцкак. Коэффициент Бодуэна в норме равен 1,3 — 1,5. Подъем выше 1,5 означает патологию. Но следует иметь в виду, что коэффициент имеет только относительное значение.

На результаты проводимых ТТГ могут влиять целый ряд факторов: прием стероидных препаратов, пероральных контрацептивов, диуретиков. Не проводят ТТГ в случае, если пациент был болен или соблюдал постельный режим в течение предшествовавших двух недель. Во время проведения ТТГ следует соблюдать покой и исключить курение.

Патологические типы гликемических кривых. При скрытой форме сахарного диабета гликемическая кривая приобретает высокий затяжной вид. Особенностью ее, во-первых, является значительное повышение концентрации глюкозы в крови через 1 час после нагрузки, превышающее почечный порог глюкозы и, как следствие, появление глюкозы в моче. Во-вторых, через 2 и 3 часа после приема нагрузки уровень глюкозы в крови к норме не возвращается. Объясняется такой тип гликемической кривой нарушением секреторной функции поджелудочной железы, когда недостаточно вырабатывается инсулина, или выделяющийся инсулин функционально неполноценен и не в состоянии обеспечить нормальную утилизацию больших количеств углеводов, поступающих в организм.

Аналогичный тип кривой может встречаться при других формах эндокринной патологии (гиперфункции передней доли гипофиза, коры надпочечников), а также при заболеваниях, сопровождающихся нарушением функции печени. Поэтому в сомнительных случаях, когда необходимо подтвердить диагноз скрыто протекающего сахарного диабета, прибегают к двойной углеводной нагрузке по Штаубу—Трауготту. Суть ее заключается в том, что после

взятия пробы крови для исследования на глюкозу через 2 часа от приема первой нагрузки больному предлагают принять повторную нагрузку с таким же количеством глюкозы (сахара), как и первоначальную. При сахарном диабете в пробе крови, взятой через 1 час после повторной нагрузки, концентрация глюкозы резко повышается по сравнению с тем значением, которое было через 2 часа и даже через 1 час после первоначальной нагрузки.

В случае же какой-либо другой патологии и, в частности, патологии печени, уровень глюкозы в этой пробе крови, хотя и не приходит к норме, но все равно снижается относительно предыдущих ее значений.

Уплощенный тип гликемической кривой с низким исходным значением глюкозы в крови, низкой вершиной и выраженной гипогликемической фазой наблюдается при гиперинсулинизме, связанном с аденомой островков Лангерганса, при гипотиреозе и болезни Аддисона. В моче в этих случаях может появляться глюкоза в результате ренальной глюкозурии.

Гликемические кривые с более быстрым, чем в норме, подъемом, в которых максимальная концентрация глюкозы отмечается уже через 30 минут после приема нагрузки и, соответственно, ускоряется гипогликемическая фаза, характерны для патологии, связанной с гиперфункцией щитовидной железы (Базедова болезнь). Это, очевидно, обусловлено более интенсивным течением обменных процессов при гипертиреозе.

В настоящее время ТТГ для характеристики эндокринной патологии, не связанной с поджелудочной железой, применяются крайне редко, а для диагностики печеночной патологии не применяются вообще.

ОСОБЕННОСТИ НАРУШЕНИЙ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА У ДЕТЕЙ

Содержание глюкозы в крови детей, как и у взрослых, составляет 3,5 — 5,5 ммоль/л. В детском возрасте гипергликемия, как временный метаболический синдром, обнаруживается при ряде патологических состояний: гиперпитуитаризме, гипертиреозидизме, гиперадренокортицизме, феохромоцитоме, тяжелом ацидозе, шоке, гастроэнтеритах, переедании, обильном питании после голода, заболеваниях ЦНС, тяжелых инфекциях, болезнях печени, гипотермии. Транзиторная гипергликемия может развиваться при лечении никотиновой кислотой, адреналином, кофеином, аминозином, морфином, при некоторых ви-

дах наркоза. Причина гипергликемий в перечисленных случаях, по-видимому, заключается в активации липолиза, глюконеогенеза и гликогенолиза. При непродолжительном применении указанных лекарств гипергликемии исчезают вслед за отменой препаратов. Длительное применение кортикостероидов может привести к развитию диабета. Опасно применение тиреоидина и соматотропного гормона. Подобным образом гипергликемии развиваются у детей при судорожных состояниях, особенно на фоне заболеваний, протекающих с лихорадкой.

При гипертонической дегидратации у недоношенных детей с низким весом при рождении (менее 1100 г) гипергликемия может развиваться при внутривенном введении глюкозы. В этом случае гипергликемия (>20 ммоль/л) является неблагоприятным прогностическим признаком и обычно сочетается с внутричерепным кровоизлиянием.

Новорожденным и детям грудного возраста, особенно недоношенным, свойственна алиментарная глюкозурия. Возникает через 30—60 минут после нагрузки глюкозой и продолжается до 5 часов. Интересно отметить, что несмотря на значительное понижение уровня сахара в крови после рождения, у новорожденных не появляются симптомы гипогликемической комы. Принято считать, что причиной физиологической гипогликемии новорожденных является, прежде всего, незрелость структуры печени, внезапный разрыв связи с резервами глюкозы матери, глюкозурия вследствие «незрелости» почечных канальцев, повышенная толерантность к адреналину.

После первого года жизни, показатели уровня глюкозы в крови продолжают повышаться и к 15 годам достигают нормального для взрослого уровня.

У детей вследствие анатомо-физиологических особенностей детского организма, несовершенства метаболической адаптации и более частого проявления наследственных дефектов гипогликемии встречаются значительно чаще, чем у взрослых. Гипогликемии у детей представляют клинико-метаболический синдром, наблюдаемый при многих наследственных и приобретенных заболеваниях. Наиболее часты следующие типы гипогликемий: 1) неонатальная гипогликемия; 2) гипогликемия новорожденных вследствие охлаждения; 3) гипогликемия с кетозом; 4) идиотическая спонтанная гипогликемия; 5) гипогликемия при недостаточности соматотропного гормона; 6) гипогликемия вследствие токсического действия медикаментов или повышенной чувствительности к ним.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА

Определение концентрации глюкозы в крови. Из множества методов исследования глюкозы в биологических жидкостях в качестве унифицированных для выполнения в КДЛ утверждены только два метода — орто-толуидиновый и глюкозооксидазный. Перечисленные методы различаются своей специфичностью и точностью, но обеспечивают объективную клиническую информацию при обследовании больных.

1. Орто-толуидиновый метод (Гультман, мод. Хиваринен-Никкила, 1962 г.). Метод не является абсолютно специфичным и точным. Кроме глюкозы, аналогичную реакцию с орто-толуидином дает галактоза. Для выполнения исследований данным методом необходима хорошо функционирующая вытяжная система, так как орто-толуидиновый реактив готовится на ледяной уксусной кислоте и при кипячении проб часть кислоты испаряется, вызывая у лиц, работающих в лаборатории, чувствительное раздражение слизистых. К тому же следует иметь в виду, что орто-толуидин относится к канцерогенным веществам.

2. Ферментативный, глюкозооксидазный метод (Нельсон, 1940 г.). Является наиболее специфичным и точным методом, менее трудоемкий. Позволяет определять только глюкозу.

4.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ В КРОВИ И В МОЧЕ ПО ЦВЕТНОЙ РЕАКЦИИ С ОРТО-ТОЛУИДИНОМ

Принцип. Глюкоза при нагревании с орто-толуидином в растворе уксусной кислоты дает зеленое окрашивание, интенсивность которого прямо пропорциональна концентрации сахара в крови, определяется колориметрически.

Реактивы. 1. Орто-толуидин, очищенный путем перегонки. Реактив должен иметь слегка желтоватую окраску. Хранят в холодильнике в посуде из темного стекла без доступа воздуха.

2. Ледяная уксусная кислота, х.ч.

3. 3% раствор трихлоруксусной кислоты.

4. Тиомочевина.

5. Орто-толуидиновый реактив. 0,15 г (1,5 г) тиомочевины растворяют в 94 мл (940 мл) ледяной уксусной кислоты и смешивают с 6 мл (60 мл) бесцветного или слегка желтоватого орто-толуидина. Реактив стоек. Хранят на холоде. Удобнее пользоваться готовым орто-толуидиновым реактивом.

6. Стандартный раствор глюкозы 500 мг%. (27,75 ммоль/л).

В мерной колбе на 100 мл растворяют 500 мг высушенной до постоянного веса при $t^{\circ} +100^{\circ} \text{C}$ глюкозы в 0,2% растворе бензойной кислоты. Раствор бензойной кислоты готовят следующим образом: 0,2 г кристаллической бензойной кислоты растворяют в небольшом количестве воды, нагревая на водяной бане до полного растворения. После охлаждения до комнатной температуры переносят в мерную колбу на 100 мл и доливают до метки дистиллированной водой. Бензойная кислота увеличивает стабильность стандартного раствора глюкозы.

Можно также пользоваться водным раствором глюкозы, однако, время хранения такого стандарта значительно меньше. Экстинция стандарта не должна давать резких колебаний, в противном случае необходимо приготовить новый стандарт. Хранить в холодильнике.

Ход определения. В центрифужную пробирку наливают 0,9 мл 3% трихлоруксусной кислоты и выдувают на стенку ее 0,1 мл крови, взятой микропипеткой из пальца. Взбалтывают и центрифугируют. К 0,5 мл центрифугата добавляют 4,5 мл орто-толуидинового реактива. Пробирку со смесью помещают в кипящую водяную баню на 8 минут (точно!) и сразу охлаждают под водопроводной водой до комнатной температуры. Колориметрируют на ФЭКе против контрольной пробы или воды (т.к. экстинция контрольной пробы на реактивы практически равна нулю), в кювете шириной 10 мм при красном (600 — 650 нм) или оранжевом (595 нм) светофилтре.

При постановке контрольной пробы (в чем нет необходимости) к 4,5 мл орто-толуидинового реактива добавляют 0,5 мл трихлоруксусной кислоты. Далее пробу обрабатывают как опытную.

Примечание: 1. После кипячения изредка содержимое пробирок бывает мутноватым. В таких случаях пробы необходимо отцентрифугировать в течение 10 минут, затем отобрать и проколориметрировать надосадочную жидкость.

Данным методом может быть определена глюкоза в спинномозговой жидкости.

Стандартная проба. Стандартные пробы ставят как опытные, но вместо сыворотки берут стандартный раствор глюкозы с концентрацией 100 мг% (5,55 ммоль/л). В случае высокого содержания сахара в крови используется стандартный раствор с концентрацией 300 или 500 мг% (16,65 или 27,75 ммоль/л).

Расчет ведут по формуле:

$$C_{\text{он}} = \frac{C_{\text{ст}} \cdot E_{\text{он}}}{E_{\text{ст}}} = \text{мг\% (ммоль / л) глюкозы, где:}$$

$C_{\text{он}}$ — концентрация глюкозы в опытной пробе;

$C_{\text{ст}}$ — концентрация глюкозы в стандартной пробе, близкая к физиологической (100 мг%);

$E_{\text{он}}$ — оптическая плотность опытной пробы;

$E_{\text{ст}}$ — оптическая плотность стандартной пробы.

Расчет можно производить по калибровочным кривым или с использованием коэффициента перерасчета.

Построение калибровочной кривой. Из основного стандартного раствора глюкозы (1000 мг% или 55,5 ммоль/л) берут 8, 10, 20, 30, 40 мл и доводят объем 0,2% раствором бензойной кислоты до 100 мл. Полученные таким путем рабочие стандартные растворы содержат соответственно 80, 100, 200, 300, 400 мг% (4,4; 5,5; 11,0; 16,5; 22 ммоль/л) глюкозы.

Стандартные пробы обрабатываются, как опытные. Измерения производят на ФЭКе против воды (или контроля на реактивы) в кювете шириной 10 мм при красном (или оранжевом) светофильтре. Полученные значения используют для построения калибровочной кривой.

При пользовании другой серией орто-толуидина необходимо каждый раз готовить новую калибровочную кривую. Учитывая это обстоятельство, а также большую сложность соблюдения строгого постоянства условий нежелательно рассчитывать концентрацию глюкозы по калибровочной кривой.

Нормальные величины: 60—100 мг/100 мл, 3,33—5,55 ммоль/л.

Примечание. 1. При содержании глюкозы в концентрации более 400 мг% исходное количество уменьшают в 2 раза и исследование повторяют. 2. Содержание глюкозы в артериальной крови выше, чем в венозной. Это объясняется непрерывным использованием глюкозы клетками тканей и органов. 3. При стоянии сыворотки содержание сахара в ней понижается.

4.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ В МОЧЕ

Исследуемый материал: Моча. Собирать в бутылку из темного стекла; хранить на льду. Консерванты для суточной мочи — ледяная уксусная кислота (5 мл), бензоат или фторид натрия (5 г).

После проведения качественной пробы на содержание глюкозы мочу разводят в 2—10 раз в зависимости от характера реакции.

0,1 мл разведенной мочи смешивают с 4,5 мл орто-толуидинового реактива и далее пробы обрабатывают, как опытные при определении глюкозы в крови.

При расчете надо учитывать соответствующее разведение мочи. В норме моча содержит следы глюкозы.

Нормальные величины:

<0,5 г/сутки	<2,78 ммоль/сут
1—15 мг/100 мл	0,06—0,83 ммоль/л

Влияющие факторы: *Повышение:* Аминосалициловая кислота, кортикостероиды, D-тироксин, диуретики, ЭДТА, карбонат лития, никотиновая кислота, отравления свинцом у детей.

Диагностическая значимость. *Повышение в моче* отмечено во всех случаях повышения концентрации глюкозы в крови, особенно при быстрой абсорбции в кишечнике: при демпинг-синдроме после гастроэктомии, беременности.

Эндокринные нарушения: сахарный диабет, тиреотоксикоз, гигантизм, акромегалия, синдром Кушинга, гиперплазия коры надпочечников, болезни почек.

Примечание. Наличие белка в моче не влияет на определение глюкозы.

4.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ ГЛЮКОЗООКСИДАЗНЫМ МЕТОДОМ

Принцип. Глюкоза в присутствии фермента глюкозооксидазы окисляется кислородом воздуха с образованием перекиси водорода. Перекись водорода окисляет о-толуидин с образованием окрашенного соединения, интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию глюкозы.

Исследуемый материал: 1. Сыворотка крови. Быстро отделить клетки от сыворотки для предупреждения потерь глюкозы.

2. Плазма (фторид натрия). Проба стабильна 8 часов при комнатной температуре, 3 суток в холодильнике. Не допускать гемолиза.

Реактивы. 1. Кристаллический препарат глюкозооксидазы (β -D-глюкоза: оксидоредуктаза 1.1.3.4.). Хранят в холодильнике в герметической упаковке.

2. Кристаллический препарат пероксидазы (перекись водорода: оксидоредуктаза, 1.2.1.7). Хранят в холодильнике в герметической упаковке.

3. 0,9% раствор хлористого натрия.
4. 0,25 М раствор уксуснокислого натрия. 17 г кристаллического уксуснокислого натрия ($\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$) растворяют в мерной колбе на 500 мл в небольшом количестве воды и доводят дистиллированной водой до метки.
5. 0,25 М раствор уксусной кислоты. В мерную колбу на 500 мл наливают небольшое количество воды, добавляют 7,75 мл ледяной уксусной кислоты и доводят объем дистиллированной водой до метки.
7. 0,25 М ацетатный буфер рН 4,8. 0,25 М раствор уксуснокислого натрия смешивают с 0,25 М раствором уксусной кислоты в соотношении 6:4. Проверяют рН на рН-метре. Буферный раствор стабилен при хранении в холодильнике в течение месяца.
8. 5% раствор сернокислого цинка. Раствор стабилен. Хранят при комнатной температуре.
9. 0,3 н раствор едкого натрия.
Растворы сернокислого цинка и едкого натра берут для реакции в эквивалентных количествах, т.е. они должны нейтрализовать друг друга. Для этого раствор сернокислого цинка титруют раствором едкого натра до нейтральной реакции по фенолфталеину (слабо-розовая окраска). Если на титрование пошло равное количество растворов, то они пригодны для реакции.
9. Орто-толуидин, чда.
10. Абсолютный этиловый спирт (полученный в лаборатории или коммерческий).
11. 1% раствор о-толуидина в абсолютном этиловом спирте. 1 г о-толуидина растворяют в небольшом количестве теплого этилового спирта. После охлаждения доводят объем этиловым спиртом до 100 мл. Раствор стабилен в течение нескольких месяцев при хранении в холодильнике, в плотно закрытой посуде из темного стекла.
12. Энзимо-хромогенный реактив. В мерную колбу на 500 мл помещают 300—400 мл 0,25 М ацетатного буфера, (рН 4,8) добавляют 10 мг глюкозооксидазы (навеска взята из расчета активности глюкозооксидазы — 92 000 ед. на 1 г препарата; при применении препарата с другой активностью фермента соответственно будет меняться величина навески), перемешивают до полного растворения, добавляют 5 мг пероксидазы. Смесь перемешивают до полного растворения. Добавляют 5 мл 1% раствора о-толуидина и доводят до метки ацетатным буфером, фильтруют. Реактив стабилен в течение 3—4 недель при хранении в холодильнике в плотно закрытой посуде из темного стекла.

Свежеприготовленный реактив бесцветен или окрашен в слабо-зеленый цвет. Годен к употреблению через 2 ч после приготовления. Если реактив имеет интенсивно зеленый цвет, то это свидетельствует о загрязнении о-толуидина. В этом случае о-толуидин необходимо перекристаллизовать.

13. 0,2% раствор бензойной кислоты. Раствор готовят при нагревании.

14. Стандартный раствор Д-глюкозы в 0,2% растворе бензойной кислоты.

Высушенную до постоянного веса при 37°C Д-глюкозу хранят в эксикаторе. 500 мг глюкозы растворяют в мерной колбе на 100 мл в 0,2% растворе бензойной кислоты. Оставляют стоять на свету в течение 12—16 ч. 1 мл стандартного раствора содержит 5 мг глюкозы.

Ход определения. Опытная проба. В центрифужную пробирку помещают 1,1 мл 0,9% раствора хлористого натрия, добавляют 0,1 мл крови (плазмы, сыворотки или спинномозговой жидкости), несколько раз промывают пипетку, приливают 0,4 мл 5% раствора серноокислого цинка и 0,4 мл 0,3 М раствора едкого натра. Тщательно перемешивают и через 10 мин центрифугируют при 2500 об/мин в течение 10 мин. Тотчас же сливают надосадочную жидкость.

К 1 мл надосадочной жидкости добавляют 3 мл энзимо-хромогенного реактива, доведенного предварительно до комнатной температуры. Осторожно перемешивают и на 20—23-й минуте измеряют экстинцию на фотоэлектроколориметре в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 625 нм (красный светофильтр) против контрольной пробы.

Контрольная проба. К 1 мл дистиллированной воды добавляют 3 мл энзимо-хромогенного реактива.

Серия не должна превышать 10—15 проб; при этом надо строго соблюдать, чтобы время с момента добавления энзимо-хромогенного реактива до измерения было во всех пробах одинаковым.

Расчет производят по формуле: $C_{\text{оп}} = E_{\text{оп}} / E_{\text{ст}} \cdot C_{\text{ст}}$, где:

$C_{\text{оп}}$ — концентрация глюкозы в крови, мг%;

$C_{\text{ст}}$ — концентрация глюкозы в стандартном растворе;

$E_{\text{оп}}$ — экстинция опытной пробы;

$E_{\text{ст}}$ — экстинция стандартной пробы.

Поскольку результаты определений зависят в значительной степени от условий опыта, то стандартную пробу

ставят параллельно с опытной и обрабатывают ее так же, как и опытную. На I серию ставят I стандартную пробу. Линейная зависимость между оптической плотностью и концентрацией глюкозы сохраняется от 0 до 400 мг% (до 22,2 ммоль/л).

Нормальные величины в крови.

	мг/100 мл	ммоль/л
Кровь из пуповины:	45—96	2,50—5,33
Недоношенные:	20—60	1,11—3,33
новорожденные:	30—60	1,67—3,33
новорожденные: 1 день	40—60	2,22—3,33
>дня	50—80	2,78—4,44
Дети:	60—100	3,33—5,55
Взрослые:	70—105	3,89—5,83
>60 лет	80—115	4,44—6,38
>70 лет	83—110	4,61—6,10

Факторы, влияющие на результаты исследования: К повышению приводит применение кофеина, кортикостероидов, АКТГ, Д-тироксина, адреналина, пероральных контрацептивов, карбоната лития, никотиновой кислоты (в больших количествах), фенотиазины, диуретики.

При использовании о-толуидинового метода — аскорбиновая кислота, декстран, фруктоза, галактоза, манноза, рибоза, ксилоза, билирубин.

К понижению приводит прием ацетоминофена, анаболических стероидов (у больных диабетом) антигистаминных препаратов, ацетилсалициловой кислоты (в токсичных дозах), этанол.

Диагностическая значимость:

Повышение: Первичное действие: сахарный диабет (у взрослых и юношеский). Физиологическое значение: энергичные физические упражнения; сильное эмоциональное возбуждение; повышенный выброс адреналина при инъекциях, шоке, ожогах, инфекции. Эндокринные нарушения: феохромоцитомы, тиреотоксикоз, акромегалия, гигантизм, синдром Кушинга, глюкагонома, соматостатиннома. Заболевания поджелудочной железы: острый и хронический панкреатит, панкреатит, вызванный вирусом паротита, муковисцидоз, гемохроматоз, опухоль поджелудочной железы. Связь с другими заболеваниями: кровоиз-

лияние в мозг, острый инфаркт миокарда или тяжелая стенокардия, хронические заболевания печени и почек.

Понижение. *Заболевания поджелудочной железы:* опухоль панкреатических островков, дефицит глюкогона. *Опухоли:* рак надпочечников, желудка, фибросаркома. *Тяжелые поражения печени:* отравления (мышьяком, фосфором, алкоголем, салицилатами, фенформином, антигистаминными препаратами). *Эндокринные нарушения:* гипопитуитаризм, аддисонова болезнь, гипотиреоз. *Функциональные нарушения:* после гастрэктомии, гастроэнтеростомии, поражения вегетативной нервной системы. *У детей:* недоношенность, в возрасте до 1 года, если мать больна диабетом; кетонемическая гипогликемия, синдром Цеттерстрема, идиопатическая чувствительность к лейцину. *Заболевания, связанные с дефицитом ферментов:* синдром Гирке, галактоземия, нарушения толерантности к глюкозе.

Примечания. 1. Концентрация глюкозы в артериальной крови выше, чем в венозной. Для проб натощак необходимо голодание в течение 6—8 часов. 2. Цельную кровь необходимо исследовать немедленно после взятия. 3. В каждую последующую пробу серии энзимо-хромогенный реактив добавляют с интервалом в 1 минуту. 4. Для получения более точных результатов время максимума окрашивания (20—23 мин) устанавливают в каждой серии определений по нарастанию первой опытной пробы. 5. За три дня до исследования нужно исключить прием аскорбиновой кислоты, антибиотиков тетрациклинового ряда.

4.4. ИССЛЕДОВАНИЕ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА МЕТОДАМИ НАГРУЗОК

Исследование углеводного обмена в клинике обычно начинают с анализа мочи на присутствие глюкозы и кетонных тел, поскольку появление последних тесно связано с нарушениями углеводного обмена, затем производят определение глюкозы в крови. Колебания концентрации глюкозы натощак у одного и того же человека в разные дни находится в пределах 3,5 — 5,5 ммоль/л. Более резкие колебания должны рассматриваться как проявление нарушения тонуса вегетативной нервной системы. Изменения состояния вегетативной нервной системы могут наблюдаться и у здоровых людей, особенно у юношей и детей, что свидетельствует о неустойчивости и повышенной возбудимости в этом возрасте их нервной системы.

Если в результате исследований обнаружено повышение концентрации сахара в крови и кетонных тел в моче, то этого оказывается достаточно для подтверждения диагноза диабета. Начальные стадии сахарного диабета могут протекать без гипергликемии. Это расценивается как скры-

тый или латентный сахарный диабет. В этих случаях более углубленное исследование углеводного обмена производится при помощи так называемой сахарной нагрузки.

Стандартный тест на толерантность к глюкозе — наиболее простой, доступный для широкого использования и достаточно эффективный метод раннего выявления скрытых нарушений углеводного обмена. Изучение ее включает в себя динамическое исследование уровня глюкозы в крови натощак (эндогенная гликемия), через 30, 60, 120, 180 мин после перорального приема глюкозы. При проведении массовых обследований комитетом экспертов ВОЗ по сахарному диабету рекомендуется только трехкратное исследование гликемии после нагрузки глюкозой.

Выполняют пробу с углеводной нагрузкой следующим образом: утром, натощак, берут у больного первую пробу капиллярной крови для исследования на глюкозу, затем ему дают принять нагрузку, которую готовят из расчета 1,0 г глюкозы, или 2,0 г сахара на 1 кг массы тела. Лучше применять глюкозу, она дает наиболее четкий характер гликемической кривой. Обычно для людей средней массы тела достаточно в качестве принять 50,0 глюкозы, либо 100,0 г сахара.

Для детей нагрузку рассчитывают таким же образом, но нужно иметь в виду, что в нагрузку должно войти не менее 25,0 г глюкозы. Так, детям в возрасте от 1,5 до 3 лет следует давать глюкозу, исходя из соотношения 2 г/кг; от 3 до 12 лет — 1,75 г/кг; после 12 лет — 1,25 г/кг.

Необходимое количество глюкозы (сахара) растворяют в двух стаканах теплой воды. В меньшем объеме трудно растворить все количество глюкозы или, тем более, сахара и такой раствор тяжелее выпить. Больному следует объяснить, что нагрузку необходимо выпить медленно, не залпом, но не более, чем за 5 минут. За это время формируется адекватная физиологическая реакция организма на прием большого количества углеводов. После приема нагрузки берут пробы крови для исследования на глюкозу в течение 3-х часов: через 30 минут, 1 час, 2 часа, 3 часа. За все это время проведения нагрузки больной должен собирать в одну емкость мочу, которую также исследуют на наличие глюкозы.

На основании полученных данных строят кривую, откладывая на вертикальной оси концентрацию глюкозы, а на горизонтальной — время, в минутах или часах.

Анализ гликемических кривых.

У здорового человека исходное содержание глюкозы в крови составляет >5 ммоль/л. После приема нагрузки в

течение часа вследствие всасывания глюкозы содержание сахара в крови умеренно возрастает. В ответ на развивающуюся гипергликемию усиливается секреция инсулина, глюкоза переходит в ткани и содержание ее в крови к 3 часам после нагрузки снижается до исходного уровня или даже несколько ниже.

У больного скрытым сахарным диабетом исходное содержание глюкозы в крови на верхней границы нормы (5,7 ммоль/л). После нагрузки подъем в крови выражен в большей степени и к третьему часу не достигает исходного содержания вследствие недостаточной выработки инсулина.

У больного явным сахарным диабетом натощак определяется гипергликемия (≈ 9 ммоль/л). К первому часу — выраженный подъем уровня глюкозы в крови (≈ 15 ммоль/л) и к 3-му часу снижение незначительное, не достигает исходной величины вследствие инсулиновой недостаточности.

Гликемические кривые у детей имеют тот же характер, что и у взрослых, с тем лишь отличием, что повышение концентрации сахара в крови у детей достигает меньших величин.

Патофизиологические механизмы, обуславливающие динамику изменения концентрации сахара в крови после углеводной нагрузки

1. Первый подъем уровня сахара после введения углеводов отражает силу рефлекторного раздражения симпатических нервов, возникающего при попадании глюкозы в пищеварительный канал. При этом, в зависимости от тонуса симпатической нервной системы содержание сахара может повышаться (или понижаться) в известных пределах даже у здорового человека.

2. Дальнейшее повышение концентрации сахара, как правило, зависит от скорости всасывания углеводов, функции печени и остальных органов. У здорового человека содержание сахара в крови через час после приема нагрузки на 50 — 75% превышает уровень сахара крови натощак.

3. Нисходящее колено гликемической кривой отражает продукцию инсулина и зависит от состояния парасимпатической нервной системы, функции поджелудочной железы, печени и других органов. Этот отрезок гликемической кривой носит название гипогликемической фазы.

4. Последняя точка на гликемической кривой, определяемая через 2,5—3 часа, зависит от равновесия всех участвующих систем. В норме она должна совпадать с цифрой содержания сахара в крови натощак.

Нормальные величины.

	мг/100 мл		ммоль/л	
	У здоровых лиц	У больных диабетом	У здоровых лиц	У больных диабетом
Натощак	70—105	>115	3,9—5,8	>6,4
Через 60 минут	120—170	>200	6,7—9,4	>11,1
Через 90 минут	100—140	>200	5,6—7,8	>11,1
Через 120 минут	70—120	>140	3,9—6,7	>7,8

Коэффициент перевода мг/100 мл в ммоль/л — 0,0555, обратно — 18,02.

По данным некоторых авторов, при построении сахарной кривой нет необходимости исследовать кровь больного через каждые полчаса, т.к. характер кривой от введения дополнительных цифр в основном не меняется, поскольку он определяется теми процессами, которые выявляют себя в названных 4-х пунктах гликемической кривой.

Двухразовая нагрузочная проба глюкозой. Обычной реакцией здоровых людей на двухразовую нагрузку глюкозой является небольшое изменение или отсутствие изменений гликемии, в то время как больные сахарным диабетом обязательно дают гипергликемию. Этот феномен известен в диагностической практике как феномен Штауба—Трауготта. В настоящее время в педиатрической практике получила довольно широкое распространение модификация этого метода, предложенная Exton (Am.J. clin. Path. 1934, 4, 381).

Методика. Растворяют 100 г глюкозы в 600—700 мл воды, добавив в этот раствор несколько капель лимонного сока. Весь объем раствора делят на две равные части, каждая из которых содержит по 50 г глюкозы. Утром натощак собирают мочу и берут кровь для определения исходного содержания сахара в них, а затем дают первую дозу глюкозы. Через 30 минут вновь берут кровь, затем дают вторую дозу глюкозы. Через 30 минут после приема второй дозы собирают вновь мочу и берут кровь на глюкозу.

Показателями нормальной реакции на двойную нагрузку глюкозой являются: 1) нормальное исходное со-

держание глюкозы в крови; 2) повышение уровня глюкозы после первой нагрузки по сравнению с исходным не более чем на 2,77—3,33 ммоль/л; 3) содержание глюкозы в крови после второй дозы, не превышающее 1,66 ммоль/л от исходного уровня; 4) отсутствие сахара во всех собранных порциях мочи.

У детей с пониженной толерантностью к глюкозе вторая доза вызывает второй резкий подъем сахарной кривой, достигая уровня, в 2 раза превышающего исходный. Такая реакция типична для детей, страдающих сахарным диабетом. Кроме того, в порции мочи, собранной через 60 минут, всегда содержится сахар.

Диабетический тип кривой иногда наблюдается при заболеваниях печени и повышении функции щитовидной железы. Но в этих случаях никогда не бывает глюкозурии.

Влияющие факторы. Прием салицилатов (в больших дозах), клофибрата, кортикостероидов, диуретиков, кофеина дает пониженные результаты.

Клиническое значение. Сахарный диабет у взрослых (за исключением беременных женщин). Сахарный диабет у детей: повышенный уровень глюкозы натощак и сохраняющийся повышенный уровень глюкозы во время теста при неоднократном определении. Нарушение толерантности к глюкозе у детей: натощак — <140 мг/100 мл; через 120 мин — >140; уровни через 60, 90 и 120 мин могут превышать 200 мг/100 мл.

Повышение уровня глюкозы. Толерантность при следующих состояниях: 1) малая скорость абсорбции из кишечника — гипофункция надпочечников; гипопитуитаризм с вторичной гипофункцией надпочечников, заболевания кишечника, в том числе стеаторея, туберкулезный энтерит, гипотиреоз; 2) избыточная секреция инсулина — гиперплазия, аденома или рак панкреатических островков (при этом может отмечаться сильно выраженная гипогликемия).

Понижение уровня глюкозы. Толерантность: 1) повышенная скорость абсорбции из кишечника — избыточный прием глюкозы с пищей, гипертиреоз, состояния после гастрэктомии, гастроэнтеростомии и ваготомии, язва двенадцатиперстной кишки; 2) повышенный гликогенолиз и глюконеогенез — гипертиреоз; гиперфункция надпочечников, связанная с эмоциональным возбуждением, токсемия, связанная с инфекциями; беременность; 3) поражения печени, гликогенозы; 4) преддиабет, сахарный диабет, стероидный диабет, травмы мозга.

4.5. ТЕСТ С Д(+) КСИЛОЗНОЙ НАГРУЗКОЙ

Тест с д (+) ксилозой используется для диагностики нарушения всасывания в тонкой кишке.

Материал для исследования. Моча, кровь.

Реактивы. 1. 5% раствор $ZnSO_4$.

2. 0,3 н $NaOH$.

3. Реактив Биала. Растворить 375 мг орцинола и 75 мг хлорного железа ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) в 250 мл концентрированной HCl . Хранят в холодильнике, в темной посуде. Годен в течение 2 недель.

4. Стандартный раствор ксилозы. 0,1 г ксилозы в 100 мл 0,25% водного раствора бензойной кислоты. Готовят из той же самой партии ксилозы, которую применяют для нагрузки.

Ход исследования. С вечера готовили пробирки для забора крови: наливали по 2,0 мл 5% раствор $ZnSO_4$ и ставили в холодильник. На следующий день в 1 пробирку брали 0,1 мл крови и собирали первую порцию мочи. Эти пробы служили контрольными по отношению к последующим. Затем ребенку давали выпить растворенную в воде ксилозу в расчете 0,2 г на 1 кг веса. Кровь брали через 30 минут, 1 и 2 часа после дачи ксилозы. В конце второго часа собирают 2-ую (2-часовую) порцию мочи, а через 3 часа после второй — третью (3-часовую). Во время проведения пробы ребенок не получал ни лекарств, ни пищи.

Мочу перед исследованием центрифугируют и разводят в 50 раз дистиллированной водой (0,1 мл мочи + 4,9 мл H_2O).

Подготовка проб для исследования проводится по следующей схеме:

	Холостой опыт	Опыт	Холостая проба к стандарту	Стандарт
5% раствор $ZnSO_4$ (в мл)	2,0	2,0	2,0	2,0
Сыворотка, кровь или разведенная моча до нагрузки ксилозой (в мл)	0,1	—	—	—
Вода (в мл)	—	—	1,0	—
Сыворотка, кровь или разведенная моча после нагрузки ксилозой (мл)	—	0,1	—	—
Стандартный р-р ксилозы (в мл)	—	—	—	0,1
0,3 н $NaOH$ (мл)	2,0	2,0	2,0	2,0

Содержимое пробирок тщательно перемешивают и центрифугируют в течение 10 минут при 3000 об/мин. 2,0 мл прозрачного центрифугата переносят в пробирки, добавляют по 2,0 мл р-ра Биала, перемешивают и ставят в кипящую водяную баню на 20 минут. Охлаждают и измеряют величину оптической плотности каждой пробы, против соответствующей холостой пробы при 670 нм. По этим данным рассчитывают процент экскреции ксилозы за 2 и 3 часа отдельно и их сумму — экскрецию ксилозы за 5 часов.

Нормальные значения. Средняя величина экскреции ксилозы у здоровых детей составляет $33,17 \pm 3,02\%$. Уровень ксилозы в крови здоровых детей достигал своей максимальной величины через час после введения ксилозы, а затем снижался.

В моче самая низкая величина экскреции ксилозы за 5 часов составляет 20,9% от введенной дозы.

Примечания. Наиболее выраженные отличия в концентрации ксилозы наблюдаются в образцах крови, взятых через 30 минут и через 1 час после дачи ксилозы.

4.6. ИССЛЕДОВАНИЕ ГЛИКОПРОТЕИДОВ И СЕРОМУКОИДОВ (МУКОПРОТЕИДОВ). ОПРЕДЕЛЕНИЕ СИАЛОВЫХ КИСЛОТ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ (ПРОБА ГЕССА)

Принцип метода. Сиаловые кислоты освобождаются в результате гидролиза углеводсодержащих белков и образуют окрашенное соединение при нагревании с раствором кислот.

Реактивы. 1. 10% раствор трихлоруксусной кислоты; 2. 5% раствор серной кислоты в ледяной уксусной кислоте (95 мл ледяной уксусной кислоты и 5 мл концентрированной серной кислоты). 3. Основной стандартный раствор (500 мг/л) N-ацетилнейраминовой кислоты — водный.

Ход определения. В центрифужную пробирку вносят 1 мл сыворотки крови, добавляют 1 мл 10% раствора трихлоруксусной кислоты и осторожно перемешивают. Пробирку помещают точно на 5 мин в кипящую водяную баню, затем охлаждают в холодной воде со льдом (или холодной проточной воде) 5 мин. Встряхивают для отделения осадка от стенок и центрифугируют в течение 5 мин при 1500 — 2000 об/мин; 0,4 мл надосадочной жидкости переносят в пробирку, добавляют 5 мл уксусно-серноокислой смеси и снова ставят пробы в кипящую баню на 30 мин. При этом образуется красно-фиолетовое окрашивание. Затем раствор охлаждают до комнатной температуры и измеряют на ФЭКе

при длине волны 500—560 нм (зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 10 мм против контроля.

Контроль — уксусно-сернокислый реактив.

Расчет ведут по калибровочному графику.

Построение калибровочного графика.

Из основного стандартного раствора N-ацетилнейраминовой кислоты готовят рабочие растворы, согласно таблице 4.1. К растворам прибавляют 5 мл уксусно-сернокислого реактива и обрабатывают их, как опытные пробы.

Таблица 4.1.

Рабочие стандартные растворы для определения синаловых кислот

№	Основной стандартный раствор N-ацетилнейраминовой кислоты, мл	Дистиллированная вода, мл	Концентрация N-ацетилнейраминовой кислоты, мг/л
1	0,10	0,30	250
2	0,15	0,25	370
3	0,20	0,20	500
4	0,25	0,15	620
5	0,30	0,10	750
6	0,40	—	1000

Примечания. При отсутствии стандарта результат выражают в условных единицах, для этого полученную величину экстинкции умножают на 1000. Норма в этом случае — 135 — 200 условных единиц.

2. Кровь для анализа следует брать натощак, определение провести в тот же день.

Норма — 620 — 730 мг/л N-ацетилнейраминовой кислоты.

4.7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕКСОЗ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ОРЦИНОВЫМ МЕТОДОМ ПОСЛЕ ГИДРОЛИЗА СЕРНОЙ КИСЛОТОЙ

Принцип. Гликопротеиды, содержащие гексозы, выделяются из сыворотки крови 96% этанолом. Освобожденные в результате гидролиза гексозы образуют с орциновым реактивом розовое окрашивание, интенсивность которого пропорциональна содержанию гексоз.

Реактивы: 1. 96% этиловый спирт.

2. 0,1 н раствор едкого натра.

3. Серная кислота концентрированная (для пробы Саваля);

4. Орциновый реактив. Реактив А — 40 мл дистиллированной воды и 60 мл концентрированной серной кислоты. Реактив Б — 1,6 г перекристаллизованного орцина растворяют в 100 мл воды. Раствор хранят в темноте в течение 1

месяца при температуре +4°C. Непосредственно перед опытом смешивают 7,5 мл реактива А с 1 мл реактива Б.

5. Стандартный раствор галактозы и маннозы. 50 мг галактозы и 50 мг маннозы растворяют в мерной колбе на 100 мл в небольшом количестве дистиллированной воды и доводят водой до метки.

Ход определения. К 0,1 мл сыворотки в центрифужной пробирке добавляют 5,0 мл 96% этанола, перемешивают, центрифугируют 15 мин, центрифугат сливают. Осадок повторно взбалтывают в 5 мл 96% этанола, центрифугируют и снова сливают. Белковый осадок растворяют в 1 мл 0,1 н раствора едкого натра, добавляют 8,5 мл орцинового реактива, перемешивают и ставят в водяную баню при 80°C точно на 5 минут. Следует избегать попадания на пробирки дневного света. Охлаждают пробирки в воде со льдом в течение 5 минут, после чего пробы колориметрируют на ФЭКе с зеленым светофильтром (500 — 560 нм) в кювете, толщиной слоя 10 мм против контрольной пробы.

Контроль. К 0,1 мл 0,1 н раствора едкого натра добавляют 8,5 мл орцинового реактива, перемешивают и далее обрабатывают как опыт.

Расчет производят по калибровочному графику или по формуле:

$$C_x = \frac{E_{\text{оп}} \cdot C_{\text{ст}}}{E_{\text{ст}}} \text{ где: } C_{\text{ст}} \text{ равна } 1000 \text{ мг/л.}$$

Построение калибровочного графика. Из основного стандартного раствора делают разведения (табл.4.2.). Стандартные пробы далее обрабатывают, как опытные.

Таблица 4.2.

Растворы для построения калибровочного графика

№ пробирки	Стандартный раствор галактозы и маннозы, мл	0,1 н раствор едкого натра, мл	Орциновый реактив, мл	Концентрация гексоз, мг/л
1	0,05	0,95	8,5	500
2	0,10	0,90	8,5	1000
3	0,15	0,85	8,5	1500
4	0,20	0,80	8,5	2000
5	0,25	0,75	8,5	2500
6	0,30	0,70	8,5	3000

Нормальные величины. В норме концентрация гексоз, связанных с белком, в сыворотке крови 1050 — 1150 мг/л.

Примечание. Рекомендуется применять перекристаллизованный орцин. Для очистки орцин расплавляют, нагревая на водяной бане до 60—65°С. При этом, вода, присутствующая в препарате, выпаривается. Остаток перекристаллизовывают из бензола с добавлением активированного угля.

4.8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СЕРОМУКОИДА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПО СОДЕРЖАНИЮ В НЕМ ГЕКСОЗ

Принцип метода. Основан на выделении серомукоида фосфорно-вольфрамовой кислотой из хлорного фильтра сыворотки крови и количественном определении в нем гексоз орциновым методом. Концентрацию серомукоида вычисляют по гексозам.

Реактивы. Те же, что и в описанном выше орциновом методе определения гексоз, связанных с белками.

Дополнительные реактивы: 1) 6% раствор хлорной кислоты НСЮ,

2) 5% раствор фосфорно-вольфрамовой кислоты, приготовленный на 2 н растворе НСІ.

Ход определения. В центрифужную пробирку вносят 1 мл сыворотки крови и 1 мл дистиллированной воды; после перемешивания по стенке пробирки приливают 2 мл 6% раствора хлорной кислоты и опять перемешивают содержимое пробирки стеклянной палочкой. Через 10 минут пробу центрифугируют в течение 10 мин при 3000—4000 об/мин. Надосадочную жидкость тщательно сливают в другую центрифужную пробирку, в которую добавляют 2 мл 5% раствора фосфорно-вольфрамовой кислоты. После встряхивания осадок серомукоида отделяют центрифугированием в течение 5 минут. Надосадочную жидкость сливают, к осадку прибавляют 2 мл 96% этилового спирта, хорошо взбалтывают и центрифугируют 10 минут. Центрифугат вновь сливают, осадок растворяют в 1 мл 0,1 н едкого натра, добавляют 8,5 мл орцинового реактива, перемешивают и ставят в водяную баню при 80°С точно на 15 минут. Следует избегать попадания прямого света на пробирки. Охлаждают пробирки в холодной водопроводной воде или в воде со льдом. После охлаждения измеряют экстинцию пробы при зеленом светофильтре (длина волны 500—560 нм) в кюветах толщиной слоя 10 мм против контрольной пробы.

Контроль. К 1 мл 0,1 н едкого натра добавляют 8,5 мл орцинового реактива, перемешивают и далее обрабатывают как опыт.

Расчет производят по калибровочному графику или по формуле.

Построение калибровочного графика. Из основного стандартного раствора готовят разведения согласно таблице 4.3. Стандартные пробы обрабатывают, как опытные.

Таблица 4.3.

Растворы для построения калибровочного графика

№ пробирки	Стандартный раствор галактозы и манназы, мл	0,1 н раствор едкого натра, мл	Орциновый реактив, мл	Концентрация гексоз, мг/л
1	0,10	0,90	8,5	100
2	0,20	0,80	8,5	200
3	0,25	0,75	8,5	250
4	0,30	0,70	8,5	300
5	0,40	0,60	8,5	400
6	0,50	0,50	8,5	500

При расчете по формуле $C_x = \frac{E_{\text{оп}} \cdot 200}{E_{\text{ст}}}$ используют стандартный раствор, соответствующий содержанию гексоз 200 мг/л.

В норме концентрация серомукоида в крови, определенная по гексозам, составляет 220 — 280 мг/л.

Примечания: 1. Температура в водяной бане должна быть точно 80°C в течение всего периода нагревания.

2. Хлорная кислота поступает в продажу с определенным содержанием воды. Для приготовления 6% раствора хлорной кислоты из исходной концентрированной необходимо знать ее концентрацию и относительную плотность.

Например, имеется кислота концентрацией хлорной кислоты 57,8% (в 100 г) и плотностью 1,51. Отсюда нужно взять имеющейся кислоты: $\frac{6 \times 100}{57,8} = 10,4$ г или $\frac{10,4}{1,51} = 6,87$ мл и развести до 100 мл дистиллированной водой.

Глава 5

ПИГМЕНТНЫЙ ОБМЕН

Из всех пигментов человеческого организма наиболее изученным как в химическом плане, так и с точки зрения клинической практики, являются гематогенные пигменты. Они образуются в организме, главным образом, в ходе процессов синтеза и распада гемоглобина (в значительно меньшей степени — при распаде миоглобина, цитохромов и др.).

Гемоглобин. Это соединение из группы хромопротеидов, сложных белков, несущих в своем составе небелковый окрашенный компонент. Гем — комплекс железа с протопорфирином. Биологическая роль гемоглобина заключается в доставке кислорода от легких к тканям, поэтому при всех состояниях, сопровождающихся снижением концентрации гемоглобина в крови или при качественных его изменениях, развивается гипоксия тканей. А значительное снижение гемоглобина может стать причиной смерти больного.

Типы гемоглобина. В крови взрослого здорового человека обнаружены несколько типов гемоглобина, различающихся аминокислотным составом полипептидных цепей. Основным гемоглобином взрослого человека HbA (от латинского слова *adultus* — взрослый). Его белковая часть состоит из двух α -цепей и двух β -цепей. Существует две разновидности нормального гемоглобина A: A₁ (главный) и A₂ (медленный). Основную массу гемоглобина взрослого (96—99%) составляет гемоглобин A₁. Он содержит в глобиновой части α_2, β_2 -цепи. Гемоглобин HbA₂ содержит по две α - и δ - полипептидные цепи. Его количество не превышает 2, 5% общего гемоглобина.

Гемоглобин HbF, фетальный (от латинского слова *foetus* — плод) состоит из двух α - и γ - полипептидных цепей. В крови взрослого человека его содержится в количестве не более 1,5% от всего гемоглобина. Фетальный гемоглобин лучше фиксирует кислород, что имеет значение во внутриутробный период развития. У новорожденного ребенка его содержание достигает 80% от общего гемоглобина. К концу первого года жизни он почти полностью заменяется на HbA.

Кроме того, в крови человека открыто значительное количество мутантных гемоглобинов, образующихся в результате замены какой-либо аминокислоты в молекуле гемоглобина на другую. Некоторые из этих мутаций приводят к тяжелым заболеваниям — гемоглобинопатиям. Примером одной из разновидностей гемоглобинопатий может служить серповидноклеточная гемолитическая анемия. Она обусловлена появлением гемоглобина типа HbS, в котором по сравнению с HbA в β - цепях заменяется всего одна аминокислота — глутаминовая на валин. При низком парциальном давлении кислорода после отдачи кислорода в тканях, HbS превращается в плохо растворимую форму и выпадает в виде веретенообразных кристаллов, которые деформируют эритроциты (серповидная форма) и приводят к массивному гемолизу.

Производные гемоглобина. В соответствии с функциональным назначением гемоглобина в физиологических условиях в организме образуются такие его производные, как: оксигемоглобин, каргемоглобин, и, в следовых количествах — карбоксигемоглобин и метгемоглобин.

Оксигемоглобин (HbO_2) — образуется при обогащении крови кислородом в легких за счет присоединения кислорода к гему гемоглобина при помощи координационных связей железа без изменения валентности железа. Оксигемоглобин очень лабильное соединение и, поступая с кровью к тканям, где давление кислорода значительно ниже, чем в легких, он легко диссоциирует на свободный гемоглобин и кислород. Кислород утилизируется в процессе клеточного дыхания, а гемоглобин вступает в соединение с углекислым газом, образуя карбгемоглобин (HbCO_2). Это также непрочное соединение, которое легко отдает углекислый газ при поступлении крови в легкие. Связь с углекислым газом образует не гем, а глобин за счет свободных аминокрупп аминокислот.

Карбоксигемоглобин. (HbCO) — это соединение гемоглобина с окисью углерода, образуется в результате диссоциации гемоглобина и в норме не превышает 2% от общей массы гемоглобина. Карбоксигемоглобин, в отличие от других производных гемоглобина, является очень прочным соединением. При отравлении угарным газом (CO), когда образуются значительные количества карбоксигемоглобина, гемоглобин теряет способность связывать кислород и наступает смерть от удушья.

Метгемоглобин. (MetHb) — образуется при окислении двухвалентного железа гема в трехвалентное. При этом отмечается переход окраски из красной в коричневатозеленоватую. В норме MetHb образуется за счет процессов аутоокисления и не превышает 2% от общей массы гемоглобина. При патологии количество MetHb в крови возрастает. Развивается состояние метгемоглобинемии, которое может быть следствием генетической патологии, либо носить приобретенный характер. Образующиеся значительные количества метгемоглобина могут вызвать смерть от недостатка кислорода, т.к. MetHb не может связываться с кислородом.

Порфирины. К этой группе соединений человеческого организма относят гематогенные пигменты, образующиеся в процессе синтеза гемоглобина и других гемпротеидов. По химической природе они представляют собой тетрапирольные циклы, в которых отдельные углеродные ато-

мы связаны с различными радикалами. Среди порфиринов человеческого организма различают: уропорфирины, копропорфирины и протопорфирин-IX.

Порфирины, не использованные в процессе синтеза гемоглобина, удаляются из организма в составе мочи и кала. В моче содержатся, главным образом, копропорфирины, уропорфиринов намного меньше. С мочой выделяется также небольшое количество порфобилиногена и дельта-аминолевулиновой кислоты. Кал содержит копропорфирины и протопорфирины.

ЖЕЛЧНЫЕ ПИГМЕНТЫ

Обмен желчных пигментов в норме. К желчным пигментам относят билирубин и продукты его преобразования — уробилин и стеркобилин. А такие промежуточные продукты преобразования билирубина, как уробилиноген и стеркобилиноген к желчным пигментам не относятся — они вообще не окрашены. Название «желчные пигменты» обусловлено тем, что именно билирубин придает характерную темно-бурую окраску желчи, в составе которой он выводится из организма.

Образуются желчные пигменты, главным образом, в процессе распада гемоглобина эритроцитов (70 — 80%), в значительно меньшей степени (20—30%) и других гемсодержащих соединений (миоглобина, дыхательных ферментов клеток).

Средняя продолжительность жизни эритроцита составляет приблизительно 120 дней, после чего он разрушается и из него освобождается гемоглобин, который подвергается дальнейшему распаду. Распад гемоглобина в основном происходит в клетках системы мононуклеарных фагоцитов (СМФ), в частности, в купферовских клетках печени, селезенки, костного мозга. Практически гемоглобин превращается в желчные пигменты везде, где имеет место выход крови из кровяного русла. Например, при кровотечениях из поврежденных кровеносных сосудов в окружающие ткани с образованием гематомы. Если кровоизлияние происходит в кожу, то образуется гематома хорошо различимая визуально, известная под бытовым названием «синяк». Его окраска изменяется в соответствии с отдельными этапами превращения гемоглобина в билирубин и хорошо иллюстрирует этот процесс — вначале появляется красный цвет, затем он превращается в зеленый, желтый и по мере рассасывания — красно-коричневый (билирубин).

Химические преобразования, которые претерпевает гемоглобин, достаточно хорошо изучены. Начальным этапом распада гемоглобина является разрыв одного метинового мостика протопорфиринового кольца и переход атома железа из двухвалентного состояния в трехвалентное. При этом образуется соединение, окрашенное в зеленый цвет, которое называется вердоглобин. В дальнейшем от молекулы вердоглобина отщепляется атом железа и белок глобин. Образуется неокрашенное соединение — *биливердин*. Биливердин восстанавливается, присоединяя атомы водорода по месту свободных двойных связей у атома углерода и азота третьего пирольного кольца и образуется *билирубин*. Это вещество красно-коричневого цвета, нерастворимое в воде, очень токсичное для организма, особенно для нервных клеток.

Любые процессы, связанные с понижением концентрации альбумина в крови, ведут к нарушению доставки билирубина в печень и накоплению его в тканях и в крови. Например, у новорожденных детей с дефицитом альбумина развиваются физиологические желтухи, которые купируются по мере нормализации синтеза альбумина в организме. Возможны и так называемые лекарственные желтухи, когда лекарственные препараты конкурентно взаимодействуют с альбумином и препятствуют образованию его связи с билирубином. Однако, связь билирубина с альбумином не снижает его токсичность, а лишь препятствует проникновению его в ткани. Такая форма билирубина называется свободным билирубином (неконъюгированным, либо непрямой билирубином). Название непрямой билирубин обусловлено типом химической реакции, которой определяют концентрацию билирубина в крови. Эта фракция билирубина не вступает в непосредственное взаимодействие с диазореактивом. Реакция происходит только после обработки свободного билирубина каким-либо агентом, переводящем его в растворимое состояние.

Поступая в печень, свободный билирубин избирательно поглощается гепатоцитами из крови, теряет связь с альбумином и взаимодействует (конъюгирует) с глюконовой кислотой с образованием *билирубинглюкуронидов*. Конъюгацией обеспечивается перевод нерастворимого билирубина в растворимое состояние, что способствует выведению билирубина в составе желчи в кишечник. Лишь незначительная часть билирубинглюкуронида реэскретируется в кровь, где составляет не более 25% от общего количества билирубина. Билирубинглюкуронид называется

ся связанным билирубином (конъюгированным, либо прямым билирубином), т.к. растворимость в воде делает возможным его непосредственное взаимодействие с диазореактивом.

Поступив в кишечник, билирубинглюкурониды, под влиянием микрофлоры кишечника, расщепляются на свободный билирубин и глюкуроновую кислоту. Освободившийся билирубин подвергается дальнейшим превращениям. На одном из этапов превращения образуются мезобилирубин и уробилиноген.

Из тонкой кишки уробилиноген поступает через систему воротной вены в печень, где в норме полностью расщепляется. Этот процесс нарушается при повреждениях печеночной паренхимы и не расщепившийся уробилиноген может поступать в кровь, а оттуда через почки в мочу. Мезобилирубин в толстой кишке превращается в стеркобилиноген. Часть его в дистальном отделе толстой кишки всасывается по системе геморроидальных вен в общий круг кровообращения, током крови приносится к почкам и выводится с мочой наружу. При доступе кислорода воздуха и света стеркобилиноген превращается в стеркобилин — пигмент, обуславливающий нормальный соломенно-желтый цвет мочи.

Как следует из вышесказанного, собственно уробилиноген (уробилин) появляется в моче при повреждении гепатоцитов. Хотя в клинической практике относительно нормальный пигмент в моче традиционно употребляется термином — «уробилин»; это в принципе неверно, но не искажает клинического смысла, вкладываемого в исследование этого пигмента мочи.

В последнее время, привязываясь к существенной традиции и учитывая, что в моче помимо стеркобилиногена могут также присутствовать в следовых количествах уробилиногены, в отдельных руководствах рекомендуется суммарное количество их в моче обозначать как уробилиногеновые тела. При стоянии мочи они переходят в уробилиновые тела, а вместе с тем, и другие рекомендуется называть уробилиноиды.

Основная же масса стеркобилиногена удаляется из организма в составе кала. Окисляясь, стеркобилиноген превращается в стеркобилин — красящий пигмент кала. Это главный путь выведения желчных пигментов из организма.

В норме в сыворотке крови на долю различных фракций билирубина приходится следующие соотношения: непрямой (свободный, неконъюгированный) билирубин

— 75%; прямой (связанный, конъюгированный) билирубин — 25%.

В норме моча содержит следовые количества уробилиноидов. Билирубин в моче в норме нашими методами не обнаруживается. При патологии в моче появляется прямой билирубин. Непрямой билирубин в моче не выявляется, так как связь с альбумином препятствует его фильтрации через почечные мембраны (за исключением недоношенных). Стеркобилин в кале в норме всегда присутствует.

ПАТОЛОГИЯ ОБМЕНА БИЛИРУБИНА

Патология визуально проявляется наличием желтухи у больного. Желтуха обусловлена накоплением в крови и тканях больного билирубина.

Существует несколько классификаций желтух. В общепринятом плане принято различать основные 4 типа: паренхиматозные, механические, гемолитические, ферментативные.

1. Паренхиматозные (печеночные) желтухи. Являются следствием воспаления печеночной ткани — гепатита. Возникают в результате диффузного поражения паренхимы печени различными агентами. Чаще всего это инфицирование вирусом, например при вирусных гепатитах. Среди этиологических факторов следует иметь в виду также бактериальные поражения печени, паразитарное обсеменение органа (эхинококк, лямблии). Гепатит может развиваться как последствие травматического повреждения печени с массивным разрушением паренхимы. Отравления химическими веществами, длительное применение сильнодействующих лекарственных препаратов также приводит к гепатитам.

В патогенезе паренхиматозных желтух ведущим моментом является нарушение обменных и трофических процессов в пораженных гепатоцитах, что приводит к отеку клеток и нарушению нормальной проницаемости их мембран. Увеличиваясь в размере, воспаленные гепатоциты пережимают желчные ходы, вызывая застой желчи — так называемый первичный холестаза. В результате холестаза задерживается выведение и желчных пигментов, накапливаясь, они подвергаются обратному всасыванию в кровь. В крови увеличивается концентрация билирубина, но преимущественно за счет связанной, прямой его фракции. В результате холестаза блокируется выведение связанного билирубина из организма. В крови увеличивается уровень и

свободного, непрямого билирубина. Параллельно, резко возрастает билирубин в моче. Моча приобретает темную окраску и, что характерно, пена, образующаяся при встряхивании мочи, также окрашена в желто-коричневый цвет. Уробилиноиды в моче на высоте желтушного периода определяются на низких цифрах, только за счет уробилиногена, который расщепляется в печени, или не определяется вообще. А по мере выздоровления уробилиноиды увеличиваются и определяются в количествах, даже превышающих норму, увеличивается в их составе главный компонент — стеркобилин.

Стеркобилин в кале на высоте желтухи отсутствует — кал обесцвечен. При спаде желтухи приходит к нормальным цифрам. Это благоприятный признак — повышение уробилиноидов в моче и нормализация стеркобилина в кале.

II. Механические (обтурационные) желтухи. Этиологическим фактором в данном типе желтух являются какие-либо препятствия оттоку желчи, локализующиеся вне самой печени. Обычно они возникают на уровне желчного пузыря или крупных желчевыводящих протоков. Такими препятствиями могут служить: камни желчного пузыря и желчевыводящих путей, либо опухоли близлежащих к печени органов, которые по мере увеличения в размерах пережимают желчевыводящие протоки.

В моче, пропорционально степени обтурации, возрастает билирубин. Уробилиноиды — на низких цифрах, а при полной обтурации отсутствуют. Стеркобилин также при полной обтурации отсутствует, кал ахоличен.

III. Гемолитические желтухи. Развиваются в результате усиленного распада эритроцитов с освобождением из них значительных количеств гемоглобина. В зависимости от причины возникновения гемолитические желтухи подразделяются на врожденные и приобретенные. К врожденным можно отнести гемолитическую болезнь новорожденных, как следствие резус-конфликтов, либо активации аутоиммунных процессов к эритроцитам новорожденных. К приобретенным относят случаи, связанные с внутри- и внеклеточным гемолизом (аутоиммунные гемолитические анемии, эритробластоз новорожденных и др.), различные заболевания, протекающие с усиленным гемолизом (инфекции, интоксикации, ожоги, посттрансфузионные осложнения), массивные кровоизлияния (гематомы, инфаркты), при поступлении в организм гемометических ядов (змеиные токсины, уксусная кислота и др.).

В крови отмечается гипербилирубинемия, но в отличие от первых двух желтух, гипербилирубинемия обусловлена преимущественно свободным, непрямой билирубином. В моче билирубин не определяется, так как прямой билирубин обычно в пределах невысоких цифр, а непрямой билирубин, связанный с альбумином, через почечные мембраны не фильтруется. Уробилиноиды в моче в норме или повышены.

Стеркобилин в кале резко повышен.

IV. Ферментативные желтухи. Причиной возникновения является снижение активности или полное отсутствие фермента УДФ-глюкуронилтрансферазы, обеспечивающей в норме конъюгацию билирубина с глюкуроновой кислотой. Ферментативные желтухи бывают врожденные и приобретенные. Врожденные проявляются с первых же дней постнатального развития ребенка. Приобретенные — возникают у людей любого возраста под влиянием каких-либо факторов, ингибирующих УДФ-глюкуронилтрансферазу. В крови больных ферментативными желтухами отмечается гипербилирубинемия за счет свободного, непрямого билирубина. В моче билирубин отсутствует. Уробилиноиды отсутствуют.

В кале стеркобилин отсутствует, кал ахоличен.

Типы желтух	Кровь		Моча		Кал
	Прямой билирубин	Непрямой билирубин	Билирубин	Уробилирубин	Стеркобилин
Паренхиматозная	+++	+	+++	(-)(+)	(-)(N)
Механическая	+++	+	+++	(-)	(-)
Гемолитическая	N	+++	(-)	(N)(+)	+++
Ферментативная	(-)	+++	(-)	(-)	(-)

Примечание: + — повышенное содержание исследуемого вещества
N - норма
(-) — отсутствует

ЛАБОРАТОРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ЖЕЛТУХ

Приведенные выше изменения показателей пигментного обмена характеризуют патологию лишь одной из многих функций печени, повреждаемых при желтухах, а именно — ее экскреторную функцию. Следует иметь в виду, что нарушение этой одной функции лишь является сигналом заболевания желтухой, но не отражает всей глубины патологических процессов, происходящих в печени. Соответственно, недостаточным будет исследование только пигментно-

го обмена для характеристики патологии печени и, тем более, если речь идет о необходимости дифференциальной диагностики желтух. Так, например, нельзя разграничить между собой паренхиматозные и механические желтухи только по результатам исследования билирубина. В обоих случаях гипербилирубинемия обусловлена преимущественно связанным, прямым билирубином. Метаболиты билирубина в моче и кале здесь также изменяются однозначно.

Для дифференциальной диагностики различных типов желтух должны быть приведены лабораторные характеристики нескольких важнейших функций печени. Помимо экскреторной, это такие функции печени как синтез белков и липопротеидов плазмы крови, синтез липидов, депонирования железа и витаминов. Особое значение в качестве маркеров состояния печеночной ткани имеют исследования активности ряда ферментов.

Из всего многообразия печеночных проб можно рекомендовать комплекс тестов, отработанный и хорошо зарекомендовавший себя в практической работе. Он состоит из 9 тестов и, кроме билирубина и его фракций, включает такие доступные в клинических лабораториях исследования, как: тимоловая проба, общий белок, белковые фракции, холестерин, поверхностный антиген гепатита В (HBsAg), ферментные тесты — трансаминазы (АСТ, АЛТ), щелочную фосфатазу (ЩФ), гамма-глутамилтранспептидазу (γ -ГТП). Трансаминазы — цитозольные ферменты, их активность увеличивается при воспалении гепатоцитов, характерном для паренхиматозных желтух. ЩФ и γ -ГТП — канальцевые ферменты локализуются в мембранах гепатоцитов и служат маркерами вторичного холестаза, их активность значительно возрастает при механических желтухах.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПИГМЕНТНОГО ОБМЕНА

Наиболее важными показателями, характеризующими состояние пигментного обмена, являются концентрация билирубина и его фракций в сыворотке крови, содержание билирубина и уробилиногена в моче.

5.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ БИЛИРУБИНА И ЕГО ФРАКЦИЙ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИМ ДИАЗОМЕТОДОМ (ЙЕНДРАШЕК, КЛЕГГОРН, ГРОФ)

Принцип. При взаимодействии сульфаниловой кислоты с азотисто-кислым натрием образуется диазофенилсульфоновая кислота, которая, реагируя со связанным били-

рубином сыворотки крови, дает розово-фиолетовое окрашивание. По интенсивности его судят о концентрации билирубина, вступающего в прямую реакцию. При добавлении к сыворотке крови кофеинового реактива несвязанный билирубин переходит в растворимое диссоциированное состояние, благодаря чему он также дает розово-фиолетовое окрашивание со смесью диазореактивов. По интенсивности последнего фотоколориметрически определяют концентрацию общего билирубина. По разнице между общим и связанным билирубином находят содержание несвязанного билирубина, дающего непрямую реакцию.

Реактивы. 1. Кофеиновый реактив. 5 г чистого кофеина, 7,5 г бензойно-кислого натрия (C_6H_5COONa), 12,5 г кристаллического уксусно-кислого натрия (CH_3COONa) растворяют в 90 мл дистиллированной воды, нагревают до 50—60°C и хорошо перемешивают. После охлаждения доводят дистиллированной водой до 100 мл (некоторые авторы рекомендуют доводить объем до 200 мл или до 1 л). Раствор годен в течение 2 недель.

2. Физиологический раствор (0,9% раствор NaCl).

3. Диазосмесь: а) диазореактив I. 5 г сульфаниловой кислоты растворяют при нагревании в 300 — 400 мл дистиллированной воды, прибавляют 15 мл концентрированной соляной кислоты (уд.вес 1,19). Если сульфаниловая кислота полностью не растворяется, колбу помещают в теплую воду и помешивают. Только после полного растворения сульфаниловой кислоты и охлаждения раствора объем колбы доводят дистиллированной водой до 1 л. Реактив стойкий, хранится в посуде из темного стекла;

б) диазореактив II. 0,5% раствор азотистокислого натрия ($NaNO_2$). Раствор нестойкий, хранится в склянке темного стекла около 2—3 недель. Первым признаком его непригодности служит появление желтого оттенка.

Перед работой смешивают 10 мл диазореактива I и 0,3 мл диазореактива II.

Ход определения. В 3 пробирки (для определения общего, связанного билирубина и контроля на цвет сыворотки) вводят реактивы по схеме:

Реактивы, мл	Общий билирубин	Связан. билирубин	Контроль
Сыворотка	0,5	0,5	0,5
Кофеиновый реактив	1,75	—	1,75
Физиологический раствор	—	1,75	0,25
Диазосмесь	0,25	0,25	—

При определении общего билирубина, пробу для развития окраски оставляют стоять 20 минут. При дальнейшем стоянии окраска не изменяется.

Для определения связанного билирубина, колориметрирование следует проводить спустя 5—10 минут после добавления диазосмеси, так как при длительном стоянии в реакцию вступает свободный билирубин.

Контроль на мутность сыворотки ставят для каждого опыта.

Колориметрируют на ФЭКе при зеленом светофильтре (длина волны 500 — 560 нм) в кювете шириной 5 мм.

Расчет производят по калибровочному графику. Находят содержание общего и связанного билирубина в мг%. Для определения уровня несвязанного (свободного) билирубина из общего его содержания вычитают показатель связанного билирубина в сыворотке крови.

Нормальные величины.

Общий билирубин	Недоношенные	Доношенные	Недоношенные	Доношенные
	мг/100 мл		мкмоль/л	
Кровь из пуповины:	<2,0	<2,0	<34,2	<34,2
0—1 день	<8,0	<6,0	<136,8	<12,6
1—2 дня	<12,0	<8,0	<205,2	<136,8
3—5 дней	<16,0	<12,0	<273,6	<205,2
Впоследствии	<2,0	0,2—1,0	<34,2	3,4—17,1
Билирубин связанный (прямая реакция)	0,00	0,2	0,00	3,4

Коэффициент перевода мг/100 мл в мкмоль/л 17,1, обратно — 0,0584.

Примечания. Некоторые авторы рекомендуют щелочной вариант, унифицированный ВОЗ — после развития окраски (перед этапом колориметрирования) добавлять в пробы по 3 капли 30% NaOH; цвет раствора при этом изменяется на зеленый, часто наблюдается исчезновение мутности. Пробы с полученной окраской следует колориметрировать при красном светофильтре.

В случае большой концентрации билирубина сыворотку следует развести физиологическим раствором в 2 раза.

Диагностическая значимость. Повышение при повреждении печеночных клеток (воспалительного, токсического и неопластического происхождения), закупорке желчных протоков, гемолитических заболеваниях, физиологи-

ческой желтухе новорожденных, болезни Жильбера, нарушении толерантности к глюкозе.

5.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИЛИРУБИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ (МИКРОМЕТОД)

При выявлении гипербилирубинемий у новорожденных можно применять микрометод в модификации Т.Б. Доброседовой и А.С.Циркиной.

Количество сыворотки, необходимое для определения общего, связанного и свободного билирубина, составляет 0,4 мл. Сыворотку разводят равным объемом физиологического раствора.

Колориметрию и расчет производят также, как это рекомендуется в унифицированном методе определения; поскольку сыворотки взято в опыт 0,125 мл, полученный результат умножают на 4 (с учетом разведения).

Примечание. Реактивы готовят так же, как и в унифицированном методе Йендрашек, Клеггорн, Гроф.

Дальнейшее определение проводят по схеме:

Реактивы, мл	Общий билирубин	Связан. билирубин	Контроль
Сыворотка разведенная физ.раствором 1:1	0,25	0,25	0,25
Кофеиновый реактив	2,00	—	2,00
Физ.раствор	—	2,00	0,25
Диазосмесь	0,25	0,25	—

Построение калибровочной кривой для определения билирубина сыворотки крови (м-д Шеллонг и Венде, 1960)

Реактивы для построения калибровочной кривой. 1. 15 мл свежей негемолизированной сыворотки практически здорового человека (или смесь сывороток здоровых доноров).

2. Основной стандартный раствор билирубина.

В колбе емкостью 50 мл растворяют 40 мг билирубина в 30—35 мл 0,1 М раствора углекислого натрия (10,6 г безводного Na_2CO_3 доводят до 1 л дистиллированной водой). Хорошо взбалтывают, не допуская образования пузырьков. Доводят до метки 0,1 М раствором Na_2CO_3 и перемешивают. Полученный раствор (80 мг%) стоек в течение 10 мин от начала приготовления. В дальнейшем происходит окисление билирубина.

3. Рабочий раствор билирубина.

К 7 мл свежей негемолизированной сыворотки добавляют 1 мл свежеприготовленного 80 мг% (1368 мкмоль/л) раствора билирубина и 0,05 мл (1 каплю) 4 н раствора уксусной кислоты (22,6 мл ледяной уксусной кислоты доводят до 100 мл дистиллированной водой). Хорошо перемешивают. При этом выделяются пузырьки углекислого газа. Рабочий раствор стоек в холодильнике не более суток. Этот раствор содержит точно на 10 мг% билирубина больше, чем его находится в сыворотке крови, взятой для приготовления раствора. Чтобы исключить при расчетах количество билирубина, содержащегося в этой сыворотке, при стандартизации пользуются соответствующей компенсационной жидкостью.

Компенсационная жидкость. Для ее приготовления смешивают 7 мл той же сыворотки, которую используют для приготовления рабочего раствора стандарта билирубина, 1 мл 0,1 М раствора Na_2CO_3 и 0,05 мл (1 каплю) 4 н раствора уксусной кислоты.

Для построения калибровочной кривой обычно используют 5—6 разведений с различным содержанием билирубина (табл. 5.1).

Таблица 5.1

Данные для построения калибровочной кривой по методу Шеллонг и Вейде.

№ пробирок	Рабочий раствор билирубина, мл	Физиологический раствор, мл	Количество билирубина (мг) в пробе (0,5 мл)	Концентрация билирубина, мг% (мкмоль/л)
1	0,05	0,45	0,005	1.(17,1)
2	0,10	0,40	0,010	2.(34,2)
3	0,15	0,35	0,015	3.(51,3)
4	0,20	0,30	0,020	4.(68,4)
5	0,25	0,25	0,025	5.(85,5)

Стандартные пробы (0,5 мл) обрабатывают параллельно, по вышеописанному унифицированному методу, причем пробы одинаковой концентрации исследуются 4—5 раз; из данных всех определений выводят среднее значение экстинкции для рабочего раствора билирубина какой-либо одной концентрации.

При построении калибровочного графика к каждой пробе добавляют по 1,75 мл кофеинового реактива, так как в качестве стандарта используют свободный били-

рубин. Контролем служит компенсационная жидкость, из которой готовят разведения аналогично стандартным пробам, т.е. берут 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25 мл ее и доводят физиологическим раствором объем до 0,5 мл. Далее их обрабатывают, как опытные (или стандартные) пробы.

Калибровочную кривую строят, откладывая на оси ординат разность оптических плотностей опытных и контрольных проб, а на оси абсцисс — соответствующие концентрации билирубина (ммоль/л).

2. Построение калибровочного графика удобно производить с помощью наборов «Билирубин-эталон», выпускаемых фирмой «Лахема». Набор содержит лиофилизированный билирубин, альбумин и инструкцию по построению графика.

5.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИЛИРУБИНА В МОЧЕ

В норме моча содержит незначительное количество билирубина, которое не улавливается обычными качественными пробами. В моче присутствует только прямой билирубин, так как непрямой не проходит через здоровый почечный фильтр. Исключение составляют новорожденные, у которых в моче определяется и непрямой билирубин.

В клинической практике получили распространение качественные пробы на билирубин, в основе которых лежит реакция окисления его в биливердин, имеющий изумрудно-зеленую окраску.

Проба Розина. Наиболее доступна и проста. К 2—3 мл мочи добавляют путем осторожного наслаивания 0,5—1 мл спиртового раствора 1% йода или люголевского раствора (1 г йода и 1 г калия йодистого на 50 мл дистиллированной воды). При наличии билирубина на границе между обеими жидкостями образуется зеленое кольцо. Проба также положительна при наличии крови в моче и после приема антипирина.

Проба Гмелина. В качестве окислителя используют концентрированную азотную кислоту. На 1 мл мочи наслаивают 1 мл кислоты. Образующееся на границе с жидкостями изумрудно-зеленоватое кольцо указывает на положительную реакцию.

Проба Уотсона — Хавкинсона. Является наиболее чувствительной для определения билирубина в моче. Ленту фильтровальной бумаги, предварительно пропитанную концентрированным раствором хлористого бария и под-

сушенную, погружают в мочу на 1/4 — 1 минуту, вновь высушивают и капают на нее не более 1 — 2 капель реактива Фуше (25 г трихлоруксусной кислоты + 10 мл 10% хлорного железа + 100 мл дистиллированной воды). При положительной пробе появляется зеленая окраска.

Клиническое значение. Билирубинурия встречается, главным образом, при паренхиматозной и механической желтухах. При гемолитической желтухе билирубинурии не наблюдается. Это позволяет использовать ее как дифференциально-диагностический признак. Однако, билирубинурия появляется только в случае тяжелого поражения печени, а в начальных стадиях не встречается. При физиологических желтухах новорожденных реакция на билирубин в моче становится положительной с хлороформной или эфирной вытяжкой мочи, так как билирубин в моче этих детей находится в нерастворимом состоянии (непрямой билирубин).

Уробилиногеновые тела — являются производными билирубина. В настоящее время различают четыре уробилиногенные фракции: уробилиноген, стеркобилиноген, α-уробилиноген и третий уробилиноген.

Определение в моче уробилиногена (уробилина). Бесцветный уробилиноген в выделенной моче под действием света превращается в желтый уробилин.

Проба Нейбауэра. В основе ее лежит цветная реакция конденсации уробилиногенных тел при взаимодействии с реактивом Эрлиха (2 г парадиметиламинобензальдегида + 98 мл 20% соляной кислоты). К 2 — 3 мл мочи добавляют 2—3 капли реактива Эрлиха. Окрашивание жидкости в красный цвет не позднее, чем в течение 30 секунд указывает на положительную реакцию, т.е. повышенное содержание уробилиногенных тел. Присутствие билирубина в моче может маскировать реакцию, поэтому его устраняют прибавлением 1 мл 10% раствора хлористого кальция или хлористого бария и нескольких капель аммиака до ясно щелочной реакции. Смесь отфильтровывают и ставят реакцию с фильтратом. Оценке реакции мешает присутствие в моче индола, скатола, индикана и некоторых лекарственных веществ: сульфаниламидов, парааминосалициловой кислоты. При приеме пищи, богатой хлорофиллом, в моче появляется филоэритриноген, дающий также положительную реакцию.

Проба Шлезингера на уробилин. К 2 — 3 мл мочи, уже стоявшей несколько часов, прибавляют равный объем 10% спиртового раствора уксусно-кислого цинка в 96% спирте

и фильтруют. Образовавшиеся цинкуробилиновые комплексы остаются в фильтрате и обуславливают зеленую флюоресценцию раствора, видимую на темном фоне. Наиболее отчетливо она обнаруживается при наблюдении в ультрафиолетовом свете.

Клиническое значение. В норме с мочой выделяется незначительное количество уробилиногена (0 — 2 мг за сутки у детей и 0,6 мг — у взрослых), обнаруживаемое специальными пробами. Моча новорожденных уробилиногена не содержит в связи с недостатком в кишечнике восстанавливающих бактерий.

Уробилиногенурия является постоянным симптомом при циррозе печени. При острой желтой атрофии печени уробилиногенурия появляется в начале заболевания, затем по мере развития его уменьшается и, наконец, исчезает, что связано с постепенной потерей билирубиновыделительной функции печенью. Появление уробилиногенурии при острой желтой атрофии печени свидетельствует об улучшении печеночной функции.

Характерные изменения в выделении уробилиногена в течение вирусного гепатита хорошо отражают динамику заболевания. Проба положительна еще в преджелтушный период. Наивысшей степени выраженности уробилиногенурия достигает в первые дни после появления желтухи, затем постепенно убывает и исчезает в самый разгар заболевания, что объясняется внутрипеченочным застоем желчи, и становится положительной вновь при выздоровлении. Продолжительная уробилиногенурия является плохим признаком. При обтурационной желтухе пробы на уробилиноген положительны лишь в далеко зашедших стадиях, когда имеются значительные повреждения паренхимы печени. Физиологическая желтуха новорожденных протекает без уробилиногенурии. У детей положительная реакция на уробилиноген нередко наблюдается при кишечных заболеваниях (энтероколиты, кишечная непроходимость, продолжительные запоры), что связано с повышенной реабсорбцией стеркобилиногена слизистой оболочкой кишечника. В таких случаях следует дифференцировать уробилиноген и уробилин от стеркобилиногена и стеркобилина с помощью мезобиливиолоиновой пробы.

Мезобиливиолоиновая проба. Основана на способности хлорного железа (FeCl_3) окислять уробилиноген и уробилин до мезобиливиолина, дающего фиолетовую окраску. Стеркобилин и стеркобилиноген, не подвергающиеся де-

гидрогенизации, образуют с хлорным железом железистые комплексы черно-коричневого цвета.

Методика. 10 мл подкисленной ледяной уксусной кислотой мочи экстрагируют 3 мл хлороформа. Вытяжку фильтруют и испаряют на водяной бане досуха. Сухой остаток растворяют в небольшом количестве спирта и с половинным количеством экстракта проводят пробу Шлезингера. При положительной реакции к оставшейся части экстракта добавляют 2 — 4 капли дымящей 25% соляной кислоты, к которой предварительно прибавлено небольшое количество $FeCl_3$ (до появления желтой окраски). Смесь нагревают. Появление красно-фиолетовой окраски указывает на наличие уробилиногена или уробилина, коричневой — на наличие стеркобилина или стеркобилиногена.

Клиническое значение. Мезобиливиолиновая проба может быть использована для дифференциальной диагностики печеночных и кишечных заболеваний, а также при гемолитических желтухах. Проба остается положительной до тех пор, пока происходит гемолиз.

5.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕМОГЛОБИНА В КРОВИ

Существует несколько методов определения гемоглобина: колориметрические методы; газометрические методы (гемоглобин насыщают кислородом, углекислым газом и по количеству поглощенного газа судят о количестве гемоглобина); методы, основанные на определении железа в гемоглобиновой молекуле.

Газометрический метод и метод, основанный на определении железа в гемоглобиновой молекуле, точны, но трудоемки, технически сложны. В клинической практике применяются, в основном, колориметрические методы.

Широко распространенный ранее метод определения гемоглобина по Сали прост, но очень не точен (ошибка составляет от 7 до 20%). В настоящее время он не используется. Международный комитет по стандартизации в гематологии рекомендует цианметгемоглобиновый метод.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕМОГЛОБИНА ЦИАНМЕТГЕМОГЛОБИНОВЫМ МЕТОДОМ

Принцип. Гемоглобин при взаимодействии с железосинеродистым калием (красная кровяная соль) окисляется в метгемоглобин (гемиглобин), образующий с ацетонциангидрином окрашенный гемиглобинцианид, интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию гемоглобина.

Реактивы. 1. Трансформирующий раствор: ацетон-циангидрин — 0,5 мл, калий железосинеродистый — 200 мг, натрий двууглекислый (бикарбонат натрия) — 1 г, дистиллированная вода — до 1 л.

2. Калибровочный раствор гемиглобинцианида. В качестве калибровочного раствора могут применяться стандартные растворы гемиглобинцианида производства фирмы «Имуна», «Ренал». Концентрация стандартного раствора гемиглобинцианида фирмы «Ренал» составляет 59,75 мг/%, «Имуна» — 61,23 мг%. Стандартные растворы хранят в холодильнике при температуре +4°C в защищенном от света месте. Применяют в неразбавленном виде.

Исследуемый материал. Цельная кровь. (ЭДТА). Проба стабильна 48 часов при 4°C, 24 часа — при 23°C.

Ход определения.

Опытная проба: 0,02 мл крови приливают к 5 мл трансформирующего раствора (разведение в 251 раз), хорошо перемешивают, оставляют стоять на 10 минут, после чего измеряют на гемоглобинометре или спектрофотометре при длине волны 500—560 нм в кювете толщиной слоя 1 см против холостой пробы.

Холостая проба: трансформирующий раствор или вода.

Расчет. Производят по калибровочному графику, построенному по стандартному раствору гемиглобинцианида, или по формуле:

$$Hb = \frac{E_{оп} \cdot C \cdot K \cdot 0,01}{E_{ст}}, \text{ где:}$$

$E_{оп}$ — экстинция опытной пробы; $E_{ст}$ — экстинция стандартной пробы; C — концентрация гемиглобинцианида в стандартном растворе в мг%; K — коэффициент для пересчета мг% в г/л.

Построение калибровочного графика. Из стандартного раствора готовят разведения, как указано в табл.5.2.

Таблица 5.2

Данные к построению калибровочного графика

Стандартный раствор в мл	Трансформирующий раствор в мл	Концентрация гемоглобина крови, г%
—	6	Холостая проба
2	4	5
4	2	10
6	—	15

Измеряют против холостой пробы.

Нормальные величины:

Возраст	г %	ммоль/л
Кровь из пуповины	13,5—20,0	2,09—3,10
1—3 дня	14,5—22,5	2,25—3,49
1 неделя	13,5—21,5	2,09—3,33
2 недели	12,5—20,5	1,94—3,18
1 месяц	10,0—18,0	1,55—2,79
2 месяца	9,0—14,0	1,40—2,17
3—6 месяцев	9,5—13,5	1,47—2,09
2—6 лет	11,5—13,5	1,78—2,40
6—12 лет	11,5—15,5	1,78—2,40
12—18 лет (м)	13,0—16,0	1,86—2,48
(ж)	13,5—17,5	2,09—2,71
18— и далее (м)	13,5—17,5	2,09—2,71
(ж)	12,0—16,0	1,86—2,48

Влияющие факторы. Повышение отмечено при гипертриглицеридемии, при числе лейкоцитов $>25 \cdot 10^9/\text{л}$, ложное повышение при наличии HbС или HbS, прогрессирующих заболеваний печени. У курильщиков, вследствие образования функционально неактивного HbCO показатели могут быть повышенными.

Диагностическая значимость. Содержание гемоглобина повышается при полицитемии, чрезмерных физических нагрузках, на больших высотах. Понижается при анемиях.

Примечания. 1. Концентрация Hb несколько ниже между 17 и 7 часами утра и после приема пищи. 2. Ложноположительные результаты могут отмечаться при гипогидратации, при ожогах, сильной рвоте, кишечной непроходимости или при длительном стазе при всенепункции.

Глава 6

СИСТЕМА СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

Система свертывания крови, или иначе система гемостаза, выполняет в организме жизненно важную функцию — поддерживает кровь в жидком состоянии внутри кровеносных сосудов и, вместе с тем, предупреждает и купирует кровотечение из поврежденных кровеносных

сосудов, является сложным ферментативным процессом, в котором принимает участие множество факторов, находящихся в плазме, тканях, кровяных элементах, главным образом, в тромбоцитах. Функциональными компонентами системы гемостаза являются: сосудистая стенка, тромбоциты, другие клетки крови и определенные белки плазмы крови, ответственные как за свертывающий, так и за противосвертывающий процессы. Эта система находится в тесной взаимосвязи с другими физиологическими системами организма. Регулируется центральной и периферической нервной системой, эндокринной системой, а также подвержена влиянию простагландинов, кининов и биогенных аминов (серотонин, гистамин и др.). Конечным продуктом реакции является фибрин, который служит основой тромба.

В зависимости от механизма остановки кровотечения принято различать два типа гемостаза: первичный — в котором принимают участие стенки сосудов, тромбоциты и отчасти эритроциты, и вторичный — когда в процесс включаются плазменные факторы коагуляции.

Первичный, микроциркуляторный или сосудисто-тромбоцитарный гемостаз, обеспечивает остановку кровотечения из капилляров, мелких вен и артерий. Как следует из названия, в его реализации участвуют, главным образом, сосудистая стенка и тромбоциты. При травме кровеносного сосуда рефлекторно возникает его спазм в месте повреждения. В первые минуты это прекращает или, по крайней мере, значительно снижает кровопотерю. Сразу же вслед за сосудистым спазмом, происходит адгезия (прилипание) тромбоцитов к краям поврежденного сосуда и их агрегация (склеивание между собой). Освобождающиеся при этом из тромбоцитов АДФ (аденозиндифосфат), серотонин и адреналин усиливают сосудистый спазм и агрегацию тромбоцитов, а выделяющийся из поврежденных тканей и эндотелия сосудов тканевой тромбопластин взаимодействует с белковыми факторами плазмы (VII, IV, X, V, II) и образует некоторое количество тромбина. В результате агрегация тромбоцитов становится необратимой и формируется первичный, так называемый, белый тромбоцитарный тромб. На этом кровотечение из мелких кровеносных сосудов купируется.

При лабораторном обследовании больных, для характеристики реакций первичного гемостаза, используются тесты, отражающие, во-первых, состояние сосудистой

стенки — это время кровотока по Дуге, либо Айви. Во-вторых, исследуются тромбоциты — производится подсчет количества тромбоцитов в периферической крови и выполняются анализы их функциональной активности — пробы на адгезию и агрегацию тромбоцитов.

При кровотечениях из более крупных сосудов тромбоцитарного тромба недостаточно для остановки кровотечения. Под мощным давлением крови такой тромб выталкивается и поэтому автоматически подключается коагуляционный гемостаз.

Вторичный, макроциркуляторный, или коагуляционный гемостаз. Обеспечивается собственно свертывающей системой крови, которая в норме состоит из двух взаимно уравновешенных звеньев — прокоагулянтного (свертывающего) и антикоагулянтного (противосвертывающего). Прокоагулянтная система базируется на 15 белковых плазменных факторах свертывания крови, 11 факторах тромбоцитов и факторах свертывания из других клеток крови и тканей. Главной функцией прокоагулянтного звена является образование фибринового сгустка.

Плазменные факторы сокращенно обозначаются римскими цифрами, а в полном их названии заложены либо выполняемая функция, либо фамилии больных, у которых впервые был выявлен дефицит соответствующего фактора (табл. 6.1).

Факторы пронумерованы в порядке их открытия. Плазменные факторы постоянно циркулируют в кровяном русле, но находятся они в неактивной форме. Переходят в активное состояние только при необходимости, когда включается механизм гемостаза.

Тромбоцитарные факторы обозначаются арабскими цифрами. Из тромбоцитарных факторов наиболее важным для процесса свертывания крови является фактор III — тромбоцитарный тромбопластин, содержащий фосфолипид. Он, наряду с плазменными факторами, участвует в образовании тромбина из протромбина.

Из свертывающих факторов других клеток крови следует назвать лизосомальные белки лейкоцитов, способные вызывать преципитацию фибриногена и оказывать влияние на полимеризацию фибрина. Они же обладают определенной антикоагулянтной и фибринолитической активностью. Эритроциты также участвуют в гемостазе, выделяя при нарушении целостности своих мембран эритроцитин — вещество, аналогичное 3 фактору тромбоцитов.

Таблица 6.1

Международная номенклатура плазменных факторов свертывания крови

Сокращенное обозначение	Полное название
I	Фибриноген — белок с высокой молекулярной массой, синтезируется в печени. Под влиянием тромбина превращается в фибрин.
II	Протромбин — гликопротеин, синтезируется в печени. Под влиянием протромбиназы превращается в активную форму — тромбин.
III	Тканевый тромбопластин — липопротеин с высокой молекулярной массой, обладает свойствами микромембран. Образует комплекс, участвующий во внешнем пути формирования протромбиназы.
IV	Ионы кальция — активируют ряд факторов и входят в состав комплексов.
V	Проакселерин (лабильный) — синтезируется в печени. Входит в состав комплекса, формирующего протромбиназу, осуществляющую превращение протромбина в тромбин.
VII	Проконвертин (стабильный) — синтезируется в печени.
VIII	Антигемофильный глобулин А — протеин, синтезируемый в печени. Состоит из нескольких компонентов, участвует в формировании протромбиназы по внутреннему пути.
IX	Кристалл-фактор, плазменный тромбопластиновый компонент, антигемофильный фактор В.
X	Фактор Стоарта-Прауэр — гликопротеин, синтезируется в печени в присутствии витамина К. Участвует в образовании тромбиназы.
XI	Фактор Розенталя, плазменный предшественник тромбопластина, антигемофильный фактор С.
XII	Фактор Хагемана, фактор контакта. Активируется при контакте с поврежденной поверхностью сосуда, подвержен также и ферментативной активации.
XIII	Фибриназа, фибринстабилизирующий фактор.
Дополнительные факторы	Фактор Виллебранта, фактор Флетчера, фактор Фитцджеральда.

Тканевым фактором гемостаза является тканевый тромбопластин, образующийся при разрушении тканей и за-

пускающий процесс свертывания крови по внешнему механизму.

Суть процесса свертывания крови в общих чертах можно представить следующим образом: под влиянием какого-либо иницилирующего агента образуется активный кровяной тромбопластин, который переводит протромбин в активную форму — тромбин. Тот, в свою очередь, воздействует на фибриноген, превращая его в нерастворимый фибрин, который выпадает из кровяного русла в виде тромба.

Если развернуть приведенную выше схему, то необходимо отметить, что весь процесс свертывания крови условно делят на 4 фазы: первая — протромбинообразование; вторая — тромбинообразование; третья — фибринообразование; четвертая — посткоагуляционная.

Первая фаза — протромбинообразование, наиболее длительная в процессе свертывания крови. Она занимает 4—6 минут. Реакции, характерные для той фазы, могут развиваться как по внутреннему, так и по внешнему механизму. В первом случае процесс начинается с активации XII фактора каким-либо пусковым агентом (поврежденная сосудистая стенка, иммунные комплексы, хиломикроны и др.), затем происходит цепная реакция, в которой участвуют каликреин, кинин и ряд факторов, формирующих комплексы 1 и 2 с активацией X фактора. При этом образуется комплекс 3 из факторов Ха, V, IV, способный энзиматически превратить протромбин в тромбин. Поэтому данный комплекс, которому приписывается ферментная активность, по аналогии с ферментами назван протромбиназой. Внешний механизм образования активной протромбиназы начинается с появления в кровяном русле III фактора (тканевой тромбопластин), который поступает из поврежденных тканей, а в нормальных условиях в плазме крови отсутствует. Комплекс факторов III, VIIa, IV также способен активировать X фактор, формируя протромбиназный комплекс (3). Каждый из приведенных механизмов образования протромбиназы происходит параллельно. С образованием протромбиназы завершается первая фаза свертывания крови.

Следующие фазы гемостаза протекают, не раздваиваясь, в одном варианте.

Во второй фазе происходит образование тромбина (IIIa) из его неактивного предшественника — протромбина (II) под влиянием протромбиназы. Фаза быстротечная. На нее уходит 2—5 секунд.

В ходе третьей фазы тромбин отцепляет от фибриногена пептиды А и В, переводя его в фибрин-мономер. Последний, полимеризуясь, выпадает из плазмы в виде бесцветных переплетающихся нитей фибрина, которые как сеть увлекают с собой форменные элементы крови. Поэтому фибриновый сгусток всегда окрашен в красный цвет за счет количественно преобладающих эритроцитов. Этот рыхлый красный тромб очень лабилен. Может легко растворяться фибринолизинем, мочевиной. На него воздействует XIII фактор (фибриназа), уплотняя тромб и делая его ограниченно растворимым. Активация XIII фактора также осуществляется тромбином в присутствии IV фактора (ионов кальция). Фаза длится 2—5 секунд.

Последняя, четвертая, фаза состоит из спонтанного фибринолиза.

Актикоагулянтная система. В ее формировании, так же как и в прокоагулянтном звене, участвуют белковые факторы плазмы, тромбоцитов и тканей. Суммарная активность противосвертывающей системы крови складывается из активности собственно антикоагулянтов и активности системы фибринолиза.

Физиологическое действие антикоагулянтов заключается в ограничении функции активных прокоагулянтов и направлено на предотвращение образования сгустков фибрина в токе крови. Функция фибринолитической системы сводится к растворению уже сформировавшихся в кровяном русле сгустков фибрина, то есть эти два звена противосвертывающей системы крови взаимно дополняют друг друга.

Приведем краткую характеристику каждого из них.

Антикоагулянты в самом общем плане принято делить на естественные (физиологические и патологические) и искусственные. Естественные антикоагулянты образуются непосредственно в самом организме, а искусственные — это синтетические препараты, которые оказывают антикоагулянтное действие при введении их в организм извне.

Естественные антикоагулянты в организме подразделяют на первичные и вторичные. Первичные синтезируются независимо от процесса свертывания крови и постоянно присутствуют в кровяном русле. Они не оказывают влияние на неактивные формы факторов гемостаза. Вторичные антикоагулянты образуются только в процессе свертывания крови и фибринолиза.

К естественным (физиологическим) первичным антикоагулянтам относятся: антитромбин III, гепарин, α_2 -макрोगлобулин (антитромбин IV); контактный ингибитор

(инги XIa); ингибитор комплемента — 1 (анти-C1); α_1 -антитрипсин; антикефалин.

Наиболее выраженным антикоагулянтным действием обладает антитромбин III. Он обеспечивает до 90% всей ингибиторной активности крови. Это белок, относящийся к α_2 -глобулинам. Синтезируется в печени. Кроме тромбина инактивирует также факторы XIIa, XIa, Xa, IXa, калликреин и фибринолизин. Содержание антитромбина III в крови в норме колеблется от 70 до 140%.

Активность антитромбина III во многом зависит от наличия в крови гепарина. Более того, оба они могут полноценно реализовать свое физиологическое действие только в комплексе друг с другом. В этом комплексе роль белковой части выполняет антитромбин III, а его кофактором является полисахарид гепарин. При дефиците гепарина в кровяном русле активность антитромбина III снижается более, чем в 30 раз. А при содержании в крови антитромбина III менее 50% от нормы, гепарин полностью теряет свои антикоагулянтные свойства. Это учитывают клиницисты при назначении гепаринотерапии.

Гепарин в малых дозах ингибирует факторы Xa, IXa, VIII. Высокие дозы гепарина ингибируют все фазы свертывания крови.

α_2 — макроглобулин ингибирует тромбин, калликреин, плазмин, трипсин.

Контактный ингибитор (анти XIa) является специфическим ингибитором фактора XIa.

Ингибитор комплемента-1 (анти C1) ингибирует факторы XIa, XIIa, калликреин.

α_1 — антитрипсин ингибирует факторы XIa, IIa и плазмин.

Антикефалин нарушает механизм образования протромбиназы. Ингибирует фактор 3 тромбоцитов, эритроцитин, кефалин.

Естественные вторичные антикоагулянты образуются в ответ на появление в крови активных прокоагулянтов. Сюда относятся антитромбины I, VI; антитромбинопластины и некоторые другие. Антитромбин I — это ничто иное, как сам фибрин, который сорбирует на себе тромбин (IIa), инактивируя его. Антитромбином VI называются продукты расщепления фибрина. Они нарушают полимеризацию фибрин-мономеров и блокируют молекулы фибриногена, делая их недоступными воздействию тромбина. Антитромбопластины образуются из факторов VII, X, блокируют действие тканевого тромбопластина.

Кроме физиологических антикоагулянтов, определенным ингибирующим действием на процесс свертывания крови обладают патологические антикоагулянты, в роли которых могут выступать антитела к отдельным прокоагулянтным факторам, протеинемические белки.

Искусственные антикоагулянты применяются при необходимости для внесения коррекции в процесс гемостаза. Их действие обычно направлено на угнетение синтеза в печени факторов свертывания крови. К искусственным антикоагулянтам относятся: дикумарол, пелентан, синкумар и др.

Система фибринолиза представлена белком крови профибринолизином (плазминоген), который после активации превращается в активный фибринолизин (плазмин), обладающий ферментными свойствами, характерными для протеиназ. Сюда же входят активаторы и ингибиторы фибринолиза.

Активация плазминогена в норме происходит непосредственно на фибриновом сгустке при фиксации на нем XIIa фактора и прекалликреина. Этим обусловлен локальный характер действия плазмина, которое не распространяется по всему сосудистому руслу. Активация плазминогена может также инициироваться протеиназами различного происхождения — урокиназой, протеиназами тканевых клеток, которыми богаты лизосомы. При нарушении проницаемости клеточных мембран, например, при воспалительных процессах, тканевые протеиназы усиленно выбрасываются в кровоток, что усиливает фибринолиз и нередко заканчивается спонтанными кровотечениями. Инфицирование организма бактериями сопровождается массивным поступлением в кровь бактериальных протеиназ (стрептокиназа и др.).

Плазмин вызывает расщепление фибрина на отдельные фрагменты — продукты деградации фибрина (ПДФ), которые в норме удаляются фагоцитарной системой и в крови не накапливаются.

Реализовав свою функцию, плазмин инактивируется системой ингибиторов. К ним относятся: α_1 -антиплазмин (α_1 -антитрипсин); α_2 -макроглобулин; антитромбин III; Си-инактиватор, α_2 -антиплазмин. Это естественные ингибиторы фибринолиза. С лечебной целью могут быть использованы искусственные ингибиторы плазмина — контрикал, трасилол, ϵ -аминокапроновая кислота. Последняя ингибирует только фибринолизин, не сорбированный на нитях фибрина.

ПАТОЛОГИЯ ГЕМОСТАЗА

Принято различать три основные формы нарушения процесса свертывания крови: гипокоагуляции, гиперкоагуляции и дискоагуляции.

Гипокоагуляции проявляются кровоточивостью (геморрагиями) различной степени выраженности. В зависимости от преобладающего механизма в развитии кровоточивости их принято подразделять на коагулопатии, тромбоцитопении и тромбоцитопатии, вазопатии. Коагулопатии связаны с нарушением вторичного гемостаза и могут проявляться гематомным типом кровоточивости, который характерен только для нарушений внутреннего механизма образования протромбиназы. При этом значительные кровоизлияния происходят преимущественно в суставах, мышцах, подкожной клетчатке, то есть в местах более подверженных травматизации. Врожденные коагулопатии связаны с дефицитом или с полным отсутствием ряда плазменных факторов свертывания крови, а также компонентов калликреинкининовой системы. Наиболее характерным заболеванием из данной группы коагулопатий является гемофилия. Это наследственное заболевание, передающееся по материнской линии сыновьям, развивается вследствие дефицита одного из плазменных факторов: VII (гемофилия А—85—90%); IX (гемофилия В—10—15%); XI (гемофилия С— до 1%). Наиболее выраженная кровоточивость отмечается при гемофилиях А и В. Гемофилия типа С проявляется серьезными кровотечениями в экстремальных ситуациях — при обширных травмах, хирургических операциях, родах.

Коагулопатии приобретенного характера могут быть связаны, в частности, с гиперактивацией противосвертывающей системы крови. Например, спонтанные кровотечения сопровождают патологические процессы в легких, поджелудочной железе, матке. Клетки этих органов особенно богаты лизосомальными протеазами и при их поражениях, когда нарушается нормальная проницаемость клеточных мембран, протеазы поступают в большом количестве в кровь. Это вызывает гиперактивацию плазминогена. Образующийся плазмин расщепляет не только фибрин, но и фибриноген. Продукты их расщепления, в свою очередь, блокируют тромбин, чем ингибируют прокоагулянтное звено и усиливают кровотечение.

Вазопатии (поражения сосудистой стенки) проявляются особым типом кровоточивости на фоне воспаленной,

отечной, гиперемированной поверхности кожи, либо телеангиэктазами — различимой на коже расширенной капиллярной сетью.

При лабораторном исследовании гемостаза, в случае гипокоагуляции, определяется характерная картина недостаточности прокоагулянтного звена, которая нередко сопровождается гиперактивацией антикоагулянтной системы.

Гиперкоагуляции. Это состояния, связанные с повышенной склонностью крови к свертыванию. Проявляются тромбоэмболической болезнью, которая сопровождается такими грозными осложнениями, как инфаркт миокарда, ишемический инсульт мозга, тромбофлебит, тромбоз магистральных артерий или других кровеносных сосудов. В механизме развития гиперкоагуляции играют роль коагулопатии, гиперактивация тромбоцитов, поражения сосудистой стенки (склеротические, воспалительные) и ряд факторов риска — эмоциональные стрессы, гиподинамия, недостаточность кровообращения. Из коагулопатий можно назвать состояния, сопровождающиеся гиперактивацией прокоагулянтного звена — увеличение индекса контактной активации, тромбопластиновой активации, увеличение концентрации фибриногена.

Снижение противосвертывающей активности крови — антитромбиновой (особенно снижение содержания антитромбина III), антитромбопластиновой и фибринолитической активности. Лабораторное исследование должно быть направлено на характеристику всех звеньев гемостаза.

Дискоагуляции. Сюда принято относить ДВС-синдром (внутрисосудистое свертывание крови). Возникает в результате разбалансирования гемостаза на разных его уровнях. Всегда носит приобретенный характер, является следствием и, вместе с тем, углубляет такие критические состояния для организма, как сепсис, тяжелые травмы и хирургические вмешательства, осложненные роды, острый внутрисосудистый гемолиз, гемотрансфузионные осложнения, терминальные состояния.

В течение ДВС-синдрома различают фазу гиперкоагуляции и гипокоагуляции. В фазе гиперкоагуляции развивается чрезмерная активация факторов гемостаза. Это фаза быстротечная и трудная для диагностики, так как внешне практически ничем не проявляется. Только при лабораторном исследовании гемостаза обнаруживаются характерные изменения: умеренное снижение количества тромбоцитов, усиление агрегации и адгезия тромбоцитов. Из-за

присутствия в крови тромбина и других активированных прокоагулянтных факторов укорачиваются время свертывания крови по Ли-Уайту, активированное время рекальцификации и тромбиновое время, отмечается гиперкоагуляция по аутокоагулограмме, снижается антитромбиновая активность. Активируется фибринолиз. Из-за появления в крови большого количества продуктов деградации фибрина и фибриногена положительными становятся этаноловая и протаминсульфатная пробы.

Не диагностированная и не прерванная лечебными мероприятиями фаза гиперкоагуляции трансформируется в следующую фазу — гипокоагуляцию. Наступает усиленное потребление факторов гемостаза и резкое падение гемостатических функций крови и сосудов, фаза гипокоагуляции сопровождается профузными кровотечениями из внутренних органов, кровоподтеками на теле, функциональной недостаточностью всех систем органов. В этой фазе может наступить гибель больного. При исследовании системы гемостаза отмечается выраженная тромбоцитопения. Удлиняется до 12 минут и более время свертывания крови по Ли-Уайту, удлиняется активированное время рекальцификации и тромбиновое время, отмечается гипокоагуляция по аутокоагуляционному тесту, снижается протромбиновый индекс, резко снижается количество фибриногена, повышены антикоагулянтные свойства крови, значительно активируется фибринолиз, этаноловая проба отрицательная, а протаминсульфатная проба остается положительной. Это расценивают как свидетельство глубоких нарушений гемостаза. Адекватно проводимая терапия дает благоприятный исход из ДВС-синдрома.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СИСТЕМЫ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

Взятие и обработка крови. Перед взятием крови у больного должны быть приготовлены все необходимые инструменты (иглы, шприцы, секундомер) и пробирки. Кровь у больного при плановом обследовании берут обязательно натощак. В локтевую вену вводят сухую с широким просветом иглу, желательнее без шприца, для того чтобы набрать кровь самотеком в пробирку. Рекомендуются избегать таких манипуляций, как наложение жгута и массаж предплечья, которые активируют процесс свертывания крови и фибринолиз. Первые несколько капель, которые могут содержать тканевой тромбопластин из травмированной кожи и сосудистой стенки, отбрасывают,

затем набирают кровь в пробирки до метки (1 мл) для определения времени свертывания и сразу включают секундомер. После этого набирают кровь в мерную центрифужную пробирку с антикоагулянтом (9 мл) до метки 10 мл. Пробирку закрывают плотно прилегающей пробкой и несколько раз плавными движениями переворачивают для перемешивания крови с антикоагулянтом. Небольшое количество цельной крови (0,3 — 0,5 мл) отливают в отдельную пробирку для постановки аутокоагуляционного теста. Остальную кровь центрифугируют для получения плазмы. В работе используется плазма крови, богатая и бедная тромбоцитами. Для получения плазмы крови, богатой тромбоцитами, центрифугирование проводят при 1000—1500 об/мин в течение 5 минут. Из нее дополнительным центрифугированием при 3000—4000 об/мин в течение 10 минут можно получить плазму, бедную тромбоцитами. Центрифугированию в указанном режиме можно подвергать и цельную стабилизированную антикоагулянтом кровь.

Плазма крови не должна содержать следов гемолиза и примесь эритроцитов, в противном случае она для исследования гемостаза непригодна.

6.0. Реактивы.

1. Лимоннокислый натрий (цитрат натрия), трехзамещенный 5,5-водный ($\text{Na}_3\text{O}_7\text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$) — 3,8% раствор. Стабилен при хранении в посуде с притертой пробкой при $+4^\circ\text{C}$ в течение 10—14 дней.

2. Шавелевокислый натрий (оксалат натрия) $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$, 1,34% раствор. Стабилен при комнатной температуре в течение 10 дней.

3. Хлористый натрий (NaCl), 0,9% (физиологический) раствор. Стабилен при комнатной температуре 2—3 дня.

4. Хлористый кальций (CaCl_2), 5% раствор (плотность 1,040 г/см³). Готовят из обезвоженного прокаливанием до постоянного веса хлорида кальция. Стабилен при хранении в холодильнике ($+4^\circ\text{C}$) в посуде из темного стекла с притертой пробкой до 3—4 месяцев.

Из основного 5% раствора CaCl_2 готовят растворы:

0,025М (0,277%) 5,56 мл 5% раствора CaCl_2 разбавляют до 100 мл дистиллированной водой;

0,5%—10,0 мл 5% раствора разводят до 100 мл дистиллированной водой. Растворы хранят в посуде из темного стекла при $+4^\circ\text{C}$. При появлении хлопьев растворы заменяют.

6.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВРЕМЕНИ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ (метод Ли-Уайта)

Принцип. Метод основан на определении времени образования сгустка венозной крови.

Исследуемый материал. Цельная кровь, без антикоагулянтов.

Ход определения. Пробирку с 1 мл венозной крови устанавливают на водяной бане при 37°C. Одновременно включают секундомер. Через каждые 30 с пробирку наклоняют на 45°. В начале исследования кровь свободно стекает по стенке пробирки. Определение ведут до тех пор, пока не образуется плотный сгусток. Время от момента взятия крови до появления сгустка является временем свертывания крови. У здоровых людей оно составляет от 5 до 10 минут.

Диагностическая значимость. Укорочение времени свертывания крови свидетельствует о повышении образования протромбиназы и о наклонности к гиперкоагуляции, что может привести к тромбозам и тромбоэмболиям.

Удлинение времени свертывания крови свидетельствует о наклонности к гипокоагуляции, что может быть связано с недостаточностью факторов XII, Флетчера, Фитцджеральда, факторов протромбинообразования, увеличении активности антитромбина III, гипергепаринемии. Значительное удлинение определяется при гемофилии, передозировке гепарина.

Примечание. 1. Определение проводится у постели больного.

2. Травматическая венепункция может приводить к загрязнению крови тканевой жидкостью, что уменьшает время свертывания. Тест значительно менее чувствителен, чем другие методы исследования системы свертывания.

6.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВРЕМЕНИ РЕКАЛЬЦИФИКАЦИИ ПЛАЗМЫ

Принцип. Определение времени свертывания плазмы при добавлении к ней оптимального количества хлорида кальция.

Реактивы. 1. 1,34% раствор оксалата натрия; 2. 0,277% раствор CaCl_2 (готовят из обезвоженного препарата); 3. 0,85% раствор NaCl .

Ход определения. Кровь, полученную из вены, смешивают с 1,34% раствором оксалата натрия в соотношении 9 : 1 и центрифугируют 5 мин при 1000 об/мин. Пробирку устанавливают на водяную баню при 37°C и вводят в нее 0,2 мл раствора CaCl_2 и 0,1 мл 0,85% раствора NaCl . Через

60 с (время регистрируют по секундомеру) прибавляют 0,1 мл плазмы, вновь включают секундомер и определяют время свертывания плазмы. Определения повторяют 2—3 раза.

В норме оксалатная плазма здорового человека свертывается в течение 60 — 120 секунд.

Клинико-диагностическая значимость. Удлинение времени рекальцификации наблюдается при тромбоцитопении, укорочение — при гемофилии, гипергепаринемии и др.

6.3. АУТОКОАГУЛЯЦИОННЫЙ ТЕСТ
(МЕТОД БЕРКАРДА, 1965, В МОДИФ. З.С. БАРКАГАНА, 1972
И Е.П.ИВАНОВА, 1980 г.)

Принцип. Аутокоагуляционный тест (АКТ) — исследование гемостаза в условиях стандартизации фосфолипидной и контактной активации начальной фазы процесса свертывания крови за счет использования гемолизата эритроцитов исследуемого.

Реактивы. 1. 3,8% раствор цитрата натрия. 2. 0,025 М раствор хлорида кальция.

Ход определения. Из венозной крови, смешанной с цитратом натрия в соотношении 9:1, отбирают 0,3—0,5 мл в отдельную пробирку для приготовления гемолизат-кальциевой смеси (ГКС). Остальную кровь центрифугируют при 1500 об/мин 10 минут для получения плазмы. Плазму разливают по 0,1 мл в 10 центрифужных пробирок и помещают на водяную баню (37°C). В отдельную пробирку набирают 2 мл раствора хлорида кальция. Затем в нее добавляют 0,1 мл оставленной для приготовления ГКС крови и немедленно включают секундомер. Пробирку с этой смесью встряхивают и помещают в водяную баню (37°C). Затем в каждую из пробирок с плазмой исследуемой крови добавляют по 0,1 мл ГКС последовательно через 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40, 50 и 60 минут от момента приготовления этой смеси. В каждой пробирке определяют время свертывания плазмы, перемешивая содержимое проволочной петлей со скоростью 1 движение в секунду.

Для перевода результатов АКТ в секундах в показатели коагуляционной активности в процентах З.С. Баркаган разработал таблицу, которая приведена ниже (таблица 6.2.).

Таблица 6.2

Таблица для перевода результатов АКТ (в секундах) в показатели коагуляционной активности в % (по Баркагану З.С.)

Время (с)	Показатель, %	Время (с)	Показатель, %	Время (с)	Показатель, %	Время (с)	Показатель, %
7	108	31	43	55	16,5	79	6,7
8	105	32	41	56	16	80	6,5
9	103	33	39	57	15,5	81	6,2
10	100	34	37	58	14,8	82	6,0
11	93	35	36	59	14,5	83	5,8
12	88	36	34	60	13,8	84	5,6
13	85	37	33	61	13,5	85	5,4
14	82	38	31,5	62	12,8	86	5,2
15	79	39	30,5	63	12,5	87	5,0
16	76	40	29,5	64	11,8	88	4,9
17	73	41	28	65	11,3	89	4,7
18	70	42	27,5	66	10,8	90	4,5
19	68	43	26	67	10,5	91	4,4
20	65	44	25,5	68	10,1	92	4,2
21	62	45	24,5	69	9,8	93	4,0
22	59	46	23,5	70	9,4	94	3,9
23	58	47	23	71	9,0	95	3,7
24	56	48	22	72	8,6	96	3,6
25	54	49	21	73	8,2	97	3,4
26	51	50	20,5	74	8	98	3,3
27	49	51	19,5	75	7,7	99	3,2
28	47	52	18,5	76	7,4	100	3,1
29	46	53	18	77	7,2	101	3,0
30	44	54	17,3	78	7	102	2,8

Примечание. АКТ можно выполнять по сокращенному варианту. Для контроля за лечением гепарином достаточно исследовать МА только на 10 минуте инкубации ГКС; для диагностики гемофилии — на 10, 20, 30 минутах; для выявления гиперкоагуляции — на 4, 6, 8, 10-ой минутах.

По аутокоагулограмме определяют следующие параметры:
 А — свертывающую активность на второй минуте инкубации ГКС (норма 15,4%); МА — максимальную свертывающую активность (норма 100%);

T_1 мин — время достижения половины МА (норма $3,7 \pm 0,2$ минуты);

T_2 мин — время достижения максимальной свертывающей активности (норма 10 минут); ИИТ индекс инактивации тромбопластина и тромбина, который рассчитывается по соотношению МА : А (норма 2,1).

6.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТРОМБИНОВОГО ВРЕМЕНИ (Метод Квика)

Принцип. При наличии избытка тромбопластина и оптимального содержания кальция, время образования сгустка в плазме зависит от активности факторов протромбинового комплекса II, VII, IX, X.

Исследуемый материал. Цельная кровь (цитрат натрия). Точное соотношение количества крови и антикоагулянта (9:1) является критическим. Проба стабильна 2 часа при комнатной температуре, 4 часа при 4°C .

Реактивы. 1. 3,8% раствор цитрата натрия; 2. 0,277% раствор CaCl_2 (готовят из обезвоженной соли); 3. 0,85% раствор NaCl ; 4. 1% суспензия тромбопластина (50 мг тромбопластина переносят в фарфоровую ступку и тщательно растирают с 5 мл дистиллированной воды до получения однородной суспензии, которую переливают в центрифужную пробирку и центрифугируют в течение 5 мин при 1500 об/мин; надосадочную мутную жидкость переносят в сухую пробирку и используют для реакции); суспензию тромбопластина готовят перед постановкой исследования; 5. Испытуемая плазма, разведенная (1:1) физиологическим раствором.

Ход определения. В тонкостенную пробирку наливают 0,2 мл раствора CaCl_2 и 0,1 мл суспензии тромбопластина. Смесь инкубируют 30 с на водяной бане при 37°C . В ту же пробирку добавляют 0,1 мл исследуемой плазмы, разведенной 1:1 изотоническим раствором хлорида натрия. При введении плазмы включают секундомер. Через 12 — 15 с, наклоняя пробирку на 45° , наблюдают за появлением нитей или сгустка фибрина и в момент его появления выключают секундомер, а пробирку вынимают из водяной бани. Таким же образом проводят еще одно или два параллельных определения. При этом разница между параллельными определениями должна составлять не более $1/2 - 1\text{с}$. Определение активности протромбина следует проводить не позже, чем через 2 часа после взятия крови. Закончив определение, рассчитывают протромбиновый индекс, используя для этого среднее арифметическое из параллельных определений по формуле:

Протромбиновый индекс (ПТИ)=

$$= \frac{\text{Протромбиновое время здорового}}{\text{Протромбиновое время обследуемого}} \cdot 100\%$$

Протромбиновое время здорового человека указано на этикетке флакона с тромбопластином.

Нормальные величины. Протромбиновый индекс в норме равен 80—100%.

Протромбиновое время у взрослых в норме составляет 11—15 секунд.

Новорожденные: увеличение на 2—3 секунды.

Недоношенные: увеличение на 3—5 секунд. Значения соответствуют таковым для взрослых к 3—4 дню жизни.

Диагностическая значимость.

Увеличение ПТИ наблюдается при заболеваниях печени, дефиците витамина К, гипервитаминозе А, псевдогемофилии, вследствие недостатка протромбина, избытке в крови антикоагулянтов, раке головки поджелудочной железы, геморрагической болезни новорожденных.

Тест используется для контроля за проводимой гепаринотерапией.

Примечания. 1. Протромбиновое время обычно увеличено, если уровни факторов II, V, VII, X в плазме составляют 40% от нормы.

2. Чувствительность к дефициту различных факторов зависит от источника и приготовления тромбопластина.

3. Длительное хранение при 4°С вызывает уменьшение протромбинового времени (холодовая активация фактора VII).

6.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТРОМБИНОВОГО ВРЕМЕНИ РАЗВЕДЕННОЙ (1:1) ПЛАЗМЫ (ПО В.Н. ТУГОЛУКОВУ)

Реактивы: 1. 1,34% раствор оксалата натрия или 3,8% раствор цитрата натрия; 2. 0,025M раствор хлорида кальция; 3. 1% суспензия тромбопластина; 4. 0,85% раствор хлорида натрия.

Ход определения. Плазму разводят 0,85% раствором хлорида натрия 1:1. В тонкостенные пробирки наливают 0,2 мл раствора хлорида кальция и 0,1 мл суспензии тромбопластина. Смесь инкубируют 30 секунд на водяной бане при 37°С, затем в нее вводят 0,1 мл исследуемой плазмы, разведенной 1:1 и включают секундомер. Пробирку с реагентами через каждые 1—2 секунды покачивают до выпадения нитей фибрина, что отмечают на секундомере. Определение повторяют не менее двух раз. Разница во времени в параллельных исследованиях не должна превышать 1 секунду.

Результаты исследования сопоставляют с эталонным протромбиновым временем в смешанной плазме 2—3 здоровых людей.

Протромбиновый индекс (ПТИ) определяют по той же формуле, что и при использовании метода Квика.

Примечания. 1. При определении протромбинового времени в капиллярной крови рекомендуется смешивать кровь с антикоагулянтом в соотношении 4:1.

2. Результаты определения ПТИ можно выражать также в секундах. Согласно рекомендациям Международного комитета по унификации методов в гематологии, результаты следует выражать в секундах, а не в % (указывая одновременно контрольные, нормальные цифры), т.к. вычисление процентного показателя выполняется по арифметической пропорции относительно к образцу нормальной плазмы, а не по стандартной кривой разведения, что делает эти проценты не равнозначными. Однако, указанные выше погрешности не принципиальны в столь субъективном методе исследования, каким является определение протромбинового времени плазмы (субъективность в выборе эталонных образцов плазмы, различие в остроте зрения исследователя и скорости реакции на образование сгустка в реакционной смеси, неодинаковое качество тромбопластина). Поэтому допускается обозначение результатов исследования и в процентах. Тем более, что данный способ выражения результата лучше согласуется со стереотипами клинического мышления.

В обоих вариантах обозначения результатов исследования необходимо указывать активность тромбопластина, который был использован в определении.

3. Метод Туголукова менее точен, чем метод Квика, так как в нем допускается использование более слабого, дающего больший разброс показателей тромбопластина.

6.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТРОМБИНОВОГО ВРЕМЕНИ

Принцип. Определяется время свертывания цитратной плазмы стандартным количеством тромбина. Введением в реакционную смесь готового тромбина извне блокируются первые две фазы свертывания крови, физиологическая сущность которых сводится собственно к образованию тромбина в процессе гемостаза. Это позволяет результаты исследования соотносить с фазой фибринообразования, которая зависит от концентрации фибриногена и активности антикоагулянтов, главным образом антитромбинов в плазме крови.

Реактивы. 1. 0,9% раствор хлорида натрия. 2. Раствор тромбина, свертывающий плазму здорового человека за 14 — 16 секунд.

Ход определения. Пробирку, содержащую 0,1 мл исследуемой плазмы и 0,1 мл физиологического раствора, ставят в водяной термостат при 37°C. На 10 секунде инкуба-

ции добавляют 0,1 мл раствора тромбина и отмечают время образования сгустка. Определение повторяют 2—3 раза и берут средний результат.

Норма. 14 — 16 секунд.

Примечания. 1. Раствор тромбина следует готовить в силиконированной посуде или полиэтиленовых пробирках. В обычной стеклянной посуде тромбин адсорбируется на стекле и быстро инактивируется.

2. Готовится рабочий раствор тромбина непосредственно перед работой, по крайней мере, не более чем за 30 минут до начала исследования.

3. Концентрация раствора тромбина подбирается для каждой новой серии препарата экспериментальным путем, по смешанной донорской плазме, подгонкой активности тромбинового времени для данной плазмы до 14 — 16 секунд.

4. Результаты более стабильные, если используется бестромбоцитарная цитратная плазма.

Клинико-диагностическое значение. Укорочение тромбинового времени характерно для состояний, связанных с гиперкоагуляцией — при предтромбозах, развившихся тромбозах, для гиперкоагуляционной фазы ДВС-синдрома.

Удлинение тромбинового времени отмечается при дефиците фибриногена, либо при его молекулярных аномалиях. При накоплении в плазме антитромбинов. Значительное удлинение тромбинового времени, вплоть до полной несвертываемости плазмы под влиянием тромбина, наблюдается при массивной гепаринотерапии и во второй фазе ДВС-синдрома.

6.7. ЭТАНОЛОВЫЙ ТЕСТ

(по GODAL H. ET. AL., 1971 Г. В МОДИФИКАЦИИ ГЛЫЧЕВА В.Г., 1975)

Принцип. Появление желеобразной массы (сгустка) в плазме при добавлении к ней 50% этанола говорит о наличии в ней комплексов фибрин-мономеров с продуктами деградации фибриногена. Для предупреждения образования таких комплексов после забора крови из вены, т.е. вне организма, в стабилизатор добавляется ингибитор фибринолиза — ϵ -аминокапроновая кислота (ЭАКК).

Реактивы. 1. 3,8% раствор цитрата натрия; 2. 0,1М раствор ЭАКК; 3. 50% раствор этанола; 4. Цитратно-ЭАКК смесь. 325 мг сухой ЭАКК растворяют в 25 мл 3,8% раствора цитрата натрия.

Ход определения. При взятии крови из вены в качестве антикоагулянта используют цитратно-ЭАКК смесь.

К 0,4 мл богатой тромбоцитами плазмы добавляют 0,15 мл 50% раствора этанола, пробирку встряхивают и включают

секундомер. Пробирку оставляют при комнатной температуре на 10 минут. По истечении этого времени, отмечают появился ли в плазме желеобразный сгусток. При появлении сгустка тест оценивается как положительный, при отсутствии сгустка — как отрицательный.

Примечания. 1. Результат читается только через 10 минут, более позднее образование геля или сгустка не учитывается. 2. Появление в плазме хлопьев, мутности, зернистости не учитывается.

Клинико-диагностическое значение. Положительный этаноловый тест отмечается при ДВС-синдроме или локальном внутрисосудистом свертывании крови, причем на ранних этапах процесса. При резкой гипофибриногемии (менее 0,5 г/л), а также после поглощения фибрин-мономерных комплексов ретикулоэндотелием, тест становится отрицательным.

Глава 7

ВОДНО-СОЛЕВОЙ ОБМЕН

Для нормальной жизнедеятельности организма, кроме органических веществ, его составляющих, важны также неорганические компоненты. К ним относятся вода и минеральные элементы.

Распределение и обмен воды. На долю воды приходится до 65% массы тела. Вода является основным и универсальным растворителем как органических, так и неорганических веществ в организме. Это обусловлено нейтральной реакцией воды и нейтральным электропотенциалом ее молекул.

Вся вода, содержащаяся в организме, подразделяется на внутриклеточную и внеклеточную, каждая из которых может существовать в виде двух фракций: а) фракция воды, способная к обмену; б) фракция воды, связанная в коллоидных системах с молекулами органических веществ (белков, жиров, углеводов).

В состав внутриклеточных жидкостей входит большая часть воды, преимущественно связанная в коллоидных системах с молекулами органических веществ. Внеклеточная вода составляет основу внутрисосудистых жидкостей (лимфа, плазма крови), сюда входит большая часть воды, связанная в коллоидных системах с молекулами органических веществ.

Любая из перечисленных форм воды в организме не является химически чистой, а представляет собой сложный раствор, в котором помимо воды, как растворителя, содержатся растворенные в ней вещества. Концентрация таких растворов *in vivo*, как и растворов вообще, выражается молярностью, т.е. числом молей растворенного вещества в 1 л раствора.

Физиологическую активность водных растворов животного организма принято обозначать как осмотическое давление растворов. Оно пропорционально полярности раствора и температуре. Осмотическое давление можно охарактеризовать также величиной осмолярности. Осмолярность - это суммарная осмотическая концентрация растворенных кинетически активных молей вещества на 1 л раствора. Кинетической активностью обладают как неорганические, так и органические молекулы. Осмолярность предопределяется, главным образом, неорганической составляющей (95%) и преимущественно катионами натрия и анионами хлора. Вклад органических компонентов в общую осмолярность плазмы не превышает 5%. Из них на долю белков приходится около 0,5%. Давление, создаваемое белками, называется онкотическим. Несмотря на низкий удельный вес в общей осмолярности плазмы крови, онкотическое давление создает значительный физиологический эффект в поддержании объема циркулирующей крови и обменных процессов через капиллярные мембраны.

Потребность организма в воде зависит от целого ряда факторов: возраста, интенсивности обменных процессов, мышечной деятельности, функционального состояния почек, температуры окружающей среды, состава пищи. У взрослых потребность в воде составляет в среднем 40 г на 1 кг массы тела, для детей эта величина приблизительно в три раза выше -- от 70 до 150 г на 1 кг массы тела. В нормальных условиях за сутки в организм вводится около 2,5 л воды, включая экзогенную воду, поступающую с жидкостью и твердой пищей, и эндогенную, или метаболическую воду, которая образуется в организме при окислительном расщеплении белков, жиров и углеводов.

Всасывание воды, поступающей в составе пищи, происходит по всему желудочно-кишечному тракту. Основное же ее количество реабсорбируется в толстом кишечнике.

Выведение воды из организма осуществляется с мочой, калом, потом и при дыхании. Почки являются основным органом выведения воды и электролитов из орга-

низма. С мочой теряется около 1,5 л воды в сутки. Эти потери условно подразделяют на обязательные и факультативные. Обязательные составляют то наименьшее количество жидкости (0,5 л), с которой в максимальной концентрации удаляются продукты обмена. Это количество не зависит от степени гидратации организма. Факультативные или управляемые потери (0,8—1,3 л) варьируют в зависимости от степени гидратации организма и состояния нейроэндокринных механизмов регуляции диуреза.

Потеря воды через желудочно-кишечный тракт не превышает 0,1 л в сутки.

Потеря воды с потом и при дыхании составляет около 1 л в сутки. Зависит от степени гидратации организма, температуры окружающей среды, физической нагрузки.

Регуляция водно-солевого обмена обеспечивается ЦНС, эндокринной системой и почками, при ведущей роли ЦНС. Повышение осмоляльности плазмы через ЦНС вызывает усиленное выделение гормона задней доли гипофиза - вазопрессина (антидиуретического гормона), который уменьшает выведение воды из организма за счет реосорбции воды в почечных канальцах. Вода, задерживаясь в организме, снижает осмотическое давление, секреция вазопрессина также снижается. Гиперпродукция гормона приводит к накоплению жидкости в организме и отекам, а гипопродукция вызывает усиленное выделение жидкости из организма, вплоть до мочеизнурения (несахарный диабет), когда моча может выделяться в количестве до 20 л в сутки. Такая моча не содержит патологических элементов, имеет низкую относительную плотность, близкую к относительной плотности воды и практически не окрашена.

На водный обмен влияет также гормон альдостерон, секретируемый клубочковым слоем коры надпочечников. Его действие связано с уровнем натрия в плазме крови. Снижение концентрации натрия приводит к падению осмотического давления плазмы и к усилению потери воды из организма. Гипонатриемия стимулирует секрецию альдостерона, он усиливает обратное всасывание натрия в почках и, следовательно, способствует задержанию воды в организме. Гипернатриемия тормозит выделение альдостерона.

Почки участвуют в регуляции объема воды в организме своими физиологическими функциями - процессами фильтрации и реосорбции воды и минеральных солей, синтезом и секрецией ряда веществ. В почках продуциру-

ется гормон ренин. Усиливается его секреция при уменьшении объема внутрисосудистой жидкости и снижении артериального давления. Ренин способствует мобилизации в сосудистое русло тканевой жидкости и нормализации артериального давления, необходимого для физиологического течения процессов фильтрации мочи.

Патология обмена воды в самом общем плане выражается в гипер- и гипогидратации организма. Превышение поступления воды в организм над ее выделением приводит к положительному водному балансу, увеличению объема воды в организме — гипергидратации. Это состояние может наблюдаться при тяжелой сердечно-сосудистой недостаточности, при аллергических и воспалительных процессах. Проявляется отеками, накоплением транссудатов в полостях тела.

Превышение выделения воды над поступлением вызывает отрицательный водный баланс, уменьшение объема воды в организме — гипогидратацию, дегидратацию. Развивается при заболеваниях, протекающих с неукротимой рвотой и поносом, усиленном потоотделении, недостаточности надпочечников, полиурии.

Несахарный диабет также является патологией обмена воды, вызванной нарушением выработки антидиуретического гормона гипофиза при инфекционном или травматическом поражении гипоталамуса или нарушением проходимости портальной системы гипофиза опухолью. Результатом является избыточная потеря жидкости организмом.

Для уточнения диагноза несахарного диабета применяются клинико-биохимические тесты.

Тест с ограничением приема жидкости в течение 8 часов (проводится в условиях стационара) предусматривает:

1) взвешивание пациента каждый час (тест прекращается, если масса тела пациента снижается по сравнению с исходным уровнем более, чем на 3%);

2) каждый час сбор накопившейся мочи с определением ее объема и осмолярности;

3) взятие крови через 30 минут, 3,5 часа, 6,5 и 7,5 часов для определения осмолярности плазмы;

4) затем пациенту дают воду и вводят интраназально препарат вазопрессин, собирают мочу за последующие 4 часа.

При несахарном диабете центрального происхождения, масса тела снижается более чем на 3%, осмолярность плазмы превышает 300 ммоль/кг, отношение осмолярности

мочи и плазмы не больше 1,9. При нефрогенном заболевании — введение вазопрессина не приводит к повышению осмоляльности мочи. Таким образом, первая часть теста позволяет дифференцировать несахарный диабет от первичной полидипсии, а вторая часть — уточнить генез несахарного диабета, поскольку при поражении почек они нечувствительны к вазопрессину.

При введении гипертонического солевого раствора содержание вазопрессина в плазме при нефрогенном диабете и полидипсии возрастает, тогда как при центральном генезе несахарного диабета оно не изменяется.

Тест с введением гипертонического раствора (3% раствор NaCl) представляет собой пробу на чувствительность осморцепторов и способность гипофиза вырабатывать антидиуретический гормон гипофиза.

МИНЕРАЛЬНЫЙ ОБМЕН

Натрий. Натрий является главным катионом внеклеточных жидкостей организма, в составе которых его содержание достигает 50% от всего количества натрия. Натрий обладает также свойством накапливаться в костях, где образуется естественное депо натрия. В составе костной ткани натрия содержится около 44% его общего количества. И всего 6% натрия локализуется внутриклеточно.

Биологическая роль натрия состоит в поддержании осмотического давления, причем, это главный компонент, участвующий в создании нормальной осмолярности. Натрий участвует в поддержании кислотно-основного состояния, входя в состав буферных систем крови. Участвует в передаче возбуждения по нервному волокну, участвует в процессах мембранного транспорта глюкозы, аминокислот и других соединений.

Суточная потребность в натрии для взрослых составляет около 215 ммоль. Поступает в организм в составе пищи. Выводится натрий из организма в основном почками. Лишь 5—10% натрия теряется из организма в составе пота и кала. Баланс натрия в организме регулируется ЦНС, эндокринной системой и почками. Существенное влияние на обмен натрия оказывает гормон коры надпочечников — альдостерон. Гормон способствует задержке натрия в организме.

Патология обмена натрия проявляется гипо- и гипернатриемией. Гипонатриемия развивается при недостаточ-

ной продукции альдостерона, введении в организм больших количеств жидкости. Гипернатриемия наблюдается при гиперпродукции альдостерона, значительных потерях жидкости без потери солей, при хронических нефритах, гепатитах, циррозе печени, менингитах, энцефалитах.

Нормальные величины содержания натрия в сыворотке крови:

	<i>мэкв/л (ммоль/л)</i>
Недоношенные, кровь из пуповины:	116—140
48 часов	128—148
Новорожденные, кровь из пуповины	126—166
Новорожденные	134—146
Дети	138—146
Взрослые	136—146

Содержание натрия в эритроцитах у взрослых в норме составляет 9—28 ммоль/л. Концентрация натрия в поте представляет интерес для диагностики муковисцидоза и составляет у новорожденных 30 ммоль/л, у детей более старшего возраста и взрослых — 26 ммоль/л (диапазон колебаний 10—60 ммоль/л).

Методы определения: 1. Колориметрическое определение натрия основано на его осаждении в виде тройной соли уранил-цинк-ацетата, желтую окраску которой измеряют фотометрическими методами (Асагиани В. С., 1957). Существуют различные модификации данного метода.

2. Пламенная фотометрия — метод основан на фотометрическом измерении интенсивности свечения пламени газа, в которое в распыленном состоянии поступает исследуемая жидкость. Световой поток от пламени проходит через светофильтр и попадает на фотоэлемент. Величина фототока регистрируется гальванометром и рассчитывается по калибровочному графику.

Калий. Калий является главным внутриклеточным катионом. Распределяется калий в организме следующим образом: внутриклеточно — до 90%; внеклеточные жидкости — 2,5%, в тканях опорно-двигательного аппарата — до 8%. Основным депо калия является мышечная ткань.

Нормальные величины содержания калия в сыворотке крови:

	<i>мэкв/л (ммоль/л)</i>
Недоношенные, кровь из пуповины:	5,0—10,2
48 часов	3,0—6,0
Новорожденные, кровь из пуповины	5,6—12,0
Новорожденные	3,7—5,9
Дети	3,4—4,7
Взрослые	3,5—5,1

Биологическая роль калия: участвует в поддержании осмотического давления и кислотно-основного состояния в клетках; вместе с натрием создает разность потенциалов по обе стороны клеточной мембраны, что обеспечивает энергией физиологические процессы, протекающие в мембранах; участвует в процессах биосинтеза белка, гликогена, АТФ, креатинфосфата, ацетилхолина; участвует в передаче возбуждения по нервномышечному волокну.

Суточная потребность калия для организма составляет в среднем 2 — 3 г или 50 — 75 ммоль, для ребенка 16 — 30 мг/кг веса. Поступает в организм в составе пищи.

Выводится калий из организма, главным образом, почками (80 — 90%), калий способствует диурезу и выводится намного легче натрия, незначительные количества калия теряются в составе кала, пота и слюны.

В регуляции уровня калия играет роль ЦНС - калий - чувствительные рецепторы, расположенные в кровеносных сосудах печени, почек, тонкого кишечника. Из гормонов, участвующих в обмене калия, наиболее выраженным влиянием обладают альдостерон и инсулин. Альдостерон усиливает секрецию калия почечными канальцами, способствуя снижению его концентрации в организме. Инсулин, напротив, уменьшает потери калия почками и облегчает его транспорт в клетки.

Содержание калия в сыворотке крови взрослых в норме составляет 3,6—5,3 ммоль/л; в эритроцитах — 19,9—99,3 ммоль/л.

Патология обмена калия проявляется гипо- и гиперкалиемией. Гипокалиемия — снижение концентрации калия в плазме крови < 4 — 3,5 ммоль/л и в эритроцитах < 40 ммоль/л, наблюдается при повышенной продукции альдостерона и недостаточности инсулина, при употреблении пищи, обедненной калием. При полинурии, связанной с почечной, либо иной патологией, а также возникающей в результате длительного приема диуретиков, гипокалиемия проявляется замедлением проведения не-

рвного возбуждения в мышечной ткани и особенно в миокарде. При этом возникает недостаточность сердечной мышцы, вплоть до паралича мышц и остановки сердца.

Гипокалиемия у детей развивается при поносах и рвоте любой этиологии, при введении значительных количеств глюкозо-солевых растворов, лишенных калия, больших количеств белка и глюкозы ребенку с гипотрофией, поскольку отложение гликогена и синтез белка в клетках сопровождается связыванием калия. Уровень калия >10 ммоль/л приводит к остановке сердца.

Гиперкалиемия — повышение концентрации калия в сыворотке крови $>6 - 7$ ммоль/л — признак тяжелого нарушения клеточного метаболизма с изменением трансмембранного градиента электролитов и расстройством КЩС. Возникает при избыточном поступлении калия с лекарственными препаратами, при усиленном выходе калия из клеток в результате травмирования тканей, ожогах, гемолизе эритроцитов, а также за счет нарушения выведения калия при заболевании почек. Основные изменения при данном состоянии отмечаются так же со стороны сердечной мышцы.

Гиперкалиемия у детей чаще всего развивается при почечной недостаточности, при гипокортицизме, остром инфекционном токсикозе.

Хлор. Является анионом внеклеточных жидкостей. Биологическая роль хлора заключается в поддержании осмотического давления и кислотно-основного состояния внеклеточной жидкости, участии в газообменной функции эритроцитов, образовании соляной кислоты желудочного сока, активации амилазы, обезвреживании продуктов патологического распада тканей. Суточная потребность в хлоре составляет до 215 ммоль. Поступает в организм с пищей в виде NaCl.

Выделяется из организма почками, желудочным соком, потом.

Обмен хлора в организме пассивно связан с обменом натрия и регулируется теми же нейрогуморальными факторами, что и обмен натрия.

Нормальное содержание хлора в сыворотке крови составляет:

	мэкв/л (ммоль/л)
Кровь из пуповины:	96—104
Недоношенные	95—110
Новорожденные	96—110
Взрослые	98—106

Методы определения хлора:

1. Реакция с раствором нитрата серебра используется для определения хлора в биологических жидкостях. Не прореагировавший с хлором ион серебра оттитровывают раствором тиоцианата натрия.

2. Метод О. Шелес и С. Шелес. Хлор титруют раствором нитрата ртути в присутствии индикатора дифенилкарбазона, который образует сине-фиолетовый комплекс с ионами ртути. Свободные ионы ртути появляются только после того, как полностью будут связаны ионы хлора, что позволяет регистрировать в присутствии индикатора момент окончания реакции с хлором.

В патологии обмена хлора различают гипо- и гиперхлоремиию. Гипохлоремия наблюдается при недостаточном поступлении ионов с пищей и избыточных потерях его при заболеваниях, сопровождающихся обезвоживанием организма (поносы, рвоты, полинурия, усиленное потоотделение). Значительные снижения уровня хлора в плазме крови могут приводить к нарушению моторики кишечника вплоть до его пареза, судорогам, олигонурии. Гиперхлоремия встречается при повышенном поступлении NaCl с пищей, при задержке жидкости в организме в виде отеков и трансудатов в полостях, при нарушении его выведения с мочей в результате гломерулонефритов. При повышенной секреции альдостерона.

Фосфорно-кальциевый обмен. Обмен фосфора и кальция в организме развивающегося ребенка находится в тесной взаимосвязи как в физиологических условиях, так и при возникновении патологического процесса. Нередко нарушение обмена одного из этих элементов влечет за собой расстройство обмена другого.

КАЛЬЦИЙ. Содержится в организме в основном в костях, дентине и эмали зубов -- 99% общего количества кальция. Присутствует во внеклеточных жидкостях. Внутри клеток в норме не отмечается. Может накапливаться в клетках при гипервитаминозе Д, что приводит к тяжелой инвалидности.

В плазме крови различают несколько фракций кальция: ионизированный, неионизированный, но способный к диализу и недиализирующийся, белковосвязанный кальций. Биологически активным является только ионизированный кальций, его концентрация составляет 50% от общего содержания кальция в крови.

Биологическая роль кальция: участвует в процессах нервно-мышечной возбудимости как антагонист калия; в

процессах свертывания крови; в построении костного скелета.

Суточная потребность кальция в норме у взрослого человека составляет около 30 ммоль.

Выводится из организма кальций, в основном, в составе мочи, а так же слюнными железами и в составе секретов желудка и поджелудочной железы.

Регулируется обмен кальция гормонами: околощитовидных желез — паратиринном и щитовидной железы — кальцитонином. В регуляции принимает участие витамин Д. Паратирин увеличивает концентрацию кальция путем его реабсорбции в почечных канальцах и за счет поступления кальция в кровь из костной ткани. Кальцитонин снижает уровень кальция за счет снижения его реабсорбции в почечных канальцах и усиления фиксации в костях.

В норме выделение этих двух гормонов находится в динамическом равновесии.

В патологии обмена кальция различают гипо- и гиперкальциемию. Гипокальциемия встречается при гипопаратиреозе. Недостаточность функции околощитовидных желез приводит к снижению уровня ионизированного кальция в крови, что проявляется тетанией — приступами судорог. Снижение уровня кальция наблюдается при циррозе печени, бронхопневмонии, гломерулонефритах, при гиповитаминозе Д, что особенно существенно в детском возрасте, когда возникает рахит. Гиперкальциемия отмечается при гиперфункции околощитовидных желез, при деструктивных процессах в костях, лейкозе, гангрене, злокачественных новообразованиях, миеломной болезни.

ФОСФОР. Содержится в организме, главным образом, в костях и зубах (90%). Остальное количество концентрируется внутриклеточно — фосфор является главным внутриклеточным ионом. Незначительная часть фосфора определяется во внеклеточных жидкостях.

Биологическая роль фосфора. Участвует в построении костной ткани, в построении клеточных мембран, входит в состав ДНК и РНК, участвует в депонировании и переносе энергии в виде макроэргических связей АТФ, участвует в регуляции кислотно-щелочного состояния (входит в состав буферных систем крови), активирует всасывание ионов кальция в кишечнике, используется при синтезе креатинфосфата в мышечной ткани.

Содержится в крови в виде следующих фракций: неорганического фосфора, органических фосфорных эфиров, фосфолипидов и свободных нуклеотидов. Для клиничес-

ких целей чаще используется определение неорганических фосфатов и фосфолипидов.

Суточная потребность в фосфоре составляет около 30 ммоль. Поступает в организм в составе пищи.

Выводится фосфор из организма, в основном, в составе мочи, а также кала, в виде фосфатов натрия, калия, кальция.

Обмен фосфора тесно связан с обменом кальция. И в регуляции обмена фосфора также наибольшее значение имеют гормоны паратирин, кальцитонин и витамин Д.

Патология обмена фосфора проявляется гипо- и гиперфосфатемией. Гипофосфатемия наблюдается при гиперпродукции гормона паратирина, введении инсулина, акромегалии, при гиповитаминозе Д с развитием рахита у детей. Гиперфосфатемия возникает при гипопаратиреозе, гипервитаминозе Д, острой желтой атрофии печени, миеломной болезни, лейкозах.

ЖЕЛЕЗО. Общее содержание железа в организме очень невелико и составляет 53,6—89,5 ммоль (3—5 г). Но этого количества достаточно для обеспечения газообменной функции эритроцитов и процессов клеточного дыхания—основной биологической роли железа. В свободном виде железо в организме не встречается, входит в состав различных комплексов. Подразделяется на внутриклеточное и внеклеточное. К внутриклеточным соединениям железа относятся: гемоглобин (в его составе содержится до 70% всего железа организма), миоглобин и ряд железосодержащих ферментов, таких как цитохромы, каталаза, пероксидаза и некоторые другие. Сюда же относятся ферритин и гемосидерин, состоящие из белка апоферритина, связанного с ионами трехвалентного железа. В форме ферритина и гемосидерина железо депонируется, образуя резерв в костном мозге и, особенно, в печени и селезенке.

К внеклеточным соединениям железа относятся белок плазмы крови — трансферрин, являющийся транспортной формой железа в крови. Обеспечивает доставку железа от кишечника к кроветворным органам. Трансферрин способен насыщаться железом до 40% своей общей массы. С трансферрином связано такое понятие, как общая железосвязывающая способность плазмы крови.

Суточная потребность организма в железе составляет 0,36—0,44 ммоль. Большой частью погашается за счет железа, образующегося при распаде гемоглобина эритроцитов, а также за счет поступлений с пищей.

Выводится из организма в составе желчи, кала, мочи и пота, у женщин также в ходе менструальных кровотечений.

Патология обмена железа обычно связана с его дефицитом, который развивается при кровопотерях, беременности, недостаточном поступлении с пищей, нарушении всасывания в кишечнике, недостаточным освобождением из депо организма. При этом развиваются железodefицитные анемии.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МИНЕРАЛЬНОГО ОБМЕНА. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЛЬЦИЯ

7.1. КОМПЛЕКСОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЛЬЦИЯ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ С ПРИМЕНЕНИЕМ МУРЕКСИДА (М-Д МОИЗИСА И ЗАКА)

Принцип метода. Свободный мурексид в щелочной среде имеет сине-фиолетовый цвет, а связанный в комплекс с кальцием — розово-оранжевый. При титровании раствором более сильного комплексообразователя (комплексон III) этот комплекс разрушается и связанный мурексид освобождается. Проба приобретает фиолетовый цвет.

Реактивы: 1. Раствор комплексона III (синонимы: трилон Б, ЭДТА). 0,665 г комплексона III вносят в колбу емкостью 1,0 л и доводят дистиллированной водой до метки.

2. 9 н раствор NaOH. 36 г NaOH растворяют в небольшом объеме дистиллированной воды, переносят в колбу на 100 мл и доводят объем водой до метки.

3. Мурексид, смешанный с NaCl в соотношении 1:50 и растертый в тонкий порошок, хранить в полиэтиленовой посуде.

Ход определения. В коническую колбу внести 50,0 мл дистиллированной воды, 0,4 мл 9 н раствора NaOH и прибавляют на кончике ножа смесь мурексида. Появляется сиреневая окраска свободного индикатора. Объем жидкости делят пополам: одна часть раствора служит этанолом окраски (свидетель), другая — используется для опытной пробы. К ней добавляют 1 мл сыворотки крови, отчего появляется розовое окрашивание. Раствор немедленно титруют комплексонам III до возвращения прежней окраски индикатора (свидетеля).

Расчет ведут по формуле:

$X = 1,8 \cdot a$; где X — концентрация кальция, ммоль/л; 1,8 — фактор пересчета, соответствующий концентрации комплексона; a — количество раствора комплексона, мл.

Для выражения результата в мг/100 мл полученное значение умножают на 4.

Примечания: 1. При недостатке сыворотки исследование можно провести в 0,5 мл сыворотки и результат умножить на 2. 2. Раствор комплексопа III может быть проверен при помощи стандартного раствора кальция (этанол). Вместо сыворотки вносят 1 мл стандартного раствора (100 мг/л).

7.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЛЬЦИЯ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ФОТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Принцип метода. Реактив ГБОА (глиоксаль бис-2-оксанил) образует с ионами кальция в щелочной среде комплекс красного цвета, интенсивность которого пропорциональна концентрации кальция и определяется фотометрически. Этот метод положен в основу наборов реактивов, выпускаемых фирмой «ЛАХЕМА».

Примечания: 1. При использовании фотометрических методов исключается применение антикоагулянтов (цитрат, ЭДТА). 2. Необходимо учитывать, что концентрация аналита зависит от положения тела во время взятия крови (разница может достигать 10% между взятием крови в положении сидя и лежа), что объясняется связью кальция с белками. 3. Следует избегать венозаза при взятии крови. 4. Содержание Са в сыворотке крови существенно зависит от двух физиологических факторов — концентрации общего белка (альбумина) и величины рН. Для большей точности определения содержания Са, можно каждый раз одновременно с определением Са определять содержание альбумина, на основе этих результатов для пересчета концентрации Са применять формулу (Rayne et al.):

$$\text{Са корректированный} = \text{Са опред.} - \text{альбумин} + 40,$$

где: альбумин в г/100 мл, Са в мг/100 мл.

5. Желательно пользоваться свежеприготовленными реагентами. Разница концентрации Са, измеренного реагентами, хранящимися при +4°C от 4 до 12 часов, и свежеприготовленными реагентами может достигать 17–21% в сторону завышения результатов при использовании хранившихся реактивов.

Нормальные значения Са. 2,1–2,6 ммоль/л (9–12 мг%).

На содержание Са в плазме и других жидкостях организма влияют питание, состояние эндокринной системы, почек, желудочно-кишечного тракта. Для интерпретации результатов необходимо также определять концентрацию альбумина в плазме, так как часть кальция находится в связанном с белками плазмы состоянии.

Клиническое значение. Повышение содержания кальция отмечается при гиперпаратиреозе, секреции паратиреоидного гормона злокачественными опухолями, гипер-

витаминозе Д, миеломной болезни, злокачественных опухолях в костях, лейкозах.

Снижение показателей имеет место при гипопаратиреозе, дефиците витамина Д (рахит, остеомаляция), почечной недостаточности, гипопроteinемии, синдроме мальабсорбции, тяжелом панкреатите, бронхопневмонии.

7.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХЛОРА В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ МЕРКУРИМЕТРИЧЕСКИМ ТИТРОВАНИЕМ В ПРИСУТСТВИИ ИНДИКАТОРА ДИФЕНИЛКАРБАЗОНА

Принцип. Хлор в биологических жидкостях взаимодействует с нитратом ртути с образованием плохо диссоциирующей хлористой ртути. Когда весь хлор связан, избыток ионов ртути образует с дифенилкарбазоном комплекс, окрашенный в сине-фиолетовый цвет, что отмечают как точку эквивалентности титрования.

Реактивы:

1. Раствор азотнокислой ртути. 2,0 г азотнокислой ртути $Hg(NO_3)_2 \cdot 2H_2O$ (х.ч.) растворяют в 200 мл дистиллированной воды, добавляют 20 мл 2н азотной кислоты и доводят водой до 1 литра. Реактив стойкий.

2. Раствор индикатора. 100 мг дифенилкарбазона растворяют в 100 мл 96% этанола. Раствор устойчив не менее месяца при хранении в сосуде из темного стекла в холодильнике.

3. 2 н раствор азотной кислоты. 14 мл концентрированной азотной кислоты доводят до 100 мл дистиллированной водой.

4. Стандартный раствор хлорида натрия 10 ммоль/л. 584,5 мг $NaCl$ (х.ч.), высушенного до постоянного веса при температуре $120^\circ C$, доводят до 1 л дистиллированной водой. 1 мл раствора содержит 0,01 ммоль хлора.

7.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХЛОРИДОВ В ПОТЕ

Реактивы, аппаратура, материалы. Аналитические весы, гальванический аппарат постоянного тока до 50 мг; 2 набора свинцовых пластинчатых электродов толщиной 0,2—0,4 мм с размером анода 6,5x8,5 см для детей старше 3 лет и 4,0x5,5 см для детей до 3 лет (размер катода должен быть на 0,5 см длиннее и шире анода); набор гидрофильных прокладок к электродам толщиной не менее 1 см и на 1 см длиннее и шире свинцовых электродов; биты эластичные, полиэтиленовая пленка, ватно-марлевые подушечки, лейкопластырь, пинцеты, бюксы на 20 мл, фильтро-

вальная бумага, беззольные фильтры, 0,07% раствор хлористоводородного пилокарпина, 0,01N раствор AgNO_3 , натрий хлористый, 10% водный раствор хромата калия, спирт 50%.

Забор материала. Кожа внутренней поверхности верхней трети предплечья последовательно очищается спиртом и водой. На очищенное место накладывается смоченный 0,07% раствором пилокарпина небольшой лист фильтровальной бумаги размером с прокладку. Сверху накладывается смоченная теплой водой прокладка и анод, которые покрываются полиэтиленовой пленкой и укрепляются эластичным бинтом. Катод аналогичным образом фиксируется на наружной поверхности плеча без обработки кожи.

Включается гальванический аппарат и сила тока постепенно доводится до 1,5—2 мА для малых электродов и 4—6 мА — для больших. Продолжительность процедуры — 10 минут. Затем ток постепенно снижается до “0” и аппарат выключается. Электроды снимаются, покрасневший участок кожи под анодом промывается дистиллированной водой и высушивается. После этого на него накладывается листок предварительно взвешенного в бюксе беззольного фильтра размером 4х6 см, сверху покрывается полиэтиленовой пленкой, на 1 см выходящей за края бумаги. Пленка тщательно приклеивается к коже лейкопластырем, чтобы избежать испарения потовой жидкости. Сверху накладывается ватно-марлевая подушечка и укрепляется бинтом.

Продолжительность сбора пота — 30 минут. При плохом потоотделении время увеличивается до 1 часа. Затем пленка снимается, листок беззольного фильтра быстро переносится пинцетом (не руками!) в бюкс и вновь взвешивается. Разница в показателях второго и первого взвешивания соответствует количеству выделенного пота. С помощью этого метода можно получить до 500 мг пота. Навески менее 50 мг для анализа не берутся.

После взвешивания фильтровальная бумага заливается 10 мл дистиллированной воды и оставляется на 24 часа для элюирования электролитов. Если навеска пота превышает 400 мг, то количество воды увеличивается до 20 мл и это учитывается при расчете.

Определение хлоридов. Для определения концентрации хлора в поте рекомендуется простой титрометрический метод Моро, основанный на осаждении хлора азотнокислым серебром в присутствии индикатора хромата калия.

После осаждения хлоридов избыток AgNO_3 связывается с хроматом калия, в результате чего образуется хромат серебра, дающий кирпичный цвет.

Приготовление основного стандартного раствора NaCl для определения хлора. 0,659 г дважды перекристаллизованного NaCl растворяют в небольшом количестве воды и объем доводится до 100 мл. Концентрация такого раствора по хлору составляет 400 мг% или 112,4 мэкв/л.

Из исходного раствора готовят несколько рабочих растворов по схеме:

Основной р-р (мл)	Дист. вода (мл)	Концентрация хлора	
		мг %	мэкв/л
0,62	9,38	25	7,0
1,25	8,75	50	14,1
2,50	7,50	100	28,2
4,38	5,62	175	49,3
9,12	0,88	365	103,2

Из каждого рабочего раствора берется микропипеткой по 0,05 мл и добавляется дистиллированная вода до 5 мл, добавляется 1—2 капли 10% бихромата калия и титруют 0,01N AgNO_3 до появления кирпично-красного цвета.

$$\text{Расчет. Cl (мэкв/л)} = \frac{100 \cdot V}{5 \cdot 0,1},$$

где: V - объем AgNO_3 в мл, пошедшего на титрование.

Определение натрия. Определение натрия в потовой жидкости проводится на пламенном фотометре. Для этого готовятся стандартные растворы NaCl, по которым проводится построение калибровочной кривой или составление таблицы расчетов.

Приготовление основного стандартного раствора для определения Na. 254 мг дважды перекристаллизованного NaCl растворяют в 100 мл дистиллированной воды. Из основного раствора готовятся растворы разной концентрации по схеме на стр. 210.

По данным растворам строится калибровочная кривая и составляется таблица. По показаниям пламенного фотометра вычисляется концентрация натрия для каждой пробы.

Основной р-р (мл)	Дист. вода (мл)	Концентрация Na	
		мг %	мэкв/л
0,25	99,75	25	10,9
0,5	99,5	50	21,75
1,0	99,0	100	43,5

Расчет. Поскольку каждая проба заливается постоянным количеством (10 мл) дистиллированной воды, независимо от навески, то при навеске больше 100 мг разведение будет больше, чем 1:100. В связи с этим, для окончательного расчета при навеске свыше 100 мг миллиэквиваленты нужно разделить на А, где:

$$A = \frac{\text{навеска пота в мг.}}{100}$$

Если навеска пота меньше 100 мг, то миллиэквиваленты нужно умножить на В, где

$$B = \frac{100}{\text{навеска в мг}}$$

Норма. У здоровых детей концентрация каждого из электролитов в поте не превышает 40 мэкв/л.

Диагностическое значение. Диагностика муковисцидоза у детей. В этих случаях концентрация электролитов колеблется от 50 до 180 мэкв/л.

Примечание. Параллельное определение в потовой жидкости Na и Cl дает более надежные результаты. Разница между концентрациями Na и Cl в пробе не должна превышать 20 мэкв/л, в противном случае потовая проба повторяется.

7.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖЕЛЕЗОСВЯЗЫВАЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ СЫВОРОТКИ КРОВИ

Принцип. Исследуемую сыворотку выдерживают с раствором трехвалентного железа, при этом весь трансферрин насыщается. Избыток солей железа удаляют адсорбцией на карбонате магния и определяют содержание железа в надосадочной жидкости.

Реактивы. 1. Железо хлорное, 5 мг/мл, 2,42 г $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 100 мл 0,005N HCl.

2. Магния карбонат в порошке.

3. Реактивы, необходимые для определения сывороточного железа по описанному выше методу.

Ход определения. К 2 мл исследуемой сыворотки добавляют 4 мл раствора хлорного железа и тщательно перемешивают. Через 5 минут прибавляют порошок магния карбоната в объеме около 0,5 мл, встряхивают 10—15 секунд и центрифугируют. В надосадочной жидкости определяют железо. Полученный результат умножают на 3 (разведение сыворотки).

Норма. Железосвязывающая способность сыворотки у здоровых мужчин составляет 45—75 мкмоль/л; у здоровых женщин — 40—65 мкмоль/л.

Клинико-диагностическое значение. Железосвязывающая способность возрастает при железодефицитных состояниях, за счет увеличения общего количества трансферрина — белка транспортирующего железо в крови.

7.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЛИЯ В КРОВИ

В клинических лабораториях для определения содержания калия в цельной крови, плазме или форменных элементах наибольшее распространение получил метод пламенной фотометрии.

Глава 8

КЛИНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ (Арипов О.А.)

В клинической диагностике исследуется состав биологических жидкостей и тканей организма, распределение химических компонентов между органами и органеллами, процессы превращения веществ и их регуляция. При исследовании тех или иных параметров в биологических жидкостях следует помнить, что каждый отдельный определяемый показатель отражает функциональное состояние многих органов и тканей, а также собственную функцию в данной жидкости (транспортную, метаболическую, гомеостатическую, экскреторную и др.). Поэтому при интерпретации полученных результатов следует их рассматривать в свете одновременного действия многих факторов. Необходимо учитывать их колебания под действием внешних факторов (сезонность, влияние солнечной активности), зависимость от возраста, пола, характера питания, профессиональных особенностей и других факторов.

Рациональная тактика биохимического обследования основана на следующих принципах:

— лабораторные тесты, назначаемые обследуемому, должны соответствовать основной клинической цели обследования (диагностика, контроль за эффективностью лечения);

— наиболее приемлемой формой рационализации лабораторной диагностики являются конstellации лабораторных тестов для определенной патологии;

— назначение исследований остается прерогативой клинициста, однако лабораторные специалисты должны добиваться внедрения наиболее информативных тестов и их комбинаций.

Ниже приводятся комбинации лабораторных тестов наиболее показательные, на наш взгляд, для диагностики патологии внутренних органов.

ЗАБОЛЕВАНИЯ ПЕЧЕНИ

Современная лабораторная диагностика заболеваний печени основывается на комплексе клинико-биохимических, иммунологических, морфологических и инструментальных данных. Для оценки функционального состояния печени предложено большое количество тестов, отражающих участие печени в различных обменных процессах. Многогранность функций печени, необходимость учета нарушения каждой из них делают невозможным использование какого-либо одного «универсального» теста. Вследствие этого необходимо выбрать комплекс методик, являющийся наиболее информативным в условиях имеющейся патологии и фазы заболевания. При этом, несмотря на безусловную важность комплексного подхода, не следует излишне обременять ни больного, ни лабораторию. Сочетание тестов должно строго соответствовать клинической картине. Чтобы проследить за развитием процесса, это сочетание следует повторять не чаще, чем каждые 7 — 10 дней.

Функциональные пробы печени классифицируют по синдромному принципу. Выделяют следующие синдромы:

1) цитолитический, 2) синдром недостаточности печени, 3) мезенхимально-воспалительный, 4) холестатический, 5) синдром портокавального шунтирования печени (синдром «отключения печени»), 6) синдром регенерации и опухолевого роста.

1. *Цитолитический синдром* возникает вследствие нарушения структуры клеток печени, в первую очередь гепатоцитов. Нарушение целостности гепатоцитов может быть различной степени тяжести в зависимости от выраженности повреждения гепатоцитов — нарушения проницаемости наружной и внутренней мембран, наличия дистрофических изменений или некроза гепатоцитов. Отмечается повышение активности АЛТ, АСТ, ЛДГ и изоферментов ЛДГ₄, ЛДГ₅, фруктозо-1-фосфатаальдозы (Ф-1-ФА), сорбитолдегидрогеназы, альдозы, глутаматдегидрогеназы (ГлДГ). Выявляется гипербилирубинемия (за счет прямого билирубина). В сыворотке крови повышена концентрация цианокобаламина, железа.

2. *Синдром печеночной недостаточности* — любое нарушение функции печени без энцефалопатии. Изменение спектра белков сыворотки крови проявляется уменьшением уровня альбуминов. Однако, это не является правилом для заболеваний печени различной этиологии. При тяжелых хронических заболеваниях печени, особенно при циррозе, отмечается резкое снижение активности холинэстеразы. В случаях легких острых и хронических заболеваний печени закономерных изменений содержания холестерина нет. При среднетяжелых и тяжелых гепатитах, быстро прогрессирующих вариантах цирроза наблюдается снижение концентрации холестерина.

Выделительная функция печени оценивается бромсульфалеиновой пробой. При поражении печени процесс выделения бромсульфалеина удлиняется на 10—100% в зависимости от тяжести поражения печени. Диагностическое значение имеет снижение уровня фибриногена, протромбинового индекса, повышение количества билирубина.

3. *Мезенхимально-воспалительный (или иммуновоспалительный) синдром* обусловлен гистиолимфоплазмочитарной инфильтрацией портальных трактов и внутريدольковой стромы. Для диагностики его используется определение γ -глобулина сыворотки крови, IgA, IgG, IgM, осадочные реакции. При этом синдроме обнаруживается увеличение количества γ -глобулинов сыворотки крови, часто с гиперпротеинемией, повышение тимоловой и сулемовой проб, уровня IgG и IgM, гаптоглобина, оксипролина сыворотки и мочи, появление неспецифических антител, изменение реакции бластной трансформации лимфоцитов.

4. *Холестатический синдром* проявляется гипербилирубинемией, в основном за счет прямого билирубина, по-

вышением активности щелочной фосфатазы, γ -ГТП, содержания липидов (желчных кислот, холестерина, β -липопротеидов). Выраженность синдрома и указанных изменений зависит от длительности и степени билиарной обструкции.

5. Синдром портокавального шунтирования печени. Вещества, которые в норме поступают из кишечника в систему воротной вены и в печень, при развитии венозных коллатералей поступают в систему общего кровотока, минуя печень. Они имеют большое значение в развитии гепатаргии. Для диагностики портокавального шунтирования печени исследуют содержание аммиака в сыворотке крови, проводят определение фенолов, аминокислот (тирозина, фенилаланина, метионина, триптофана), жирных кислот с короткой цепью.

6. Синдром регенерации и опухолевого роста печени. Нормальную регенерацию печени и ее нарушение при опухолевом росте или внедрении в печень опухолевых клеток другого происхождения диагностируют с помощью исследования α -фетопротеина.

Программа лабораторной диагностики заболеваний печени включает следующие тесты.

Обязательные исследования:

В сыворотке крови: билирубин (общий, свободный и связанный), АЛТ, АСТ, тимоловая проба, ПТИ, ХЭ, ЩФ, холестерин, поверхностный антиген гепатита В (HBsAg) или маркер другого вида гепатита (А, С, Д, Е, G), общий белок и белковые фракции.

В моче: уробилин и желчные пигменты.

В кале: стеркобилин, реакция на скрытую кровь.

Дополнительные исследования:

В сыворотке крови: ЛДГ и ее изоферменты (ЛДГ₁, ЛДГ₂, ЛДГ₃), альдолаза общая и печеночная, сорбитолдегидрогеназа, γ -ГТП, медь, железо, церулоплазмин, бромсульфалеиновая проба, аммиак, α -фетопротеин, калий, натрий, IgA, IgM, IgG, антитела к антигену гепатита В, антитела гепатита А класса IgM, антитела к дельта-агенту, антимитохондральные антитела.

ХАРАКТЕРИСТИКА ОСТРЫХ ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТОВ

Вирусные гепатиты — группа инфекционных заболеваний, которые вызываются различными гепатотропными вирусами. Определение маркеров вирусов гепа-

тата относится к часто выполняемым иммунологическим исследованиям. В настоящее время идентифицированы следующие виды гепатита: А, В, С, D, E, F, G, TTV (вирус, передающийся при гемотрансфузиях). Краткая характеристика вирусов гепатитов приведена в таблице 8.1.

Таблица 8.1

Краткая характеристика вирусов гепатитов

Гепатит	Основные диагностические маркеры	Носительство	Хронизация	Передача вируса
А	IgM анти-ВГА; анти-ВГА Ag ВГА; РНК-ВГА	Нет	Нет	Фекально-оральная
В	HBsAg; HBeAg; IgM-HBc; анти-HBc; анти-HBe; анти-HBс; ДНК-ВГВ	Есть	до 5%	Парентеральная
С	анти-ВГС; IgM анти-HBc, РНК-ВГС	Есть	60—80%	Парентеральная
Д	IgM анти-ВГД; анти-ВГД, Ag ВГД; РНК-ВГД	Есть	15—20%	Парентеральная
Е	IgM анти-ВГЕ; анти-ВГЕ, Ag ВГЕ; РНК-ВГЕ	Нет	Нет	Фекально-оральная
F	Не определены	?	?	Парентеральная
G	РНК-HGV; анти-HGV	Есть	?	Парентеральная
TTV	ДНК-TTV	Есть	?	Парентеральная Фекально-оральная

Гепатит А. При гепатите А отсутствует бессимптомное носительство вируса и исключена возможность развития хронического гепатита. Единственным источником вируса является больной острым гепатитом А, что определяет важность ранней лабораторной диагностики острого периода заболевания. Наиболее информативным тестом считается определение IgM анти-ВГА, которые обязательно присутствуют в крови больного. Для их выявления применяются диагностические наборы для ИФА и РИА, выпускаемые отечественными и зарубежными фирмами.

Характеристика маркерного профиля ВГА приведена в таблице 8.2.

Маркеры вируса гепатита А

Маркеры	Антигены, антитела, их диагностическое значение
HAАg	Антиген гепатита А появляется в сыворотке крови в конце преджелтушного периода. Из-за кратковременности (1—2 неделя) пребывания в сыворотке крови для диагностических целей не используется.
Anti-HAV (общие)	Антитела к вирусу гепатита А появляются в начальной стадии инфекции. Могут сохраняться всю жизнь. Для диагностики не используются.
Anti-HAV IgM	Антитела к гепатиту А класса IgM появляются в начале клинических проявлений заболевания и сохраняются длительное время. Являются основным тестом специфической диагностики гепатита А. Указывают на иммунитет к ВГА. Свидетельствуют о перенесенной инфекции.
Anti-HAV IgG	Указывают на острую инфекцию ВГА. У многих больных исчезают в течение 3—6 месяцев после инфекции. Антитела к гепатиту А класса IgG для диагностики используются редко.

Гепатит В. В отличие от гепатита А, при гепатите В может происходить развитие хронического гепатита, цирроза и первичного рака печени. Кроме того, с наличием бессимптомного носительства вируса связаны трудности борьбы с этой инфекцией. О вирусоносительстве судят по обнаружению HBsAg. Наиболее приемлемым методом идентификации вирусов является ИФА. Расчеты, проведенные американскими исследователями (Отчет о заседании, организованном Комитетом по профилактике вирусных гепатитов, ВОЗ и Центром по борьбе с болезнями и их профилактике, «Профилактика и борьба с гепатитом В в странах центральной и восточной Европы и новых независимых государствах» Шиофок, Венгрия, 1996), свидетельствуют, что при применении РПГ в службе переливания крови количество не выявленных носителей вируса гепатита В составляло около 22%.

Лабораторная диагностика острого и хронического гепатита В включает в себя определение серологических маркеров инфицирования вирусом гепатита В — HBsAg, ДНК-ВГВ, HBeAg, IgM анти-HBc, анти-HBc, анти-HBe и анти-HBs. Характеристика маркерного профиля ВГВ приведена в таблице 8.3.

Маркеры вируса гепатита В

Маркеры	Антигены, антитела, их диагностическое значение
HBsAg	Поверхностный антиген гепатита В. Появляется в сыворотке крови при гепатите В в конце инкубационного периода, в острой и хронической стадии гепатита В. Выделяется у 55—70% больных гепатитом В в острой стадии.
Анти-HBs	Антитела к поверхностному антигену гепатита В. Рассматриваются как признак иммунитета и перенесенную в прошлом инфекцию.
HBcAg	Ядерный антиген гепатита В. В сыворотке крови больных с острой и хронической формами гепатита В отсутствует. В момент инфекции находится в печени.
Анти-HBc	Антитела к ядерному антигену. Надежный маркер острого вирусного гепатита В. Более высокие титры характерны при хроническом вирусном гепатите.
Ig M HBc	Антитела IgM к HBcAg. Определяются в течение 3—6 месяцев. Означают недавнюю инфекцию.
HBeAg	Антиген Е гепатита В. Является обязательным тестом для оценки инфицированности. Кровь, содержащая HBeAg, является высокоинфицированной. Коррелирует с репликацией вируса ГВ и означает высокую концентрацию HBV.
Анти-HBe	Антитела к антигену Е гепатита В. Эти антитела можно обнаружить в течение нескольких лет после гепатита В.
ДНК-п	ДНК полимеразы. Является надежным свидетельством инфекционного процесса, указывает на репликацию вируса. Исследование еще редко используется.
HBV-ДНК	ДНК вируса гепатита В. Присутствие ДНК вируса гепатита В в сыворотке крови свидетельствует о нормальной репликации вируса и является надежным показателем инфекционного процесса.

Последовательное их появление и исчезновение при остром и хроническом гепатите В позволяет судить о характере инфекционного процесса и активной репликации вируса гепатита В.

Gepatitis C. 60 — 80% случаев острого гепатита С заканчивается развитием хронического заболевания печени, которое в 15—20% переходит в цирроз, а у части больных — в первичный рак печени.

Основой лабораторной диагностики гепатита С служит выявление антител к ВГС и вирусной РНК (HCV RNA). Принципиальным является тот факт, что в процессе острого и хронического гепатита С, а также вирусносительства, в сыворотке крови не удается выявить антигены ВГС, в то время как антитела к ним присутствуют.

Hepatitis D. Дельта-вирус относится к дефектным вирусам. Для репликации и переноса он нуждается в помощи вируса В. Дельта-вирус сопутствует гепатиту В, значительно утяжеляя его и способствуя переходу в хроническую форму. Антитела к дельта-антигену в сыворотке здоровых людей отсутствуют. У большинства обнаружение их означает наличие активной дельта-инфекции. Антитела к дельта-антигену класса IgM присущи только активной дельта-инфекции.

Hepatitis E. Считается, что гепатит Е эндемичен для стран тропического, субтропического поясов и Центральной Азии. Гепатит Е имеет сходные клинико-эпидемиологические характеристики с гепатитом А. Система лабораторной диагностики гепатита Е включает в себя следующие диагностические маркеры: IgM анти-ВГЕ; анти-ВГЕ, Ag ВГЕ; РНК-ВГЕ.

Hepatitis F. Система лабораторной диагностики этого вируса не разработана.

Hepatitis G. Исследования, проведенные в различных регионах мира, продемонстрировали широкое распространение гепатита G. Основным методом лабораторной диагностики гепатита G — ПЦР.

Hepatitis TTV. В 1997 году Т.Нишизава и соавт. (Nishizawa T., Okamoto H. et al., Biochem Biophys Res Commun., 1997, 241, p.92—97) опубликовали сообщение об идентификации нового гепатотропного одноцепочного ДНК вируса, выявленного у больных с посттранфузионным гепатитом. В качестве пока единственного теста для идентификации TTV применяется ПЦР.

Таким образом, современная лабораторная диагностика вирусных гепатитов включает в себя комплекс методов идентификации антигенов, антител и нуклеиновых кислот различных вирусов гепатита, что очень важно для определения прогноза заболевания и, в особенности (при количественном определении вирусных нуклеиновых кислот) — для оценки эффективности специфической противовирусной терапии.

Острые вирусные гепатиты проявляются поражением как гепатоцитов, так и мезенхимальных элементов печени. Для преджелтушного периода характерна гиперферментемия. В моче увеличено содержание уробилина. В конце преджелтушного периода в моче появляется билирубин. У 50% больных увеличены показатели тимоловой пробы. У части больных повышено содержание сывороточного железа, снижен уровень проконвертина и протромбина.

Для желтушного периода характерно резко выраженное повышение концентрации билирубина, активности амино-

трансфераз, снижение уровня протромбина, увеличение показателей тимоловой пробы, количества γ -глобулинов.

В таблице 8.4. приведены критерии оценки тяжести течения острого гепатита (Хазанов А.И., 1988).

Таблица 8.4

Ориентировочные критерии оценки тяжести течения острого вирусного гепатита

Течение вирусного гепатита	Показатели нарушения функции	Гипербилирубинемия
Легкое	Как правило, нормальные, несколько снижен уровень проконвертина	До 102,6 мкмоль/л
Среднетяжелое	Несколько снижены: проконвертин и холинэстераза, менее постоянно — холестерин и протромбиновый индекс.	102,6—205,2 мкмоль/л
Тяжелое	Снижены: уровень проконвертина (на 50%), значительно активность холинэстеразы	Выше 205,2 мкмоль/л

Острый алкогольный гепатит. Основными лабораторными показателями заболевания являются: гиперхолестеринемия, повышение уровня β -липопротеидов, гиперферментемия (но менее выраженная, чем при вирусном гепатите) с превалированием АСТ над АЛТ, повышение содержания мочевой кислоты в сыворотке крови.

Острый лекарственный гепатит характеризуется повышением активности аминотрансфераз с преобладанием активности АЛТ, высокой активностью щелочной фосфатазы и γ -глутамилтрансферазы.

Таблица 8.5

Дифференциально-диагностические признаки вирусного, алкогольного и лекарственного острых гепатитов*

Биохимический тест	Острый гепатит		
	вирусный	алкогольный	лекарственный
Показатели цитолиза (аминотрансфераза и др.)	+++	+	+До++
Показатели мезенхимально-воспалительного синдрома (γ -глобулин, тимоловая проба)	++	++	+
Показатели холестатического синдрома (щелочная фосфатаза, γ -глутамилтрансфераза и др.)	+	++	++
Гиперхолестеринемия	+	+++	+
Мочевая кислота	+	+++	+
Маркеры вирусов	+++	—	—

*Изменения показателя: + повышен, ++ значительно повышен, +++ резко повышен, — отсутствует.

Хронические гепатиты

Хронический персистирующий гепатит. При биохимическом исследовании сыворотки крови определяется умеренная гиперферментемия, часто положительная бромсульфалеиновая проба, реже снижение содержания альбумина и холинэстеразы, увеличение концентрации γ -глобулина, показателей тимоловой пробы. Количество билирубина в сыворотке крови умеренно повышено.

Хронический активный гепатит. В сыворотке крови увеличена концентрация билирубина, повышена активность ЩФ, аминотрансфераз, но никогда она не достигает такой величины, как при остром вирусном гепатите (более чем в 10 раз).

Обнаруживаются признаки мезенхимально-воспалительного синдрома: повышение показателей тимоловой пробы, снижение сулемовой, гипер- γ -глобулинемия (как правило, резко выраженная), положительный ревматоидный фактор. Признаки гепатодепрессии — уменьшение содержания холинэстеразы, альбумина, положительная бромсульфалеиновая проба.

Значительно изменяются иммунологические показатели: повышается активность IgA, IgM, IgG. Необходимо исследовать маркеры вирусного поражения.

Циррозы печени. Цирроз печени (мелкоузловой, крупноузловой) может быть в неактивной и активной фазе. От активности и степени ее выраженности зависит прогноз заболевания. Биохимические показатели активности и степени проявляются выраженностью цитолитического синдрома, мезенхимально-воспалительного синдрома (гипергаммаглобулинемия, снижение показателей сулемовой и повышение показателей тимоловой проб), гипериммуноглобулинемией, билирубинемией.

Печеночно-клеточная недостаточность (гипатаргия, кома)

Для печеночно-клеточной недостаточности характерно снижение протромбинового индекса ниже 60%, содержания проконвертина до 40% и ниже, умеренное уменьшение количества фибриногена, снижение активности холинэстеразы, концентрации холестерина, уровня альбумина.

О нарушении углеводного обмена свидетельствует увеличение содержания пировиноградной кислоты до 190—290 мкмоль/л в сыворотке крови, а также понижение концентрации глюкозы у некоторых больных.

Как правило, отмечается значительная гипербилирубинемия с преимущественным увеличением конъюгированной формы билирубина, которая указывает на неблагоприятный прогноз. Выражен цитолитический синдром — наблюдается значительное повышение активности аминотрансфераз, особенно АЛТ. Значительное снижение активности ферментов на фоне нарастающей энцефалопатии имеет плохое прогностическое значение, так как указывает на уменьшение продукции ферментов.

Важным является определение уровня аммиака, общего аминного азота, фенолов и индикана, концентрации аминокислот (аминограмма сыворотки крови), т.е. продуктов распада белка. Тяжесть состояния больных с гепатаргией часто не коррелирует со степенью изменений биохимических показателей печени.

Опухоли печени

При первичном раке печени необходимо исследование α -фетопротейна. Диагностическое значение теста зависит от способа определения этого гликопротеида: методом преципитации в агаре он обнаруживается в сыворотке крови у 50—55% больных, методом встречного электрофореза — у 60—65%, радиоиммунным иммунофлюоресцентным методами — у 80—85% больных первичным раком печени. При успешном оперативном лечении (удалении опухоли) концентрация α -фетопротейна в сыворотке крови снижается до нормы ($5,9 \pm 0,6$ МЕ).

Наряду с гиперальфа-фетопротемией отмечается увеличение активности ферментов, реагирующих на развитие опухоли печени, — γ -глутамилтрансферазы, глутаматдегидрогеназы, ЩФ, ЛДГ, АЛТ, АСТ, которые повышены у 88—92% больных. Почти у 50% больных повышается концентрация билирубина, снижается протромбиновая активность, у 70—80% больных оказываются положительными тимоловая и сулемовая пробы.

Заболевания желчного пузыря и желчных протоков

Обязательные исследования:

В сыворотке крови: билирубин (общий, свободный, связанный), холестерин, фосфолипиды, триглицериды, β -ЛП, активность ферментов холестатических (ЩФ, 5-нуклеотидаза, гаммаглутамилтранспептидаза), индикаторных (АСТ, АЛТ), белковые фракции, СРБ.

В моче: уробилин, билирубин.

В кале: стеркобилин.

Дополнительные исследования:

В крови: фибриноген, сиаловые кислоты, иммуноглобулины.

В желчи: желчные кислоты, общие липиды, холестерин, билирубин, фосфолипиды, белки, иммуноглобулины.

Дискинезия желчных путей

При биохимическом исследовании крови существенных изменений нет. Гиперкинетическая форма дискинезии сопровождается повышением в желчи содержания желчных кислот (в среднем в 1,4 раза) при неизменном их соотношении и увеличением фосфолипидов в 1,3 раза. Концентрация других компонентов желчи практически не изменяется.

При гипокинетической форме дискинезии содержание желчных кислот в желчи уменьшается в 1,3, а фосфолипидов — в 1,4 раза, уровень холестерина в желчи из желчного пузыря повышается.

Хронический бескаменный холецистит в фазе обострения

Наблюдается повышение острофазовых показателей в крови: С-реактивного протеина, α_2 -глобулинов, сиаловых кислот, фибриногена, увеличение содержания холестерина, фосфолипидов, триглицеридов, гиперферментемия — незначительное повышение активности трансфераз. Существенным диагностическим признаком является изменение мицеллярных свойств с прогрессирующим снижением концентрации холевой и других желчных кислот, билирубина, фосфолипидов, повышением количества холестерина и общих липидов.

Хронический холангит в фазе обострения

Наряду с острофазовыми показателями воспаления (α_1 - α_2 -глобулинемия, фибриногемия, появление С-реактивного протеина, повышение уровня сиаловых кислот), наблюдается гиперферментемия за счет роста активности как индикаторных (аспартатаминотрансфераза, аланинаминотрансфераза), так и холестатических (щелочная фосфатаза, лейцинаминопептидаза, гаммаглутамилтранспептидаза) ферментов, преходящая билирубинемия, с преимущественным увеличением содержания связанного билирубина, возрастает количество холестерина в сыворотке крови. При исследовании мочи определяется положительная ре-

акция на билирубин. Возможно снижение концентрации стеркобилина в кале. Изменяются также биохимические свойства желчи, продуцируемой в печени, повышается содержание липидов, снижается концентрация фосфолипидов, желчных кислот, билирубина, иммуноглобулина А.

Желчнокаменная болезнь. Значительно изменяются биохимические свойства желчи: уменьшается концентрация желчных кислот с одновременным их дисбалансом, увеличиваются содержание белков, билирубина и липидов, индекс литогенности желчи.

При исследовании крови определяется повышение уровня триглицеридов, β -липопротеидов, холестерина.

ЗАБОЛЕВАНИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ

Гипертоническая болезнь, симптоматические артериальные гипертензии.

Обязательные исследования в крови: креатинин, мочевина, остаточный азот, электролиты (калий, натрий, хлор, кальций), глюкоза, холестерин, триглицериды, липопротеиды, общий белок и белковые фракции.

Исследование мочи на наличие белка, глюкозы.

Дополнительные исследования крови: активность ренина, ангиотензин, ПТИ, фибриноген, фибринолитическая активность, мочевая кислота, рН, альдостерон, адреналин и норадреналин, жирные кислоты.

В моче: ванилилминдальная кислота, 17-оксикортикостероиды, альдостерон, катехоламины, калий, натрий.

Гипертоническая болезнь.

Для диагностики гипертонической болезни большое значение имеют хорошо собранный анамнез и клинические исследования. Они помогают определить план лабораторного обследования.

Цель лабораторных исследований — выявление у больных возможной причины повышения артериального давления, степени повреждения и нарушения функции различных органов.

При различных формах гипертонической болезни отмечаются особенности биохимических показателей:

— гиперадренергической форме свойственны повышение концентрации норадреналина и активности дофамин- β -гидроксилазы в плазме крови, умеренное увеличение экскреции норадреналина с мочой;

— гипоренинной, или объем (натрий) зависимой, форме присущи низкая активность ренина менее 1,3 нг/Ал/мг ч и повышение содержания натрия в плазме крови;

— гиперренинная (ангиотензин-зависимая) форма характеризуется активностью ренина в плазме крови, превышающей 4,5 нг/Ал/мл ч;

— злокачественной (быстро прогрессирующей) форме свойственно тяжелое поражение почек, обуславливающее увеличение концентрации азота мочевины, креатинина, остаточного азота.

Уже на ранних этапах заболевания отмечается некоторое повышение содержания общего белка в плазме крови, протеинограмма остается нормальной. Липиды не имеют отклонений от нормы, если гипертензия наблюдается не более 2 лет. В последующем характерна гиперлипидемия за счет холестерина, триглицеридов, β -ЛП даже у больных без явных признаков атеросклероза. С утяжелением стадии нарастают признаки гиперкоагуляции и угнетения фибринолиза.

Симптоматические артериальные гипертензии.

Феохромоцитомы. В межприступный период признаками общего гиперметаболизма являются: увеличение в плазме крови уровня свободных жирных кислот, метадреналина ванилилминдальной кислоты, гипергликемия, глюкозурия, повышение экскреции катехоламинов и их метаболитов в моче.

После криза характерно резкое возрастание экскреции катехоламинов и их дериватов.

Таблица 8.6

Дифференциально-диагностические признаки низкоренинной гипертензии и первичного альдостеронизма

Признак	Низкоренинная гипертензия	Первичный альдостеронизм
<i>Плазма крови</i>		
Активность ренина	Подавлена	Подавлена
Концентрация альдостерона	Нормальная	Высокая
Концентрация калия	Нормальная (=4,2 ммоль/л)	Около 2,5 ммоль/л при аденоме и 3,7 ммоль/л при гиперплазии коркового вещества надпочечников.
Концентрация натрия	Нормальная	Часто повышена
Концентрация хлора	Нормальная	Повышена (32—35 ммоль/л)
pH крови	Нормальный	7,45 (алкалоз)
<i>Моча</i>		
Суточная экскреция альдостерона	Нормальная	Высокая (36—72 мкг/сут)
Величина калийуреза	Нормальная	Больше 30 ммоль/сут

Первичный альдостеронизм (синдром Конна). При исследовании суточного выделения калия и натрия с мочой с подсчетом коэффициента Na/K. При синдроме Конна он более-2.

При приеме 100 мг гипотиазида выявляется гипокалисемия. Отмечается выраженный алкалоз, повышение содержания альдостерона в суточной моче, снижение активности ренина в плазме крови.

Болезнь и синдром Иценко — Кушинга характеризуется увеличением содержания глюкозы в крови, экскреции 17-кетостероидов и 17-оксикортикостероидов в суточной моче при монотонном повышении уровня этих гормонов в крови.

Атеросклероз

Обязательные исследования:

В сыворотке крови: общие липиды, холестерин (свободный, этерифицированный и общий), фосфолипиды, триглицериды, липопротеиды (α -липопротеиды, β -липопротеиды, пре- β -липопротеиды и хиломикроны), соотношение лицетина к холестерину, протеинограмма (общий белок и белковые фракции) лицетин-ацилтрансфераза, мочева кислота.

Дополнительные исследования:

В сыворотке крови: протромбин, фибриноген, фибриноген Б, адгезия тромбоцитов, толерантность плазмы к гепарину и фибринолитическая активность крови, активность VIII, XI, XII, XIII плазменных факторов, свободного гепарина.

В слюне: окислительно-восстановительный потенциал.

Характерные изменения показателей: в плазме крови повышение общего количества липидов (>7 г/л), концентрации свободного ($>2,3$ ммоль/л), этерифицированного ($>3,38$ ммоль/л) и общего холестерина ($>6,5$ ммоль/л), содержания триглицеридов (>2 ммоль/л), снижение соотношения фосфолипиды/холестерин ($<1,5$).

В диагностике атеросклероза имеет значение типирование гиперлипопротеидемий. Необходимы исследования в динамике для исключения ошибочной диагностики. Для ранней диагностики атеросклероза наибольшее значение имеет выявление биохимических изменений. Основными являются показатели липидного обмена: повышение содержания холестерина свыше 2,2 г/л, β -липопротеидов — свыше 6 г/л, содержания в них холестерина свыше 1,5 г/л. Повторное выявление этих отклонений ука-

зывает с высокой вероятностью на доклинический период атеросклероза. Снижение в крови соотношения фосфолипиды/холестерин обусловлено обычно повышением уровня холестерина.

Неспецифические изменения показателей. К неспецифическим, но рано наступающим при атеросклерозе изменениям относят снижение в крови активности окислительно-восстановительных ферментов — каталазы, пероксидазы, альбуминов, повышение в крови содержания мочевой кислоты и ее соотношения с холестерином, изменение окислительно-восстановительного потенциала слюны.

Отклонения от нормы показателей свертывания крови почти закономерно сочетаются с повышением в крови уровня β -липопротеидов. Наиболее информативными признаками изменения свертывания крови являются увеличение адгезии тромбоцитов, активности факторов VIII, XI, XIII в плазме крови, толерантности плазмы к гепарину, снижение фибринолитической активности крови.

Ишемическая болезнь сердца

Обязательные исследования:

В сыворотке крови: ферменты — креатинфосфокиназа и ее МВ-изоферменты, аминотрансферазы, особенно АСТ, ЛДГ и ее фракции ЛДГ₁ и ЛДГ₂; С-реактивный протеин, миоглобин, общий белок и белковые фракции, в том числе фибриноген, серомукоид, сиаловые кислоты, дифениламиновая проба.

Дополнительные исследования:

В сыворотке крови: фенотипирование липидемий по холестерину и триглицеридам; коагулограмма, креатинин, остаточный азот, глюкоза, миоглобин; иммуноглобулины.

В моче: глюкоза, белок.

Стенокардия

Биохимические показатели: белковые фракции, фибриноген, С-реактивный протеин, сиаловые кислоты, трансаминазы, ЛДГ и ее изоэнзимы, фибриноген, протромбиновый индекс.

Атеросклеротический кардиосклероз

При исследовании биохимических показателей не выявляется специфических изменений, кроме свойственных атеросклерозу.

Острый инфаркт миокарда

Наиболее широкое распространение для диагностики острого инфаркта миокарда получило исследование ферментов АСТ, ЛДГ, креатинфосфокиназы, а также концентрации миоглобина в сыворотке крови.

Таблица 8.7

Сроки наибольшей информативности ферментных тестов при инфаркте миокарда (Комаров Ф.И. и др., 1976)

Фермент	Ферментный показатель			
	Начало повышения активности	Максимальная активность	Восстановление нормальной активности	Степень максимального увеличения активности
Креатинкиназа	2—4 ч	12—24 ч	1—4 дня	50 раз
Аспартатамино- трансфераза	6—12 ч	24—36 ч	3—5 -"	15—30 раз
Аланинамино- трансфераза	12—24 ч	24—48 ч	7—14 -"	15—20 раз
Лактатдегидрогеназа	16—24 ч	36—72 ч	10—12 -"	20 раз

Таблица 8.8

Активность АСТ, КФК, ЛДГ в разные сроки инфаркта миокарда (ИМ) и при других заболеваниях сердца (Дочкин И.И., 1982)

Заболевания и изменение активности при ИМ	АСТ	КФК	КФК-МВ	ЛДГ
Инфаркт миокарда				
Начало повышения	(++) 6—12 ч	(++) 3—5 ч	(++) 3—5 ч	(++) 6—12 ч
Максимальная активность	(+++) 24—36 ч	(+++) 12—24 ч	(+++) 12—18 ч	(+++) 36—48 ч
Возврат к нормальным показателям	4—5-й день	2—5-й день	36—48-й час и позже	10—12-й день
Стенокардия	Нормальная или (±)	Нормальная или (±)	Нормальная	Нормальная или (±)
Миокардит	(+) держится длительно	(+) держится длительно	(+) держится длительно	(+) держится длительно
Миокардиодистрофия	Нормальная или (±)	Нормальная или (±)	Нормальная	Нормальная или (±)

Повышение активности АСТ в сыворотке крови можно определить через 8—12 ч после начала ангинозного приступа, максимальное повышение активности — на 2-е сутки, снижение активности до нормы на 3-и и 7-е сутки.

Активность ЛДГ в сыворотке крови увеличивается через 24—48 часов от начала заболевания и достигает максимума на 3—5-е сутки. Уменьшается до нормы на 8—15 сутки. Повышение активности креатинфосфокиназы отмечается через 6—8 ч заболевания, достигает максимума к концу 1-х суток, постепенно нормализуется к 4-м суткам.

Перечисленные тесты обладают невысокой специфичностью. Для уточнения диагностики в некоторых случаях необходимо определить активность не одного, а нескольких ферментов. Очень важно исследовать изоэнзимы лактатдегидрогеназы и креатинфосфокиназы.

При остром инфаркте миокарда в сыворотке крови в первую очередь повышается активность ЛДГ₁ и лишь позже общая ЛДГ.

МВ-фракция креатинфосфокиназы определяется только в сердце, в других органах не содержится. Увеличение активности этого изофермента является абсолютным показателем повреждения миокарда. С помощью исследования креатинфосфокиназы можно определить величину некроза миокарда в грамм-эквивалентах креатинфосфокиназы. Один грамм-эквивалент креатинфосфокиназы — это такое количество ткани, из которого выходит такое же количество фермента, как из 1 г полностью некротизированного миокарда.

При остром инфаркте миокарда повышается титр миокардиальных антител типа IgM и IgG в сыворотке крови.

Исследование ферментативной активности сыворотки крови является важным вспомогательным методом распознавания инфаркта миокарда. Некоторые авторы сравнивают значение этого исследования с электрокардиографией при инфаркте миокарда. Однако отсутствие повышения активности ферментов в сыворотке крови не исключает инфаркта миокарда, так же, как наличие этого изменения не всегда подтверждает диагноз. Для эффективной диагностики необходимо сопоставление результатов исследования ферментативной активности с клиническими данными и результатами других методов исследования, прежде всего электрокардиографии.

При инфаркте миокарда происходят изменения в крови, отражающие нарушения углеводного, белкового, липидного обменов, кислотно-основного состояния, элект-

ролитного баланса, гормонального профиля. Эти изменения неспецифичны и не имеют значения для диагностики инфаркта миокарда.

В острой фазе инфаркта миокарда возможна гипергликемия, а иногда и гликозурия. Гипергликемия наблюдается в первые 5—10 дней и затем исчезает. В крови уменьшается количество альбуминов, увеличивается содержание α_2 -глобулинов, γ -глобулинов, фибриногена. На 2-е — 3-и сутки обнаруживается положительная реакция на С-реактивный протеин, которая держится в течение 1—2 недели, то же относится к серомукоиду.

Нередко повышается уровень остаточного азота в крови на протяжении первых 2 недель. Причиной азотемии являются различные факторы: нарушения белкового обмена, выход в кровь из тканей азотсодержащих продуктов, изменение азотвыделительной функции почек вследствие нарушения кровообращения.

Изменения электролитного баланса касаются в основном калия, натрия, магния, хлора. При неосложненном инфаркте миокарда эти изменения обычно незначительны.

ЗАБОЛЕВАНИЯ МИОКАРДА

Значительное количество биохимических исследований при заболеваниях миокарда проводится в целях их дифференциальной диагностики с первичным ревмокардитом, ишемической болезнью сердца.

Обязательные исследования:

В сыворотке крови: общий белок и белковые фракции, ревматоидный фактор, С-реактивный белок, гликопротеиды и их компоненты (серомукоид, сиаловые кислоты, гаптоглобин), ферменты (АСТ, АЛТ, ЛДГ, фракции ЛДГ₁, ЛДГ₂, креатинфосфокиназа, холинэстераза), электролиты (калий, кальций и натрий хлор), иммуноглобулины, циркулирующие иммунные комплексы, серологические реакции: антистрептолизинный титр (АСЛ-0), антистрептокиназный титр (АСК), антистрептогиалуронидазный титр (АСГ).

В моче: Суточная экскреция 17-кетостероидов, катехоламинов, ДОФА.

Дополнительные исследования. В сыворотке крови: церулоплазмин, гексозамины, фруктозоdifосфатальдолаза, малатдегидрогеназа, концентрация молочной и пировиноградной кислот, показатели КЩС (рН), 11-оксикетостероиды, серотонин, холинэстераза.

Миокардит

Биохимические исследования при миокардите информативны в период выраженного повреждения миокарда. В острый период заболевания выявляется повышение активности миокардиальных ферментов — МВ-изоферменты креатинфосфокиназы, АСТ, 1-й и 2-й фракции изоферментов ЛДГ и нарушение их соотношения (ЛДГ₁, ЛДГ₂).

В сыворотке крови могут обнаруживаться С-реактивный белок, увеличение количества гликопротеидов (положительная реакция на серомукоид, сиаловые кислоты, ДОФА), изменение белкового спектра крови, снижение альбумино-глобулинового коэффициента.

Для иммунного происхождения воспалительных изменений миокарда характерно увеличение концентрации IgA и IgG в сыворотке крови, повышенный титр циркулирующих иммунных комплексов и противомиокардиальных антител, положительные реакции дегрануляции тучных клеток с антигенами миокарда и стрептококка. В отличие от ревматизма при миокардите не изменена реакция спонтанного розеткообразования.

Биохимические исследования при диагностике миокардита не играют решающей роли, многие из результатов могут быть нормальными или близкими к норме. Эти исследования используются для определения активности миокардита и в ряде случаев помогают установить природу заболевания. Так, увеличение содержания сиаловой кислоты отмечается при тяжелом течении миокардита и имеет диагностическое значение при отсутствии сопутствующей инфекции. Это же относится к С-реактивному белку. Более характерным показателем является увеличение уровней α_2 и γ -глобулинов, хотя они не достигают такой степени, как при ревматическом миокардите.

Активность АСТ отражает степень поражения кардиомиоцитов и представляет собой специфический признак активности миокардита. Особенно важное значение имеет повышение активности ЛДГ₁ и МВ-изоферментов креатинфосфокиназы. Увеличение активности этих ферментов при миокардите, как правило, ниже, чем при крупноочаговом инфаркте миокарда, но сохраняется в течение более длительного времени.

Противомиокардиальные антитела встречаются только при тяжелом течении миокардита.

Миокардиопатия

Международный медицинский термин «миокардиопатия» является синонимом предложенного Г.Ф.Лангом термина «миокардиострофия». Г.Ф.Ланг назвал миокардиострофией результат воздействия на миокард общих нарушений обмена веществ в организме, различных внесердечных заболеваний, расстройств нейрогуморальной и эндокринной регуляций.

Существует разнообразие форм миокардиопатий и причин их развития, но для них имеется ряд общих биохимических признаков заболевания, связанных с нарушением белкового, углеводного, электролитного обмена, повреждения кардиоцитов. Обнаруживаются также специфические биохимические изменения, зависящие от причины развития заболевания.

При миокардиопатии содержание белка в сыворотке крови в пределах нормы, иногда отмечается небольшое увеличение концентрации α_2 и γ -глобулинов. Углеводосодержащие белки — сиаловые кислоты и мукопротеиды, как правило, тоже остаются в пределах нормы, выявляется снижение или повышение количества калия, кальция в сыворотке крови.

При тонзиллогенной миокардиопатии умеренно увеличены содержание стрептококковых антител и антистрептолизинный титр.

У спортсменов при миокардиострофии показатели суточной экскреции катехоламинов увеличены в начальных стадиях заболевания и уменьшаются с нарастанием степени дистрофии. Отмечается тенденция к снижению ацетилхолина и усилению активности ацетилхолинэстеразы. Уровень электролитов не изменяется.

Гипокалиемия развивается при миокардиострофии, обусловленной первичным альдостеронизмом, длительным лечением АКТГ, в некоторых случаях болезни Иценко—Кушинга.

Муковисцидоз

Обязательные исследования: в поте натрий и хлориды (повышены).

В кале: нейтральный жир.

В дуоденальном содержимом: активность ферментов (понижена).

Ревматизм

Обязательные исследования.

В крови: С-реактивный белок, общий белок, белковые фракции, альбумино-глобулиновый коэффициент, дифениламиновая проба, гликопротеиды и их компоненты (серомукоид, гаптоглобин, церулоплазмин, сиаловые кислоты, гексозоамины); серологические реакции — антистрептолизинный титр (АСЛ-О), антистрептокиназный титр (АСК), антистрептогиалуронидазный титр (АСГ), антидезоксирибонуклеазный титр (АДН), ревматоидный фактор.

В клинике используются и другие методы иммунологического исследования. Проводится определение концентрации иммуноглобулинов (IgA, IgG, IgM). Можно исследовать иммуноглобулинсвязывающие антитела (IgA-АТ, IgG-АТ, IgM-АТ) с различными антигенами (стрептококковыми, тканевыми и др.). Обнаруживается снижение содержания IgA-АТ к печени и почке, IgG-АТ к печени, IgM-АТ к миокарду, печени, почке. Такие изменения не встречаются при других заболеваниях.

У больных ревматизмом обнаруживается угнетение Т-системы иммунитета: значительное уменьшение количества Т-лимфоцитов в периферической крови, снижение их функциональной активности, которое проявляется положительной реакцией спонтанного розеткообразования (Е-РОК), реакция бласттрансформации лимфоцитов с фитогемагглютинином (РБТЛ-ФГА), реакции ингибции миграции лейкоцитов с антигенами стрептококка (ИМЛ-С) и миокарда (ИМЛ-М).

Дополнительные исследования.

В крови: формоловая проба, латекс-тест, коагулограмма: протромбиновый индекс, время свертывания крови, фибриноген, толерантность к гепарину. Биохимические показатели крови изменяются в зависимости от степени активности ревматического процесса (табл. 8.9).

В активной фазе ревматизма имеют диагностическое значение изменения свертываемости крови и фибринолиза. Эти изменения выражаются в нарушении гемокоагуляционного гомеостаза и являются чаще всего признаками различных фаз острого или хронического диссеминированного или локализованного внутрисосудистого свертывания крови.

Критерии активности ревматического процесса

Тест	Степень активности ревматического процесса		
	III	II	I
Определение С-реактивного протеина	+++ , ++++	От + До +++	+—
Содержание α_2 -глобулина	23—25%	21—23%	Норма или немного повышено
Количество серомукоида	0,8—2,0 ЕД	0,3—0,8 ЕД	То же
Дифениламиновая реакция	0,350—0,500	0,250—0,300	В пределах высшей границы нормы
Серологические титры (АСЛ-), АСК, АСГ)	Выше нормы в 2—3 раза	Выше нормы в 1,5—2 раза	В пределах высшей границы нормы или немного повышены

Диагностика облегчается при отсутствии недостаточности кровообращения. Большое значение имеет определение содержания в сыворотке крови плазминогена и его быстрых проактиваторов. Изменение этих показателей является более специфичным для ревматического процесса и не зависит от сердечно-сосудистой недостаточности и гормонально-медикаментозного лечения.

Диффузные болезни соединительной ткани

Обязательные исследования.

В крови: общий белок и белковые фракции в сыворотке крови, альбуминоглобулиновый коэффициент, С-реактивный белок, иммунологические показатели, ревматоидный фактор, LE-клетки, антинуклеарные антитела (АНА), иммунные комплексы.

Дополнительные исследования.

В крови: гликопротеиды и их компоненты (серомукоид, гаптоглобин, сиаловые кислоты, гексозамины, церулоплазмин), формоловая реакция, фибриноген, коагулограмма, билирубин, креатин, креатинин, активность креатинфосфокиназы, фруктозодифосфат-альдолазы, лактатдегидрогеназы, аминотрансфераз.

Системная красная волчанка (СКВ)

Наиболее ценный скрининговый тест для диагностики СКВ — определение антинуклеарных антител (АНА),

(табл. 8.10). LE-клеточный феномен обнаруживается у 80% больных с системной патологией. Одним из характерных признаков СКВ является наличие большого количества циркулирующих антител.

Снижение уровня сывороточного комплемента при динамическом наблюдении больного может быть первым признаком поражения почек при СКВ.

Таблица 8.10

Лабораторная характеристика степеней активности СКВ

Показатель	Степень активности		
	III	II	I
Фибриноген, г/л	6 и более	5	5
Альбумины, %	30—35	40—45	48—60
Глобулины, %			
α ₂ -глобулины	13—17	11—12	10—11
γ-глобулины	30—40	24—25	20—23
Е-клеточный феномен	5:1000 лейкоцитов и более	1:2000 лейкоцитов	Единичные или отсутствуют
АНА и НДНК (титры)	Высокие	Средние	Низкие
Тип свечения	Краевой	Гомогенный и краевой	Гомогенный

Антитела к двуспиральной ДНК, к односпиральной ДНК, к нуклеопротеиду (LE-клеточный феномен), к ядерной РНК, к гистону, к комплексам гистон-ДНК, к ядерному гликопротеиду (Sm-антиген). Антицитоплазматические антитела к РНК, митохондриям, рибосомам и т.д. Ревматоидные факторы IgM или IgG. Криоглобулины. Другие антитела. Антилимфоцитарные антитела. Ложноположительная реакция Вассермана. Антинейронные антитела. Циркулирующие антикоагулянты. Антивирусные антитела. Антитела к коллагену. Органоспецифические антитела. Антитела к эритроцитам, лейкоцитам, тромбоцитам. Лимфоцитотоксические антитела.

У большинства больных наблюдается низкое содержание С-реактивного белка наряду с повышенной концентрацией α₂- и γ-глобулинов и фибриногена.

При аутоиммунной гемолитической анемии определяются билирубинемия за счет увеличения количества свободного билирубина, прямой и непрямой тесты Кумбса, уробилинурия. При волчаночном нефрите появляется про-

теинурия, разной степени выраженности, изменения в осадке мочи.

Дерматомиозит и полимиозит

Острое течение дерматомиозита сопровождается уменьшением содержания альбумина и увеличением концентрации α_2 - и γ -глобулинов. При дерматомиозите выявляются ревматоидный фактор, LE-клетки, антитела к миоглобину, ряд преципитирующих антител к экстрагируемым компонентам ядра (антитела So — 1, PM, Mi и Ki).

При полимиозите повышается активность ферментов креатинфосфокиназы, альдозазы, лактатдегидрогеназы, аминотрансфераз. Меньшую диагностическую ценность представляет увеличение концентрации креатина по сравнению с нормой в крови и в моче.

Ревматоидный артрит

В активной фазе заболевания повышаются все показатели, характерные для острого воспаления: содержание фибриногена, гаптоглобина, С-реактивного белка, α_2 -глобулина, гликопротеидов и их компонентов.

У 80% больных ревматоидным артритом выявляется ревматоидный фактор IgM (латекс-тест и реакция агглютинации, реакция с эритроцитами барана). Современные методы дают возможность определять ревматоидные факторы IgG и IgA. Прослеживается положительная корреляция титра ревматоидного фактора с тяжестью артрита и развитием органных проявлений. Обнаружение при типичном ревматоидном артрите АНА или LE-клеток — прогностически неблагоприятный фактор, свидетельствующий о возможном развитии системных проявлений. Тесты на АНА и LE-клетки положительны приблизительно у 20% больных с серопозитивным ревматоидным артритом с системными проявлениями.

Иммунные комплексы определяются у 75% больных ревматоидным артритом при его тяжелом течении с развитием васкулита и других внесуставных проявлений.

Ревматоидные факторы обнаруживаются и в синовиальной жидкости, в некоторых случаях даже раньше, чем в сыворотке крови.

ЗАБОЛЕВАНИЯ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ

Бронхиальная астма

Обязательные исследования.

В сыворотке крови: белковые фракции, дифениламинная реакция, сиаловые кислоты, глюкоза, иммунологические исследования — Т- и В-лимфоциты, реакция бласттрансформации лимфоцитов.

Дополнительные исследования.

В сыворотке крови: 11-оксикетостероиды.

В плазме крови: транскортин (кортикостероидсвязывающий глобулин).

В моче: 17-оксикетостероиды, эстрогены и прогестерон.

Биохимические изменения обусловлены особенностями патогенеза бронхиальной астмы у каждого больного. При атопической бронхиальной астме определяются прямой и непрямой базофильный тест (тест Шелли), реакция бласттрансформации лимфоцитов.

При инфекционно-зависимой бронхиальной астме обнаруживаются увеличенный уровень дифениламина, повышение активности кислой фосфатазы, содержания глобулинов, α_2 - и γ -глобулиновых фракций, снижение концентрации альбуминов в сыворотке крови.

О дисгормональном механизме бронхиальной астмы свидетельствуют изменения глюкокортикоидной активности надпочечников, а у женщин и нарушения гормональной активности яичников. Проводят определение содержания суммарных 11-оксикетостероидов, их свободной и связанной фракций, уровня транскортина в плазме крови, пробу с введением АКТГ, которая оценивается по изменению экскреции 17-оксикетостероидов с мочой после введения АКТГ. Уменьшение концентрации свободной и увеличение уровня связанной фракций при нормальном суммарном содержании 11-оксикетостероидов рассматриваются как проявление относительной глюкокортикоидной недостаточности. Уменьшение содержания суммарных 11-оксикортикостероидов является признаком абсолютной глюкокортикоидной недостаточности. Снижение реакции коркового вещества надпочечников на введение АКТГ, а также высокая концентрация транскортина при низком уровне свободной фракции 11-оксикетостероидов указывают на наличие вненадпочечниковой глюкокортикоидной недостаточности.

О нарушении гормональной функции яичников судят по изменению уровней эстрогенов и прогестерона в моче за сутки.

Для диагностики адренергического дисбаланса следует выявлять нарушение адренореактивности на различных уровнях регуляции — клеточном, органном и организменном. Глюкогенолиз лимфоцитов, стимулированных адреналином, дает возможность оценить состояние адренореактивности на уровне иммунокомпетентных клеток. Гипергликемический ответ на адреналин характеризует адренореактивность на органном уровне.

Острая пневмония

Обязательные исследования.

В сыворотке крови: белковые фракции, фибриноген, гаптоглобин, С-реактивный протеин, сиаловые кислоты, дифениламиновая реакция, электролиты (калий, натрий, кальций, хлор).

Дополнительные исследования.

В сыворотке крови: ЛДГ и ее фракция ЛДГ₃, АСТ, АЛТ, протромбин, толерантность плазмы к гепарину, свободный гепарин, иммунологические исследования — иммуноглобулины, противолечные антитела, титр компонента, реакция бласттрансформации лимфоцитов с фитогемаглютинином.

В плазме крови: 17-оксикортикостероиды.

В мокроте: иммуноглобулины.

В моче: альдостерон, 17-оксикортикостероиды, минеральные вещества — фосфор, кальций, медь, хлориды.

При острой пневмонии изменяются многие биохимические показатели. В начальный период заболевания резко повышается содержание фибриногена в плазме крови. Одновременно наблюдается снижение фибринолитической активности крови. Эти изменения нарастают параллельно увеличению воспалительных изменений в легких и нормализуются по мере их уменьшения.

В период выраженной клинической картины уменьшается количество альбуминов и увеличивается содержание α_1 -, α_2 - и γ -глобулинов со снижением альбумино-глобулинового коэффициента. В разгар пневмонии, в период интоксикации, значительно изменяется содержание СРБ и сиаловых кислот.

У больных острой пневмонией повышается уровень ЛДГ и ее изоферментов. Обнаруживается связь между величи-

ной показателя этого фермента и обширностью пневмонии, а также между ликвидацией очагов воспаления при пневмонии и нормализацией активности ЛДГ.

При острой пневмонии повышаются содержание меди и активность церулоплазмينا в крови, экскреция меди с мочой. У больных с затяжным течением пневмонии показатели выведения меди с мочой выше и без тенденции к снижению по сравнению с показателями у больных с обычным течением заболевания. Выявление повышения экскреции меди с мочой может свидетельствовать о возможности развития в дальнейшем хронической пневмонии.

В период выраженной клинической картины пневмонии снижается выделение хлорида натрия с мочой, одновременно уменьшается содержание хлоридов в сыворотке крови. Нормализация хлоридного обмена наступает на 5 дней позже исчезновения объективных и рентгенологических изменений в легких. В период выраженной клинической картины пневмонии уменьшается количество калия в крови и увеличивается содержание натрия и калия в эритроцитах. Эти нарушения обусловлены повышением минералокортикоидной функции коркового вещества надпочечников, гиперсекрецией альдостерона. В плазме крови и суточной моче обнаруживают увеличение концентрации свободных и связанных 17-оксикортикостероидов.

При вирусных и бактериальных пневмониях значительно снижается функциональная активность Т-лимфоцитов в пролиферативном ответе на фитогемагглютинин и антигенную стимуляцию стрептокиназой. У большинства больных увеличивается количество IgA. Концентрация IgA уменьшается, особенно у больных с затяжной пневмонией. Определенное значение имеет содержание иммуноглобулинов в альвеолярном секрете. В норме в нем обнаруживаются IgA и IgG. Появление в альвеолярном секрете IgE может свидетельствовать об аллергическом воспалительном процессе, а IgM — о болезнях иммунных комплексов или микоплазменной инфекции.

Острая и хроническая тромбоземболия легочных сосудов

Обязательные исследования.

В сыворотке крови: ЛДГ и ее фракции, креатинфосфокиназа (КФК), АСТ, АЛТ, билирубин, белковые фракции, С-реактивный белок, глюкоза, серомукоид, сиаловые кислоты, фибриноген, фибриноген В, калий и натрий.

Дополнительные исследования.

В сыворотке крови: продукты деградации фибриногена в крови.

В моче: продукты деградации фибриногена.

Для острой и хронической тромбоэмболии легочных сосудов диагностическое значение имеет триада признаков: повышение активности лактатдегидрогеназы, нормальный уровень аспаратаминотрансферазы и гипербилирубинемия (непрямой билирубин). Повышено содержание ЛДГ₃, увеличение общей активности ЛДГ наблюдается редко. Так же редко повышается уровень креатинфосфокиназы, что важно для дифференциальной диагностики тромбоэмболии легочных сосудов и инфаркта миокарда.

Изменения свертываемости крови и фибринолиза при тромбоэмболии легочных сосудов не типичны, за исключением появления продуктов деградации фибриногена в крови и моче. Показатели гиперкоагуляции крови и угнетения фибринолиза необходимы для назначения адекватной тромболитической и антикоагулянтной терапии.

Дыхательная недостаточность

Обязательные исследования.

В сыворотке крови: белковые фракции, фибриноген, гематокрит.

Дополнительные исследования.

В крови показатели кислотно-основного состояния — рН, парциальное давление CO_2 (pCO_2), буферные основания (ВВ), избыток буферных оснований (ВЕ), насыщение гемоглобина кислородом, уровень альдостерона.

Газовый состав артериальной крови характеризует функцию дыхания легких, а газовый состав смешанной венозной крови, поступающий в легкие, отражает состояние метаболических процессов в организме. Альвеоло-артериальное различие (AaPO_2) может служить критерием, характеризующим неэффективность газообмена через легочную мембрану, а артерио- и альвеовенозное различие — эффективность тканевого газообмена.

Средний уровень PO_2 составляет 40 мм рт. ст., его снижение служит одним из признаков кислородного голодания тканей, повышение указывает на уменьшение тканевого метаболизма. Чтобы выявить причину нарушения тканевого газообмена (повреждение легких, системы крови и кровообращения или тканевых систем утилизации кислорода), необходимо сопоставить напряжение кислорода и

углекислого газа в альвеолярном воздухе, артериальной и венозной крови.

Признаками тяжелой дыхательной недостаточности являются уменьшение PO_2 ниже 60 мм рт. ст. и снижение рН до 7,2 и ниже при дыхании воздухом и нормальном атмосферном давлении.

Как один из критериев дыхательной недостаточности целесообразно характеризовать рН. При респираторном ацидозе и гипоксии, при которых накапливаются недоокисленные метаболиты (метаболический ацидоз), рН снижается.

Поскольку величина ВЕ изменяется в обратной зависимости от pCO_2 , то она может быть резко отрицательной, что дает повод к ошибочному заключению о выраженном сопутствующем метаболическом ацидозе.

Очень важным является определение гемоальвеолярных градиентов дыхательных газов. Возникновению артериально-альвеолярного градиента для углекислоты способствует нарушение вентиляционно-перфузионных отношений (величина градиента у здоровых 0,3—4,7 мм рт.ст.). Увеличение градиента $PaACO_2$ связано с наличием вентилируемых, но не перфузируемых альвеол. Примером является тромбоэмболия в системе легочной артерии.

Альвеолярно-артериальный градиент для кислорода — $PAaO_2$ объясняется вентиляционно-перфузионными и шунто-диффузионными нарушениями. Значительные различия между PAO_2 и PaO_2 возникают при наличии шунтов. Необходимо помнить, что и у здоровых людей имеется физиологическое недонасыщение артериальной крови кислородом, достигающее 10—15 мм рт.ст.

При дыхательной недостаточности наблюдаются как компенсаторные реакции гиперглобулинемия, полицитемия, увеличение гематокрита.

Заболевания желудка и кишечника

Обязательные исследования.

Зондовое исследование желудочного содержимого с определением объема желудочного сока, часового дебита свободной хлористоводородной кислоты в период базальной секреции и после стимуляции энтеральными и парентеральными раздражителями (используется субмаксимальная и максимальная стимуляция желудочной секреции гистамином и близким к нему по действию пентагастрином);

исследование ферментопroduцирующей функции желудка — определение пепсина в желудочном содержимом.

Обязательные исследования при заболеваниях тонкой и толстой кишки.

Определение активности ферментов энтерокиназы и щелочной фосфатазы в кишечном соке и кале; биохимические показатели пристеночного пищеварения — определение рН, молочной кислоты, сахаров в кале и моче; биохимические показатели всасывательной функции кишечника — проба на толерантность к лактозе, другим дисахаридам, тесты на всасывание Д-ксилозы, меченого цианокобаламина, меченого кальция, меченых липидов, количественное определение жира в фекалиях, тест с альбумином, меченым хромом; секретин панкреозиминный (холецистокининный) тест — для исследования внешней секреции поджелудочной железы.

Дополнительные исследования.

Определение гастромукопротеида, молочной и других органических кислот в желудочном соке; в крови — уровень гастрина, общий белок и белковые фракции, коагулограмма, хлориды, калий, натрий, кальций, железо, глюкоза, холестерин, β -липопротеиды, активность ферментов АСТ, АЛТ, изоферментов ЛДГ — ЛДГ_{4,5}, щелочной и кислой фосфатаз, α -амилазы, липазы, трипсина; иммунологические исследования — антитела к внутреннему фактору, к слизистой оболочке кишок, IgA, IgM, IgG; реакция торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ), Е-РОК, определение Т-, В-, D-, С-лимфоцитов, антигенрезистентных Т-лимфоцитов, беззондовые методы исследования секреторной деятельности желудка (десмоидная проба, проба с ацидотестом — уропепсин), желудочная рН-метрия или радиотелеметрия.

Хронический гастрит

Хронический гастрит типа А протекает с секреторной недостаточностью желудка, наблюдается сближение уровней базальной и субмаксимальной кислотной продукции, соотношение их 1:1,8. Снижается общая кислотность в базальную стимулированную фазу секреции, свободная хлористоводородная кислота после стимуляции гистамином не обнаруживается или концентрация ее снижена. Уменьшается также содержание пепсина.

Степень выраженности атрофического процесса в слизистой оболочке желудка коррелирует с уровнем гастри-

немии. Снижается или полностью прекращается продукция гастромукопротеида.

Для хронического гастрита типа В характерно повышение тощачковой и базальной секреции, общей кислотности, субмаксимальной стимулированной кислотной продукции, уровня пепсина.

Язвенная болезнь желудка

При локализации язвы в кардиальном отделе желудка кислотообразующая функция желудка чаще нормальная или несколько снижена; при язве привратника и луковицы двенадцатиперстной кишки наблюдаются гиперсекреция и гиперхлоргидрия желудочного сока, повышение ферментопродуцирующей функции желудка. Увеличено содержание гастрина, IgG, IgA в сыворотке крови, определяются антитела к СР. Нарушение водно-солевого обмена, хлоргидропенический синдром развиваются при декомпенсированном стенозе привратника язвенной этиологии, наблюдаются азотемия, гипоальбуминемия, диспротеинемия, нарушение кислотно-основного состояния.

Рак желудка

Исследование желудочной секреции при раке желудка выявляет хлоргидрию, наличие молочной кислоты и других органических кислот в желудочном содержимом. Однако, при локализации рака в привратнике, кислотно-щелочное состояние может быть сохранено или кислотность даже повышена. Уровень пепсина снижен. Наблюдаются гипо- и диспротеинемия, гипоальбуминемия, увеличение концентрации γ -глобулинов.

Хронический энтероколит

При хроническом энтероколите, наряду с копрологическим синдромом (полифекалия, стеаторея, креаторея и др.), наблюдается повышение активности энтерокиназы, щелочной фосфатазы в дуоденальном содержимом, увеличение экскреции ферментов с калом. При тяжелом течении заболевания ферментативная активность кишечного содержимого угнетена.

В крови снижается уровень стеркобилина, развиваются гипопропротеинемия (как гипоальбуминемия, так и гипог-

лобулинемия), гипохолестеринемия, гипогликемия, уменьшается содержание фосфолипидов, β -липопротеидов в сыворотке крови. После нагрузки глюкозой сахарная кривая имеет плоский вид.

В далеко зашедших случаях прогрессирует электролитный дисбаланс — снижается уровень калия, натрия, кальция, фосфора, магния, развивается дефицит витаминов — ретинола, аскорбиновой кислоты, биофлавоноидов и группы В. Может наблюдаться снижение кислотности желудочного сока и пепсинообразующей функции желудка, расстройство внешней секреции поджелудочной железы и желчевыделительной функции печени.

Синдром мальабсорбции (нарушение всасывания)

Синдром мальабсорбции характеризуется прогрессирующим нарушением обмена веществ: белков, жиров, углеводов, минеральных веществ, витаминов, водно-солевого. Проявляется гипопроteinемией — снижением уровня как альбуминов, так и глобулинов, дефицитом витаминов — ретинола, аскорбиновой кислоты, биофлавоноидов и группы В, суммарным дефицитом минеральных элементов, гипохолестеринемией, уменьшением содержания фосфолипидов и железа. Наиболее информативный диагностический тест с Д(+) ксилозной нагрузкой.

Заболевания поджелудочной железы

Обязательные исследования.

В крови: активность ферментов α -амилазы, липазы, трипсина и его ингибиторов, АСТ, ЛДГ и изоферментов — ЛДГ₄, ЛДГ₅, содержание билирубина, глюкозы, кислотно-основное состояние.

В моче — активность α -амилазы.

Дополнительные исследования.

В панкреатическом соке: дебит гидрокарбоната и активность α -амилазы, липазы, трипсина, лактоферрин.

В крови — проба с двойной нагрузкой глюкозой, общий белок и белковые фракции, С-реактивный белок, активность холестатических ферментов — щелочной фосфотазы, γ -глутамилтранспептидазы, лейцинаминопептидазы, креатинин, мочевины, калий, натрий, кальций, инсулин, глюкагон, секретин.

При заболеваниях поджелудочной железы выделяют следующие биохимические синдромы:

1. *Синдром цитолиза*: повышение в крови активности ферментов — α -амилазы, трипсина, липазы, фосфолипазы, эластазы, дезоксирибонуклеазы, лейцинаминопептидазы, ЛДГ, ЛДГ₄, ЛДГ₅, АСТ; фосфатемия, гипокальциемия, α -амилазурия.

2. *Синдром внешнесекреторной панкреатической недостаточности*: снижение активности ферментов панкреатического сока натощак и после применения секретино-холецистокининового теста, уменьшение активности трипсина в кале.

3. *Синдром внутрисекреторной панкреатической недостаточности*: гипергликемия, глюкозурия, двугорбые или диабетические варианты гликемических кривых после двойной нагрузки глюкозой с максимальной гликемией после второй нагрузки.

При остром панкреатите определяются повышение активности α -амилазы в сыворотке крови через 2—12 ч после начала заболевания с увеличением в 5—20 раз к концу первых суток, повышение α -амилазы в моче (активность фермента в моче «запаздывает» по сравнению с сывороточной примерно на 6 часов); повышение активности липазы, АСТ, снижение уровня кальция, натрия, калия в крови, гипергликемия, диспротеинемия, глобулинемия, появление С-реактивного белка, креатининемия, билирубинемия, протеинурия, глюкозурия. В случае распространенного панкреонекроза активность α -амилазы в крови и моче нормальная или снижена. При остром панкреатите и панкреонекрозе повышено содержание АСТ, АЛТ, ЛДГ_{4,5}.

При хроническом рецидивирующем панкреатите обнаруживается: повышение активности α -амилазы, липазы в крови, α -амилазурия — при обострении заболевания, изменение активности ферментов — α -амилазы, липазы, трипсина и количества гидрокарбонатов в панкреатическом соке (снижение или повышение — в зависимости от типа панкреатической секреции при использовании секретино-холецистокининового теста), нарушение толерантности к глюкозе, гипергликемия, гипохолестеринемия, гипопропротеинемия, снижение секреции инсулина и глюкагона, повышение амилазо-креатинового индекса (свыше 6%).

При раке поджелудочной железы наблюдаются снижение активности панкреатических ферментов в крови, моче, панкреатическом соке, гипергликемия, глюкозурия, билирубинемия за счет связанного билирубина (опухоль головки поджелудочной железы), положительная реакция на желчные пигменты в моче.

При инсуломе (опухоли панкреатических островков) выявляется гипогликемия (вплоть до гипогликемической комы).

Заболевания почек

Обязательные исследования.

В крови: определение креатинина, мочевины, мочевой кислоты, остаточного азота, электролитов (калия, натрия, кальция, магния, хлора, фосфора), общего белка и белковых фракций, холестерина, триглицеридов, β -ЛП, фибриногена.

В моче: белок, сахар.

Дополнительные исследования.

В крови: коагулограмма, серологические и иммунологические тесты, показатели кислотно-основного состояния.

Гломерулонефрит

Острый гломерулонефрит. В крови может быть повышено содержание креатинина, мочевины, особенно при олигурии и анурии. Гипопротеинемия и диспротеинемия слабо выражены и быстро проходят. Иногда наблюдаются незначительная гиперхолестеринемия и липемия. Могут определяться повышенные антистрептолизинный (АСЛ-О) и антистрептогиалуронидазный титры (АСГ). При исследовании мочи выявляется высоко селективная протеинурия — 1—4,5 г/сут. Значительное увеличение протеинурии может обнаруживаться при экламптических приступах. Продолжительность «большой» протеинурии не превышает 7—10 дней. Остаточная протеинурия может держаться в течение 6—9 мес.

Подострый злокачественный гломерулонефрит характеризуется быстрым развитием почечной недостаточности с гиперазотемией, сопровождается, как правило, коагулопатией и снижением содержания комплемента в сыворотке крови, реже — гиперхолестеринемией, гипо- и диспротеинемией. В моче — высокая протеинурия.

Хронический гломерулонефрит. Латентная форма хронического гломерулонефрита протекает с умеренной (изолированной) протеинурией без существенных биохимических изменений в крови.

Нефротическая форма хронического гломерулонефрита характеризуется выраженной протеинурией (15—

20 г/сут), гипоальбуминемией, гиперхолестеринемией, повышением β -ЛП. Мочевина и креатинин в крови обычно находятся в пределах нормы. Концентрация натрия в сыворотке крови, как правило, нормальная, кальция — несколько снижена, хлора и магния — повышена.

При гипертонической форме хронического гломеруло-нефрита наблюдается незначительная протеинурия (не более 1 г/сут) преимущественно за счет альбумина, α_2 - и β -глобулинов, отмечается медленная, но неуклонно прогрессирующая гиперазотемия.

Амилоидоз почек

Ведущий симптом — упорная изолированная протеинурия при, так называемом, пустом мочевом осадке. В дальнейшем формируется классический нефротический синдром: массивная протеинурия (10 г/сут и более), гипопро-теинемия, гипоальбуминемия, гиперлипидемия, за счет повышения в крови содержания холестерина, β -липопротеидов, триглицеридов.

Почечная недостаточность

Острая почечная недостаточность. Олигурическая стадия проявляется массивной протеинурией, повышением в крови концентрации калия, магния, признаками некомпенсированного метаболического ацидоза, гиперазотемией, увеличением содержания аммиака в крови. Концентрация мочевой кислоты и индикана возрастает не столь значительно.

Стадия восстановленного диуреза характеризуется быстрым уменьшением протеинурии, азотемии, избыточной потерей калия вплоть до развития гипокалиемического паралича.

Период выздоровления начинается с того дня, когда уровень мочевины становится нормальным. Гомеостаз восстанавливается полностью в течение 3—12 мес.

Хроническая почечная недостаточность (ХПН). Наиболее важный показатель степени ХПН — креатининемия, поскольку содержание креатинина в сыворотке крови не зависит от характера питания и белкового катаболизма. При ХПН повышается также концентрация мочевины в крови, по мере нарастания количества мочевины в кро-

ви снижается экскреция ее с мочой. Строгой зависимости между уровнем мочевины и креатинина нет. Нередко отмечаются гиперуринемия и повышение уровня остаточного азота. Постепенно развиваются гипонатриемия, гипохлоремия. Калиевый баланс сохраняется в пределах нормы (при диурезе более 600 мл/сут), в терминальной стадии хронической почечной недостаточности выражены электролитные нарушения: гиперкалиемия, гиперхлоремия, гипокальциемия, гиперфосфатемия, гипермагниемия. Вследствие нарушения реабсорбции бикарбонатов развивается метаболический ацидоз, рН плазмы ниже 7,35.

Пиелонефрит

Острый пиелонефрит. При неосложненном течении острого пиелонефрита наблюдаются умеренная протеинурия и острофазовые показатели воспаления в крови (С-реактивный белок, α_2 -глобулинемия).

Тяжесть острого пиелонефрита с вовлечением в патологический процесс контрлатеральной почки и печени характеризуется азотемией, билирубинемией, гипергликемией, гипо-, диспротеинемией.

Хронический пиелонефрит. Латентная форма хронического пиелонефрита проявляется умеренной протеинурией, наряду с бактериурией и лейкоцитурией в поздних стадиях отмечается медленное нарастание хронической почечной недостаточности с гиперазотемией, белковым и электролитным дисбалансом, метаболическим ацидозом.

ЗАБОЛЕВАНИЯ КРОВИ

Анемии

Обязательные исследования.

В крови: эритроциты, гемоглобин, цветовой показатель, тромбоциты, время свертывания крови, гематокрит, протромбин, иммуноглобулины.

В моче: билирубин, уробилин.

В кале: стеркобилин.

Дополнительные исследования.

В сыворотке крови: железо, остаточный азот, свободный трансферрин, цианокобаламин, осмотическая стойкость эритроцитов, реакция Кумбса, титр тепловых гемолизинов, холодовых антител.

В моче: гемоглобин, гемосидерин.

Постгеморрагическая анемия характеризуется снижением количества эритроцитов, уровня гемоглобина при нормальном цветовом показателе, уменьшением времени свертывания крови, увеличением гематокрита в 1-е сутки после кровотечения. Через сутки после кровотечения отмечается уменьшение гематокрита. В крови определяются нормальное количество сывороточного железа, повышенные остаточного азота.

Железодефицитная анемия. При железодефицитной анемии наряду со снижением уровня эритроцитов, гемоглобина, выявляется уменьшение цветового показателя. В сыворотке крови содержится свободное железо, увеличена концентрация свободного трансферрина и, вследствие этого, повышена общая железосвязывающая способность сыворотки крови.

Цианокобаламинодефицитная анемия. Заболеванию свойственно снижение количества эритроцитов при повышении цветового показателя. Наблюдается увеличение содержания общего билирубина за счет непрямого билирубина, повышение концентрации железа в сыворотке крови. При радиоиммунном исследовании выявляется уменьшение количества цианокобаламина в сыворотке крови.

Гемолитическая анемия аутоиммунного генеза характеризуется снижением количества эритроцитов и гемоглобина при нормальном или повышенном цветовом показателе и увеличении количества ретикулоцитов. Отмечается снижение осмотической резистентности эритроцитов. Часто выражена диспротеинемия за счет повышения уровня γ -глобулинов. Иногда может быть положительная реакция Вассермана. При иммунологических исследованиях обнаруживаются увеличение концентрации IgG, IgM, положительная прямая проба Кумбса, в части случаев положительная непрямая проба Кумбса. В 30—40% случаев выявляются титры холодных антител и тепловых гемолизинов. В сыворотке крови повышено содержание общего и непрямого билирубина, железа.

В моче увеличивается количество уробилина, появляются гемоглобин и гемосидерин, особенно в период криза. В кале увеличено содержание стеркобилина.

Микросфероцитарная гемолитическая анемия (болезнь Минковского—Шоффара). Заболеванию свойственно снижение содержания эритроцитов, гемоглобина при нормальном цветовом показателе и нормальном содержании гемоглобина в эритроцитах. Осмотическая резистентность эритроцитов снижена. Увеличена концентрация общего и

непрямого билирубина в крови, количество уробилина в моче.

В сыворотке крови содержание железа увеличено. Проба Кумбса отрицательна.

В кале увеличено содержание стеркобилина.

Ночная пароксизмальная гемоглобинурия (болезнь Маркиафавы — Микели) характеризуется снижением количества эритроцитов и гемоглобина при нормальном цветовом показателе. Как правило, повышается концентрация свободного гемоглобина плазмы, общего билирубина за счет увеличения непрямого билирубина. В моче появляются гемоглобин и гемосидерин. Часто отмечается протеинурия. В сыворотке крови содержание железа чаще всего увеличено, однако и снижение его уровня встречается нередко. Для системы свертывания крови чаще всего характерно повышение свертывания крови и уменьшение времени кровотечения.

Гипопластическая анемия. При гипопластической анемии наряду со снижением количества эритроцитов и гемоглобина обнаруживается нормальный цветовой показатель. В сыворотке крови увеличено количество непрямого билирубина, железа, трансферрина.

Время кровотечения увеличено, в норме протромбиновый индекс и время свертывания крови.

Геморрагические диатезы

Обязательные исследования.

В крови: коагулограмма — время свертывания, время кровотечения, протромбиновый индекс, фибриноген, ретракция кровяного сгустка, иммуноглобулины, Т- и В-бласттрансформация лимфоцитов, иммунные комплексы, продукты деградации фибриногена, проба Кумбса.

В моче: продукты деградации фибриногена.

Дополнительные исследования: аутокоагулограмма, активированное тромбопластиновое время, фибриностабилизирующий фактор, адгезия тромбоцитов к коллагену или соединительной ткани, криоглобулины.

Гемофилии

Гемофилия А (дефицит фактора VIII) характеризуется увеличением времени свертывания, нормальным временем кровотечения по Дюку и Айви, нормальными протромбиновым индексом, тромбоиновым временем, уровнем

фибриногена. Увеличивается активированное тромбопластиновое время, снижается коагуляционная активность в аутокоагулограмме, положительный аутокоагуляционный тест.

Гемофилия В (болезнь Кристмаса) — дефицит фактора IX также характеризуется увеличением общего времени свертывания крови, активированного парциального тромбопластинового времени, снижением коагуляционной активности в аутокоагулограмме, нормальными протромбиновым индексом и тромбиновым временем. Количество фибриногена также в норме.

Гемофилия С (дефицит фактора XI) — время свертывания крови чаще нормальное, но и довольно часто оно удлинено. Время кровотечения, тромбиновый индекс, протромбиновое время, количество фибриногена нормальны. Отмечается увеличение активированного парциального тромбопластинового времени, увеличение аутокоагуляционного теста.

Тромбоцитопатии

Болезнь Верльгофа характеризуется увеличением времени кровотечения по Дюку и Айви, уменьшением ретракции кровяного сгустка. Время свертывания крови нормальное. Нормальные показатели коагуляционного гемостата — тромбиновое время, количество фибриногена, фибриностабилизирующий фактор, протромбиновое время по Квику. Отмечается уменьшение содержания гликогена, лактатдегидрогеназы в тромбоцитах и мегакариоцитах. Изменяются иммунологические показатели: положительная проба Кумбса, бласттрансформация лимфоцитов, торможение миграции макрофагов под влиянием тромбоцитов.

Ангиогемофилия (болезнь Виллебранда) сопровождается увеличением времени кровотечения по Дюку, Айви, снижением ретенции тромбоцитов на стекле, снижением адгезии тромбоцитов к коллагену или соединительной ткани, уменьшением количества факторов Виллебранда (VIII: ФВ). Уровень фибриногена нормальный.

Тромбостения Гланцманна (болезнь Гланцманна — Негели) характеризуется увеличением времени кровотечения по Дюку, Айви, отсутствием агрегации тромбоцитов при воздействии коллагеном, адреналином, аденозиндифосфатом. Как правило, уменьшена ретракция кровяного сгустка, нормальное время свертывания крови. Показатели коагуляционного гемостаза (фибриноген, протромби-

новый индекс) нормальны. Количество тромбоцитов, их размеры и продолжительность жизни остаются нормальными. Проба Кумбса отрицательна.

Геморрагический васкулит (болезнь Шенлейна — Геноха). При геморрагическом васкулите определяются нормальные протромбиновый индекс, тромбиновое время, увеличение количества фибриногена, повышение содержания продуктов деградации фибриногена. Часто обнаруживается увеличение содержания криоглобулинов, количества иммунных комплексов, характерна гиперкоагуляция по аутокоагулограмме. Количество Т-лимфоцитов снижено.

Геморрагическая наследственная телеангиэктазия (синдром Ослера — Рандю). Наиболее характерными являются: нормальные показатели свертывания крови, времени кровотечения, протромбинового индекса, тромбинового времени. Количество эритроцитов и гемоглобина может быть снижено (кровотечения).

Синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови

Обязательные исследования.

В крови: фибриноген, протромбиновое время, фибриноген В, продукты деградации фибриногена, время свертывания крови, этаноловая проба, β -нафтоловая проба, билирубин (непрямой).

В моче: продукты деградации фибриногена.

Дополнительные исследования.

В крови: антитромбин III, плазминоген, тромбин, гепарин, фибрин-мономер.

В моче: продукты деградации фибриногена.

Диагностика ДВС-синдрома осуществляется с помощью коагуляционных тестов, выполняемых у постели больного: времени свертывания крови, протромбинового времени, содержания фибриногена. Этим же целям служат паракоагуляционные тесты — этаноловый, протаминсульфатный, определение фибриногена В. Необходимо подчеркнуть, что отрицательный результат паракоагуляционных тестов не исключает ДВС-синдрома, это наблюдается при наиболее тяжелых формах ДВС.

Состояние антисвертывающей системы оценивается по образованию продуктов деградации фибриногена, а также по содержанию в крови плазминогена. Для контроля за эффективностью лечения используют общие параметры

коагулограммы, паракоагуляционные тесты, определение продуктов деградации фибриногена, антитромбина III и плазминогена.

Определение антитромбина III важно не столько для диагностики ДВС-синдрома, сколько для определения эффективности гепаринотерапии.

Диагностика стадий ДВС-синдрома. Для I стадии ДВС-синдрома характерно нарастание гиперкоагуляции и внутрисосудистой агрегации клеток крови — уменьшается время свертывания. Аутокоагулограмма — 6—7 с, повышается уровень фибриногена (или норма), появляется фибриноген В, определяются положительные протаминавая и этаноловая пробы, активируются фибринолиз и ретракция сгустка. Усиливаются адгезия и агрегация тромбоцитов.

При II стадии ДВС-синдрома обнаруживаются разнонаправленные сдвиги, что очень характерно — нарастание гиперкоагуляции по одним тестам и нормализация или снижение активности факторов свертывания — по другим, уменьшение времени свертывания крови и аутокоагулограммы, дальнейшее снижение уровня фибриногена, резко положительные (2+, 3+) β -нафтоловая, этаноловая и протаминсульфатная пробы, выявление фибринмономерных комплексов, продуктов деградации фибриногена, уменьшение антитромбина III, обнаружение циркулирующего тромбина (фактор IIa), протромбокиназы.

В сыворотке крови повышается уровень непрямого билирубина.

Для III стадии ДВС-синдрома характерны максимальная фибриногенопения (фибриноген менее 0,5 г/л или он не определяется), тромбоцитопения. Кровь не свертывается или время ее коагуляции значительно удлинено. Резко положительны β -нафтоловая, этаноловая и протаминсульфатная пробы. Аутокоагулограмма — 15—30 с, уменьшается протромбиновый индекс. Толерантность к гепарину резко снижена. Значительно увеличено тромбиновое время, время кровотечения. Уровень непрямого билирубина повышен.

ЗАБОЛЕВАНИЯ ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНОЙ СИСТЕМЫ

Обязательные исследования.

В крови: глюкоза, электролиты (калий, натрий, кальций, хлор, фосфор), холестерин, белок и белковые фракции, альдостерон, 17-оксикетостероиды.

В моче: 17-кетостероиды, 11-кетостероиды, глюкоза.

Дополнительные исследования.

В крови: аденокортикотропный гормон (АКТГ), кортизол, ренин, фибриноген, коагулограмма, щелочная фосфатаза, пролактин, тиреокальцитонин, паратгормон, тиреотропный гормон, соматотропин, фолликулостимулирующий гормон, лютропин, пролактин.

В моче: гонадотропины, эстрогены, соматотропин.

Акромегалия

В крови определяются повышение количества общего белка, гипоальбуминемия, гиперглобулинемия в основном за счет α_1 -, α_2 -глобулинов. Нередко снижен протромбиновый индекс. Количество фибриногена увеличено. Повышено содержание гепарина в плазме крови. В активной фазе заболевания увеличивается выделение с мочой неорганических веществ, кальция. На протяжении всего заболевания в крови повышена концентрация пролактина. В начальный период акромегалии в активной фазе в крови повышен уровень тиреокальцитонина и паратгормона. По мере увеличения продолжительности заболевания в крови сохраняется высокая концентрация паратгормона.

Фармакологические пробы (для выявления активной фазы акромегалии).

1. Тест с инсулином или аргинином. Инсулин вводят внутривенно 0,1—0,15 ЕД/кг, а аргинин внутривенно 0,5 г/кг в течение 30 мин с контролем соматотропина до введения, а затем при 30, 60, 90 и 120 мин после введения препарата. У больных акромегалией в активной фазе в отличие от здоровых людей отмечается увеличение базального уровня соматотропина и степени его повышения после введения как инсулина, так и аргинина.

2. Тест с тиролиберином. В пробах крови после нагрузки тиролиберином (200—500 мкг в изотоническом растворе натрия хлорида внутривенно) резко повышается концентрация соматотропина через 30, 60, 90 и 120 мин.

3. Проба с L-ДОПА. У здоровых людей через 1ч после введения L-ДОПА содержание гормона роста в сыворотке крови резко увеличивается с постепенным снижением до исходного к 3 ч. В активной фазе акромегалии наблюдается парадоксальная реакция: снижение уровня соматотропина в крови после введения L-ДОПА. В неактивной фазе реакция на введение L-ДОПА нормальная, однако абсолютные значения концентрации соматотропина по сравнению с таковыми у здоровых людей снижены.

4. Проба с глюкозой. У здоровых людей к 3-му часу после нагрузки глюкозой содержание соматотропина в сыворотке крови снижается. У больных акромегалией в активной фазе после нагрузки происходит парадоксальное повышение уровня гормона роста в сыворотке крови, а в неактивной фазе этот показатель не изменяется.

Болезнь Иценко—Кушинга

В плазме крови нередко увеличивается содержание АКТГ, кортизола, суммарных 17-оксикетостероидов, свободных и связанных с белком 11-оксикетостероидов, ренина. В активной стадии заболевания наблюдаются повышение концентрации фибриногена, снижение фибринолитической активности крови, гипергепаринемия. Часто отмечаются гиперхолестеринемия, гипоальбуминемия, гиперглобулинемия, гипернатриемия, гиперхлоремия, гипокалиемия, гипофосфатемия. Снижена активность щелочной фосфатазы. Часты симптомы стероидного сахарного диабета — гипергликемия, глюкозурия, сниженная толерантность к углеводам. Изменен ритм АКТГ и кортикостероидов в плазме крови: уровень АКТГ и кортикостероидов увеличивается в плазме крови к вечеру, максимальное повышение их наблюдается ночью, минимальное — в утренние часы.

В моче обнаруживается белок. Повышается выделение с мочой 17-оксикетостероидов, 17-кетостероидов, кортизола. Выделение 17-оксикетостероидов с мочой в ночное время преобладает над их выделением в утренние часы.

Фармакологические пробы (для дифференциальной диагностики болезни Иценко—Кушинга и опухоли коркового вещества надпочечников — синдрома Иценко—Кушинга):

1. Проба с метопивроном. Назначают метопивроном внутрь по 750 мг каждые 6 часов в течение 2 суток. При болезни Иценко—Кушинга после приема метопиврона экскреция 17-оксикортикостероидов с мочой повышается в 2—3 раза. При синдроме Иценко—Кушинга усиления экскреции 17-оксикортикостероидов на введение метопиврона не происходит.

2. Проба с дексаметазоном. Назначают дексаметазон внутрь по 2 мг каждые 6 часов в течение 2 суток. При болезни Иценко—Кушинга отмечается снижение экскреции 17-оксикортикостероидов с мочой более чем на 50%, а при синдроме Иценко—Кушинга экскреция 17-оксикортикостероидов с мочой не изменяется.

Заболевания надпочечников

Обязательные исследования.

В крови: глюкоза, 17-оксикетостероиды, электролиты (калий, натрий, кальций, хлор), кислотно-основное состояние.

В моче: белок, 17-кетостероиды, 17-оксикетостероиды, электролиты (калий, натрий, хлор), суточная экскреция глюкозы с мочой.

Дополнительные исследования.

В крови: АКТГ, ренин, альдостерон, кортизол, дезоксикортикостерон, общий белок и белковые фракции, антитела к надпочечниковой ткани, коагулограмма.

В моче: катехоламины, винилминдальная кислота, альдостерон.

Хроническая недостаточность коркового вещества надпочечников (Аддисоновая болезнь)

В крови выявляются гипонатриемия, гипохлоремия, гиперкалиемия. Содержание АКТГ увеличено, а кортизола, глюкозы в крови натошак уменьшено. Выделение 17-оксикортикостероидов с мочой снижено. Тест на толерантность к глюкозе с выраженной гипогликемической фазой к 3-му часу после нагрузки. Часто отмечаются гипоальбуминемия, гиперглобулинемия, склонность к гипохолестеринемии. Выделение с мочой калия снижено, натрия и хлоридов — повышено. Содержание альдостерона, 17-кетостероидов и 17-оксикетостероидов в моче уменьшено.

Для диагностики стертых форм аддисоновой болезни проводят провокационные пробы. Проба с АКТГ — после введения внутривенно (капельно) 25 ЕД АКТГ, уровень 17-оксикетостероидов в крови и моче остается сниженным.

Ожирение

Обязательные исследования.

В крови: общие липиды, β -липопротеиды, холестерин, триглицериды, сахар, электролиты (калий, натрий), белковые фракции крови, белковосвязанный йод.

В моче: катехоламины, натрий, калий.

Дополнительные исследования.

В крови: глюкоза, мочева кислота, коагулограмма, АКТГ, лютропин, лактатдегидрогеназа, сукцинатдегидрогеназа.

В моче: катехоламины.

В крови обнаруживается повышение содержания «свободных» жирных кислот, β -липопротеидов, часто — увеличение концентрации глюкозы. Нередко отмечают повышение уровня мочевой кислоты, снижение общего количества белка за счет уменьшения количества альбуминов. Нередко наблюдаются гиперкоагуляция, повышение уровня фибриногена, угнетение фибринолиза. Содержание натрия в крови увеличивается только при IV степени ожирения. Нередко повышена концентрация гормонов — АКТГ, лютропина, АДГ, инсулина, снижен уровень соматотропина, тиреотропного гормона, пролактина.

В моче: снижена экскреция адреналина, при IV степени ожирения выделение натрия уменьшено, протеинурия.

Сахарный диабет

Обязательные исследования.

В крови: глюкоза, кетоновые тела, сахарный профиль крови, холестерин, триглицериды, альфа-амилаза, общий белок и белковые фракции, мочевины, креатинин.

В моче: глюкоза, ацетон.

Дополнительные исследования.

В крови: инсулин, антагонисты инсулина (соматотропин, АКТГ, гидрокортизон, адреналин, глюкагон); электролиты (калий, натрий, кальций, хлор), кислотно-основное состояние, осмолярность, ренин, молочная и пировиноградная кислоты.

В моче: определение содержания электролитов (калия, натрия, хлора) с целью исследования функций печени и поджелудочной железы.

Основным биохимическим признаком сахарного диабета является гипергликемия, она обуславливает повышение осмотического давления крови. Отмечаются повышение в крови содержания молочной кислоты, холестерина, β -липопротеидов, снижение концентрации фосфолипидов. Уменьшается количество альбуминов, увеличивается концентрация α_2 -, β - и γ -глобулинов. Наблюдается глюкозурия. При декомпенсированном сахарном диабете возникает гиперазотемия с последующей гиперазотурией.

Диагностические пробы для диагностики скрытого диабета.

I. Проба с пероральным введением глюкозы (тест толерантности к глюкозе).

2. Проба с внутренним выделением глюкозы (для диагностики сахарного диабета при подозрении на нарушение всасывания глюкозы в кишечнике). Содержание глюкозы в крови определяют натощак, а затем через каждые 10 мин в течение 1,5 ч после внутривенного медленного (4 мин) введения 10 мл 50% раствора глюкозы. У здорового человека после внутривенного введения глюкозы содержание ее в крови возвращается к исходной величине через 90—120 мин, а при сахарном диабете остается повышенным.

3. Проба с толбутамидом (для выявления резервных возможностей инсулярного аппарата). После определения количества глюкозы в крови натощак внутривенно вводят 20 мл 5% раствора толбутамида и определяют уровень глюкозы в крови через 20 и 30 мин. У здоровых людей через 20 мин после введения толбутамида содержание глюкозы в крови уменьшается более чем на 23% от исходного уровня. При скрытом сахарном диабете через 20 мин после введения толбутамида уровень сахара в крови снижается менее чем на 20%, а через 30 мин — менее чем на 23% от исходного уровня.

Кетоацидотическая кома

Уровень глюкозы в крови обычно превышает 28 ммоль/л. Определяются гипергликемия, сопровождающаяся кетозом, снижение содержания натрия, фосфора, калия, кальция, магния и хлоридов в крови. Показатели кислотно-основного состояния указывают на ацидоз. Осмолярность крови нередко повышена. Наблюдаются увеличение содержания триглицеридов, остаточного азота, мочевины, гиперхолестеринемия, гипербилирубинемия. Нарастает уровень кетоновых тел, характерна гипокалиемия, рН крови составляет 7,2—6,8. Отмечаются резкая ацетонурия и глюкозурия, нередко протеинурия.

Гиперосмолярная кома. Изменения биохимического состава крови заключаются в резко выраженной гипергликемии, повышении осмотического давления крови, гиперхлоремии, гипернатриемии. Содержание калия в крови обычно нормальное или несколько повышено. Нормальный уровень кетоновых тел, бикарбоната и рН крови, отсутствует ацетонурия.

Гиперлактацидемическая кома характеризуется избыточным содержанием в крови молочной кислоты (выше 2 ммоль). Происходит накопление пировиноградной кислоты, переход ее в молочную кислоту. Возникает молочнокислый аци-

доз. Отмечаются относительно невысокая гипергликемия и глюкозурия. Гиперкетонемии и кетонурии нет. Снижены резервная основность, уровень бикарбонатов и рН крови.

ЗАБОЛЕВАНИЯ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Обязательные исследования.

В крови: гормоны щитовидной железы (тиреотропный гормон, трийодтиронин, общий тироксин), глюкоза, холестерин, липопротеиды.

Дополнительные исследования.

В крови: общий и свободный трийодтиронин, белковосвязанный йод, электролиты (калий, натрий, кальций, хлор, магний, фосфор), общий белок и белковые фракции, иммунологические исследования антитела к компонентам щитовидной железы; коагулограмма, креатинфосфокиназа, иммуноглобулины.

В моче: креатинин, уробилин, 17-кетостероиды, 17-оксикортикостероиды.

Диффузный токсический зоб

При выраженной форме заболевания отмечаются гипоcholesterинемия, гипоальбуминемия, относительное увеличение содержания глобулинов, особенно γ -фракции. Часто наблюдаются гипергликемия, снижение толерантности к глюкозе, иногда — уменьшение концентрации протромбина.

В случае декомпенсации содержание тиреотропного гормона в крови снижено, уровень ГРТГ не изменен, а уровень трийодтиронина и общего тироксина значительно повышен.

Нередко увеличен титр антител к тиреоглобулину. В моче иногда отмечается усиление выделения креатинина, при нарушении пигментообразующей функции печени — уробилина.

Белковосвязанный йод является прямым показателем функции щитовидной железы. При диффузном токсическом зобе содержание белковосвязанного йода в плазме крови значительно повышается.

Гипотиреоз

При гипотиреозе выявляются гиперcholesterинемия, увеличение количества креатининкиназы. Нередко увеличено содержание β - и α -липопротеидов. Часто обнаружи-

ваются гипоальбуминемия и гиперглобулинемия. Содержание глюкозы в крови находится на нижней границе нормы. Иногда уменьшена экскреция с мочой 17-кетостероидов и 17-оксикортикостероидов. Снижены уровень общего тироксина, трийодтиронина, индекс свободного тироксина и содержание белковосвязанного йода.

Диагностические пробы.

1. Проба с тиреотропин-релизинг-гормоном (ТРГ). Проба основывается на способности ТРГ повышать уровень тиреотропного гормона и используется для дифференциальной диагностики первичного, вторичного (гипофизарного) и третичного (гипоталамического) гипотиреоза. ТРГ вводят внутривенно струйно в дозе 200—500 мкг в 2 мл изотонического раствора натрия хлорида. Исследование проводят натощак, а также через 30, 60 и 120 мин после введения гормона. У здоровых людей максимальное (почти в 2 раза) повышение уровня тиреотропного гормона в крови по сравнению с исходным отмечается обычно на 30-й минуте, а на 120-й минуте снижается до исходного. При первичном гипотиреозе наблюдается высокий базальный уровень тиреотропного гормона в крови.

2. Проба с тиреотропином (применяется для дифференциальной диагностики первичного и вторичного гипотиреоза). Накануне перед проведением пробы определяют базальный уровень в крови общего тироксина, трийодтиронина, на следующий день вводят подкожно 10 ЕД тиреотропина, после чего проводят повторное определение общего тироксина и трийодтиронина. При первичном гипотиреозе низкий уровень общего тироксина и трийодтиронина не изменяется, а при вторичном повышается более чем на 50%.

Глава 9

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА КЛИНИЧЕСКИХ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Контроль качества клинических биохимических исследований предусматривает систему мероприятий, направленных на повышение сходимости, воспроизводимости, правильности и точности результатов диагностического лабораторного обследования больных. Контроль качества позволяет своевременно выявлять и предупреждать случайные и систематические ошибки в ходе выполнения анализа.

В арсенале средств системы лабораторного контроля имеются специальные контрольные материалы и различные методы статистической обработки результатов контрольных исследований, которые позволяют оценить качественный уровень работы клинико-диагностической лаборатории.

Из контрольных материалов могут быть использованы как материалы собственного приготовления, так и материалы, полученные промышленным путем. К материалам собственного приготовления относятся эталонные растворы различных веществ, а также слитая сыворотка крови из остатков крови, исследовавшейся в лаборатории. На наш взгляд, контрольный материал из слитой сыворотки является недостаточно надежным и подвержен целому ряду случайностей при хранении, приводящих к изменению изучаемых параметров, даже несмотря на применение консервирующих средств. Кроме того, сам процесс приготовления слитой сыворотки создает дополнительную нагрузку для лабораторных работников. Для проведения контроля качества исследований лучше использовать промышленные контрольные материалы.

Перед употреблением сухую контрольную сыворотку следует растворить дистиллированной водой в объеме, который указан на этикетке упаковки или на ампулах с контрольным материалом. Растворение происходит в течение 30—40 минут. При этом следует избегать резкого встряхивания и перемешивать раствор вращением флакона между ладонями. Для исследования контрольную сыворотку берут в таком же объеме, как и сыворотку.

ВНУТРИЛАБОРАТОРНЫЙ КОНТРОЛЬ

Проводится с целью проверки качества исследований за счет улучшения сходимости воспроизводимости и правильности выполняемых исследований. Предупреждает случайные ошибки в ходе выполняемого анализа.

Внутрилабораторный контроль на воспроизводимость осуществляется, преимущественно, статистическим методом контрольных карт. Для его проведения используется контрольная сыворотка «Сероконт-В». Причем, партия сыворотки должна быть одной серии. Основными требованиями к данному виду контроля являются систематичность выполнения и проведение его в реальных условиях работы лаборатории, параллельно с диагностическими пробами.

Работу по контролю на воспроизводимость условно принято подразделять на 4 этапа:

1 этап — подготовительный. Состоит в сборе данных для статистической обработки. С этой целью ежедневно, параллельно с пробами материала от больных, исследуется проба с контрольной сывороткой. По каждому тесту, взятому на контроль, необходимо набрать не менее 20—25 результатов.

2 этап — статистическая обработка полученных результатов. Рассчитываются следующие параметры:

1) Среднеарифметическая величина

$$X = \frac{\sum X_n}{n},$$

где X — среднеарифметическая величина,
 X_n — сумма всех набранных результатов,
 n — количество взятых в расчет результатов.

2) Среднеквадратическое отклонение:

$$S = \pm \sqrt{\frac{\sum (X - X_n)^2}{n-1}}$$

3) Коэффициент вариации

$$V = \frac{S}{X \times 100\%}.$$

Для большинства биохимических тестов « V » не должен превышать 5%, а для ферментов — « V » допускается до 10%. Не углубляясь в детали, отметим, что указанные коэффициенты вариации обеспечивают работу с погрешностью, не превышающей 1/8 допустимого предела ошибки. Это такая величина, при которой не страдает диагностическая значимость теста. Если полученное в ходе расчетов значение « V » не превышает допустимую величину, то можно приступать к построению контрольной карты. Если же « V » выше, то необходимо из имеющейся выборки данных исключить сомнительные результаты с помощью критерия « T ».

$$T = \frac{X - X_n}{S}.$$

Если « T » больше 2,62, то данный результат исключается. А затем необходимо повторить все расчеты заново. И так до получения приемлемых V . Еще лучше сразу перед началом расчетов исключить из выборки результаты, значительно отличающиеся от основной массы данных. Это позволяет избежать необходимости многократных пересчетов.

3 этап — построение контрольной карты. Вначале определяют контрольные пределы $\pm 1S$; $\pm 2S$; $\pm 3S$. Представим это на конкретном цифровом примере. Допустим, что по результатам статистической обработки какого-либо контрольного теста получили $X=5,0$ ммоль/л; $V=5\%$, тогда рассчитываем контрольные пределы следующим образом:

$$+1S = X + S = 5,0 + 0,2 = 5,2 \text{ ммоль/л}$$

$$-1S = X - S = 5,0 - 0,2 = 4,8 \text{ ммоль/л}$$

$$+2S = X + 2S = 5,0 + 0,4 = 5,4 \text{ ммоль/л}$$

$$-2S = X - 2S = 5,0 - 0,4 = 4,6 \text{ ммоль/л}$$

$$+3S = X + 3S = 5,0 + 0,6 = 5,6 \text{ ммоль/л}$$

$$-3S = X - 3S = 5,0 - 0,6 = 4,4 \text{ ммоль/л}$$

На основании полученных параметров строят контрольную карту. Построение выполняют на специальных бланках контрольных карт, либо на миллиметровой бумаге. Вычерчивают систему координат — на оси абсцисс отмечают дату исследования, а на оси ординат откладывают значения концентрации, придерживаясь определенного выбранного масштаба. Среднеарифметическую величину концентрации всегда откладывают в центре оси ординат. Из этой точки к оси ординат восстанавливают перпендикуляр, который параллелен оси абсцисс и называется «линией среднеарифметического значения» (X). Вверх от линии X по оси ординат откладывают плюсовые значения концентрации, а вниз — убывающие значения концентрации. По обе стороны оси ординат точками отмечают контрольные пределы $\pm 1S$; $\pm 2S$; $\pm 3S$. Из этих точек проводят линии, параллельные линии среднеарифметического значения. В таком виде контрольная карта готова к использованию.

4 этап — работа с контрольной картой. Когда подготовлена к работе контрольная карта, все последующие результаты исследований контрольной сыворотки той же серии по соответствующему тесту отмечаются на контрольной карте в виде точки, связывающей пару значений «концентрация — дата». Несколько следующих друг за другом точек соединяют между собой прямыми линиями. Такая графическая запись лучше воспринимается зрительно. Так как контрольная сыворотка всегда исследуется параллельно с партией диагностических проб для больных и находится в таких же условиях анализа, что материал от больных, то контрольная карта с обозначенными на ней результатами исследования контрольной сыворотки, как зеркало отражает возможные погрешности в работе и по-

звояет своевременно принять меры к их устранению. Об ошибках сигнализируют на контрольной карте так называемые «предупредительные» и «контрольные» критерии. «Предупредительные критерии» свидетельствуют о создавшемся неблагоприятии в работе и угрозе появления грубых ошибок. При появлении «предупредительных критериев» исследователь обязан тщательно проанализировать весь ход работы: проверить используемые растворы реактивов, калибровочные графики, стандартные растворы, работу измерительных и вспомогательных приборов. Если же этого не было сделано или принятые меры оказались неэффективными, то на контрольной карте появляются «контрольные критерии». В этом случае все результаты анализов, выполненных для больных по данному тесту, считаются утратившими свое диагностическое значение, расцениваются как грубая ошибка и в отделения не выдаются. В лаборатории необходимо принять все меры для выявления причины ошибки и устранения ее. Только после этого можно повторно взять материал у больных и выполнить исследование.

Предупредительные критерии.

1. Шесть результатов подряд находятся по одну сторону от линии среднеарифметического значения.
2. Шесть результатов подряд обнаруживают тенденцию к однообразному повышению или понижению.
3. Три результата подряд находятся за пределами одного среднеарифметического отклонения.
4. Один результат расположен за пределами двух среднеквадратических отклонений.

Контрольные критерии.

1. Восемь результатов подряд находятся по одну сторону от линии среднеарифметического значения.
2. Восемь результатов подряд обнаруживают тенденцию к однообразному повышению или понижению.
3. Пять результатов подряд находятся за линией одного среднеквадратического отклонения.
4. Три результата подряд выходят за пределы двух среднеквадратических отклонений.
5. Один результат выходит за пределы трех среднеквадратических отклонений.

Внутрилабораторный контроль на правильность исследований. Осуществляется по мере необходимости, например: а) при появлении предупредительных контрольных критериев на контрольной карте; б) при налаживании новых методов исследования; в) при использовании но-

вой измерительной аппаратуры, новой партии реактивов; г) для контроля за работой лаборантов и т.д.

Для его проведения используются контрольные сыворотки с аттестованным содержанием интересующих компонентов типа «Сероконт-П-экви», «Сероконт-П», «Патосероконт-П». Если полученный результат определения укладывается в допустимые пределы колебаний ($X \pm 2S$) для данного компонента согласно приведенным паспортным данным контрольной сыворотки, то такой результат считается правильным.

МЕЖЛАБОРАТОРНЫЙ КОНТРОЛЬ

Межлабораторный контроль проводится одновременно в большой группе лабораторий путем исследования тождественного контрольного материала по строго определенной программе. Все контролируемые тесты выполняются унифицированными методами. Это позволяет проводить сравнение результатов исследований, выполненных в различных лабораториях между собой, то есть оценивать воспроизводимость результатов исследований по каждому тесту. Кроме того, при использовании контрольного материала, имеющего аттестованные параметры по целому ряду интересующих компонентов, можно проводить сравнение полученных результатов с паспортными данными контрольного материала, то есть в данном случае уже оценивать и правильность результатов исследований. В целом межлабораторный контроль позволяет получить достаточно объективный материал для того, чтобы сделать выводы о качественном уровне работы каждой лаборатории, участвующей в данном мероприятии.

Целью межлабораторного контроля является достижение сравнимых результатов исследований в клинических лабораториях и устранение погрешностей в работе лабораторий. Здесь же следует подчеркнуть, что межлабораторный контроль в плане индикации возможных ошибок в лабораторной работе намного эффективнее других видов контроля. Так, межлабораторный контроль выявляет не только случайные, но и систематические ошибки, которые невозможно обнаружить на уровне только внутрилабораторного контроля.

Межлабораторный контроль позволяет оперативно контролировать внедрение унифицированных методов на основании анализа представляемых результатов в конт-

рольный центр и рекомендовать отдельные методы к преимущественному внедрению.

В числе других мероприятий межлабораторный контроль позволил практически решить задачу перехода к всеобщему обозначению результатов лабораторных исследований в единицах международной системы СИ и обеспечить контроль за правильностью использования этих единиц.

Проводится межлабораторный контроль под руководством контрольного центра республиканского или областного уровня, обычно не реже 1 раза в квартал и, как правило, краткосрочно, то есть лаборатории исследуют контрольный материал один день. Контрольный центр разрабатывает программу эксперимента, в которой указывается дата контрольного исследования, характер контрольного материала и правила его использования (если материал подлежит растворению, то кратность его разведения и растворитель), указывается перечень тестов, вынесенных на контроль и дата, к которой необходимо представить результаты выполненных контрольных исследований в контрольный центр. Результаты своих исследований лаборатории-участницы заносят в специальный протокол, бланк которого им вручается вместе с контрольным материалом. В протоколе, наряду с результатом анализа, обязательно указываются единицы измерения и точное название метода, которым было выполнено каждое исследование.

После получения результатов от всех участвующих лабораторий, в контрольном центре производят их статистическую обработку. Результаты группируют по соответствующим тестам, методу и характеру его выполнения (ручной или автоматический). В каждой группе рассчитывают: \bar{X} — среднее арифметическое значение; S — среднеквадратическое отклонение; V — коэффициент вариации (чем он ниже, тем лучше воспроизводимость результатов исследований в группе). Все результаты, находящиеся вне пределов, исключаются из дальнейших расчетов для всей группы, но учитываются при оценке качества работы данной конкретной лаборатории — iS по такому исключенному результату засчитывается в сумму iS всех тестов, выполненных этой лабораторией. После исключения каких-либо результатов статистическую обработку в группе повторяют заново.

Для оценки качества работы каждой конкретной лаборатории рассчитывается ряд дополнительных параметров: iS — индекс среднеквадратического отклонения (индекс сигма) по каждому отдельному тесту и $\sum iS$ — сумма ин-

полненным лабораторией тестам.

$$iS = \frac{X - X_{\text{лаб.}}}{S}, \text{ где}$$

iS — индекс среднеквадратического отклонения;

X — среднеарифметическая величина в группе;

$X_{\text{лаб.}}$ — результат данной лаборатории;

S — значение среднеквадратического отклонения в группе.

При этом, чем ближе к нулю iS , тем более качественным является результат. По принятой системе оценок:

iS от «0» до «1» — результат хороший, оценивается 2 баллами;

iS от «1» до «2» — результат удовлетворительный, оценивается 1 баллом;

iS выше «2» — результат непригоден, оценивается «0» баллов.

Соответственно, чем меньше ΣiS по всем выполненным тестам в лаборатории, тем выше ее качественный уровень работы.

Итоги межлабораторного контроля в виде сводных таблиц с соответствующими рекомендациями высылаются заведующим лабораториями. Результаты каждой лаборатории в таблице обозначаются под определенным кодом, что продиктовано соображениями деонтологического порядка.

ЛИТЕРАТУРА

- Асатиани В.С.* Ферментные методы анализа. — М.: Наука, 1969. — 739 с.
- Алимова М.М., Рыжкова Л.А.* Лаб. дело. 1976, 8, с. 487—490.
- Балуда В.П., Баркаган З.С., Гольдберг Е.Д. и др.* Лабораторные методы исследования гемостаза. — Томск, 1980. 309 с.
- Бейсембаева Р.У.* Гаптоглобин. — Алма-Ата: Наука, 1983. — 128 с.
- Биохимические методы диагностики вирусного гепатита и других поражений гепатобилиарной системы, перехода острого гепатита в хроническую форму / Методические рекомендации.* Киевский НИИ эпидемиологии. Киев. — 1985. — с. 7—10.
- Бородин Е.А.* Биохимический диагноз. Часть 1—2. — Благовещенск, 1991. — 69 с.
- Взятие и доставка биоматериала для лабораторных исследований в клиничко-диагностические лаборатории / Методические рекомендации.* — М., 1979. — 105 с.
- Габриэлян Н.И., Дмитриев Г.П., Кулаков Г.П. и др.* «Диагностическая ценность определения средних молекул в плазме крови при нефрологических заболеваниях. 1982, с. 38—42.
- Горчаковский А.М.* Справочное пособие по клинической биохимии. — Одесса: ОКФА. 1994. — с. 135—185.
- Гейне В., Пленерт В., Рихтер Н.* Лабораторная диагностика в детском возрасте. — М.: Медицина, 1982. — 121 с.
- Григорьев П.Я., Яковенко Э.П.* Диагностика и лечение болезней органов пищеварения. — М.: Медицина, 1996. — 515 с.
- Гемоглобин. Методы определения. / Методические рекомендации.* Ташкент, — 2000. — 19 с.
- Долгов В.В., Раков С.С.* — Ферменты в лабораторной диагностике.
- Жданов В.М., Ананьев В.А., Стаханова В.М.* Вирусные гепатиты. — М.: Медицина, 1986. — 256 с.
- Инструкция по применению унифицированных клинических лабораторных методов исследования / 1986.* — М.
- Крылов А.А., Кац А.М., Канторович А.С.* Руководство для лаборантов клиничко-диагностических лабораторий. — Л.: Медицина, 1981. — 238 с.
- Короткоручко В.П., Федорова А.П.* Осадочная реакция на рак (ОРР) как метод ранней диагностики опухолевой болезни (методическое письмо). // Киев. 1971.
- Клиническая оценка биохимических показателей при заболеваниях внутренних органов. / Под ред. Передерия В.Г., Хмелевского Ю.В.* — Киев. 1993. — 190 с.
- Климов А.Н.* Холестерин и клетка. // Актуальные проблемы патогенеза атеросклероза. — Л. 1985. — с. 26—27.
- Комаров Ф.И., Коровкин Б.Ф., Меньшиков В.В.* Биохимические исследования в клинике. — Л.: Медицина, 1981. — 408 с.
- Колб В.Г., Камышников В.С.* Справочник по клинической химии. — Минск: Беларусь, 1982. — 366 с.

Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. и др. Метод определения активности каталазы. Лабораторное дело. 1988. №1. — с. 16—19.

Клиническая оценка лабораторных тестов. /Под ред. Тица Н.У. — М.: Медицина, 1986. — 480 с.

Дипперт Г. Международная система единиц (СИ) в медицине /Пер. с немецкого М.Н. Молоденкова. — М.: Медицина, 1980. — 208 с.

Лабораторная диагностика хронических заболеваний печени у детей. /Методические рекомендации. — Ташкент 1983. — 14 с.

«Лабораторные методы исследования в клинике». П./р проф. В.В. Меньшова. М. Медицина, 1987.

Михайлов В.Г., Махкамова М.М., Баркаган З.С. Клинико-лабораторные методы в гематологии. — Ташкент: Медицина, 1986. — 198 с.

Медведев В.В., Волчек Ю.З. Клиническая лабораторная диагностика /Справочник для врачей. — 1995. — 208 с.

Мухин Н.А., Гареева Н.Е. Диагностика и лечение болезней почек. М.: Медицина, 1985. — 240 с.

Михайлов М.И., Попова О.В., Павлова И.П. и др. Маркеры инфицирования вирусом гепатита С и методы их выявления // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. — 1995. — Т.5, №2. — с. 21—26.

Скорняков В.И., Скворцов С.В., Кожемякин Л.А. Определение активности ЛДГ с применением оптического теста Варбурга. Лабораторное дело. 1989.5. — с. 52—55.

Справочник по функциональной диагностике в педиатрии. /Под ред. Вельтищева Ю.Е. — М.: Медицина, 1979. — с. 363—365.

Справочник по лабораторным методам исследования в клинике. — М. Медицина, 1987. — 348 с.

Ренин В.С. Современные молекулярно-клеточные основы липопротеидной теории атеросклероза. — М.: ВНИИМИ, 1987. — 68 с.

Об унификации клинических лабораторных методов исследования. /Приказ МЗ СССР №1175 от 21.11.1979. — М., 1981. — 86 с.

Оськина В.Б., Чекалина К.И., Габриэлян Н.И. и др. Среднемолекулярные пептиды спинномозговой жидкости при гнойных менингитах /Лаб. дело. — 1987. №2. — с. 23—25.

«Осадочная реакция на рак (ОРР) как метод ранней диагностики опухолевой болезни» Мет. Письмо. В.П. Короткоручко и др. Изд. «Наукова думка» Киев, 1971 г.

Тодоров И. Клинические лабораторные исследования в перинатрии. /София, 1966. — с. 771—772.

Ферментная диагностика острого инфаркта миокарда /Мет. Рекомендации. МЗ России. — Саратов, 1992. — 24 с.

Шанот В.С. Некоторые аспекты биохимического изучения злокачественных опухолей. — Журн. Всесоюз. Хим. Общества им. Д.И. Менделеева 1963, №4, с. 373—380.

Яковлев В.А. Изоферменты. — Успехи биол. Химии, 1968, №9, с. 55.

Benson E.S. //Klin. Bioch. 1986. -Vol. 19, №5. p. 262—270.

Kaplan A.P. Activation to control mechanisms of the plasma kinin-forming system and its relationship to coagulation and fibrinolysis. — J. Invest. Dermatol., 1976, ч.67, #5, part 2, p. 635.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	3
Глава 1. Организация биохимической лаборатории и техника выполнения биохимических исследований	7
Материал для клинико-лабораторных исследований	7
Автоматизация лабораторной службы	13
Правила соблюдения санэпидрежима	14
Техника безопасности	17
Первая помощь при отравлениях и ожогах	19
Должностные обязанности специалистов лабораторной службы	20
Растворы и способы выражения их концентрации	23
Глава 2. Характеристика обменных процессов и методы их исследования	26
Основные показатели белкового обмена и значение их определения при патологических состояниях	27
Методы исследования белков	34
2.1. Определение общего белка рефрактометрическим методом	34
2.2. Определение общего белка методом Лоури	36
2.3. Определение общего белка сыворотки крови по биуретовой реакции	36
2.4. Определение белковых фракций сыворотки крови методом электрофореза на бумаге	40
Определение гаптоглобина	48
2.5. Пероксидазный метод определения гаптоглобина	49
2.6. Электрофоретический метод определения гаптоглобина	51
2.7. Качественный метод определения гаптоглобина. Пробы коллоидоустойчивости белков сыворотки крови	52
2.8. Тимоловая проба	52
2.9. Сулемово-осадочная реакция	54
2.10. Проба Вельтмана	54
2.11. Осадочная реакция на рак -ОРР (метод В.П. Короткоручко)	55
2.12. Определение фибриногена (метод Стерленда)	58
«Средние молекулы» как показатель интоксикации при патологических состояниях	59
2.13. Скрининговый метод определения СМП	59
2.14. Определение концентрации СМП в сыворотке крови и моче	60
Небелковые азотистые компоненты крови	61
Методы определения небелковых азотистых соединений	66
2.15. Определение аминного азота по Крауэлу	66

2.16. Определение остаточного азота крови гипобромитным методом (метод Раппопорта — Эйхгорна)	68
2.17. Определение мочевины в сыворотке крови и в моче (по цветной реакции с диацетилмоноксимом)	71
2.18. Определение мочевины в сыворотке крови уреазным методом по реакции с фенол-гипохлоритом	74
2.19. Определение креатинина в крови и моче по цветной реакции Яффе (метод Поппера)	77
2.20. Определение креатинина в моче	80
2.21. Определение мочевой кислоты в сыворотке крови по реакции с фосфорновольфрамовым реактивом	81
Ферменты	84
Методы определения активности ферментов	87
2.22. Определение активности лактатдегидрогеназы в сыворотке крови (м-д Севела, Товарек)	87
2.23. Определение активности лактатдегидрогеназы с применением оптического теста Варбурга	90
2.24. Определение активности трансаминаз АЛТ и АСТ (м-д Райтмана, Френкеля)	91
2.25. Определение активности щелочной фосфатазы (м-д King, Armstrong)	93
2.26. Определение активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови по гидролизу р-нитрофенилфосфата (м-д Бессея, Лоури, Брока)	95
2.27. Определение активности каталазы	97
Глава 3. Обмен липидов	98
Сложные липиды	101
Биологическая роль липидов	103
Липиды плазмы крови	104
Патология обмена липидов	107
Методы исследования показателей липидного обмена	111
3.1. Определение триглицеридов в сыворотке крови по цветной реакции с ацетилацетоном	111
3.2. Определение триглицеридов в сыворотке крови колориметрическим методом	113
3.3. Определение общего холестерина в сыворотке крови по реакции Либерман-Бурхард (м-д Илька)	115
3.4. Определение холестерина в α -ЛП сыворотки крови	117
3.5. Определение холестерина пре- β -липопротеидов и ν -липопротеидов путем расчета	119
3.6. Определение β -ЛП в сыворотке крови турбидиметрическим методом (по Бурштейну, Самай)	119
3.7. Определение перекисного гемолиза эритроцитов	121
3.8. Определение уровня восстановленного глутатиона в эритроцитах крови (метод Э.Батлера, О. Дюбона, Б. Келли)	122
3.9. Определение общих липидов в сыворотке крови по цветной реакции с сульфифосфованилиновым реактивом	125
Глава 4. Характеристика углеводов и методы их исследования	127
Переваривание углеводов в желудочно-кишечном тракте	128
Регуляция углеводного обмена	130
Патология обмена углеводов	132
Особенности нарушений углеводного обмена у детей	137
Методы исследования показателей углеводного обмена	139
4.1. Определение глюкозы в крови и моче по цветной реакции с орто-толуидином	139
4.2. Определение глюкозы в моче	141
4.3. Определение глюкозы глюкозооксидазным методом	142

	4.4. Исследование углеводного обмена методами нагрузок	146
	4.5. Тест с Д(+)ксилозной нагрузкой	151
	4.6. Исследование гликопротеидов и серомукоидов (мукопротеидов). Определение сиаловых кислот в сыворотке крови (проба Гесса)	152
	4.7. Определение гексоз в сыворотке крови орциновым методом после гидролиза серной кислотой	153
	4.8. Определение серомукоида в сыворотке крови по содержанию в них гексоз	155
Глава 5.	Пигментный обмен	156
	Желчные пигменты	159
	Патология обмена билирубина	162
	Лабораторные исследования в дифференциальной диагностике желтух	164
	Методы определения показателей пигментного обмена	165
	5.1. Определение содержания билирубина и его фракций в сыворотке крови колориметрическим диазометодом	165
	5.2. Определение билирубина в сыворотке крови (микрометод)	168
	5.3. Определение билирубина в моче	170
	5.4. Определение гемоглобина в крови	173
	Определение гемоглобина цианметгемоглобиновым методом	173
Глава 6.	Система свертывания крови	175
	Патология гемостаза	183
	Методы исследования системы свертывания крови	185
	6.1. Определение времени свертывания крови (метод Ли-Уайта)	187
	6.2. Определение времени рекальцификации плазмы	187
	6.3. Аутокоагуляционный тест	188
	6.4. Определение протромбинового времени (метод Квика)	190
	6.5. Определение протромбинового времени разведенной (1:1) плазмы (по Туголукову В.Н.)	191
	6.6. Определение тромбинового времени	192
	6.7. Этиологический тест	193
Глава 7.	Водно-солевой обмен	194
	Минеральный обмен	198
	Методы исследования минерального обмена. Определение кальция	205
	7.1. Комплексометрическое определение кальция в сыворотке крови с применением мурексиды (метод Моизиса и Зака)	205
	7.2. Определение кальция в сыворотке крови фотометрическим методом	206
	7.3. Определение хлора в биологическом материале меркуриметрическим титрованием в присутствии индикатора дифенилкарбазона	207
	7.4. Определение хлоридов в поте	207
	7.5. Определение железосвязывающей способности сыворотки крови	210
	7.6. Определение калия в крови	211
Глава 8.	Клиническая оценка биохимических показателей при заболеваниях внутренних органов (Арипов О.А.)	211
Глава 9.	Контроль качества клинических биохимических исследований	260
	Литература	267

Библиотека практического врача

Арипов Абдумалик Нигматович, доктор медицинских наук, профессор

Фесенко Людмила Михайловна, кандидат биологических наук

КЛИНИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ

Методы

Зав. редакцией и редактор *О. В. Сучкова*

Художник *Ш. Одилов*

Художественный редактор *М. В. Одилов*

Технический редактор *В. В. Мещерякова*

Корректор *А. В. Михайлова*

Н/К

Сдано в набор 17.04.2000. Подписано в печать 31.05.2000. Формат 84×108 1/32.
Бумага офсетная. Печать офсетная. Гарнитура литературная. Усл. печ. л. 14,28. Усл. кр.-отг. 14,49.
Уч. изд. л. 16,21. Изд. № 9-2000 Тираж 1000 экз. Заказ № К-7894. Цена договорная.

Издательство медицинской литературы имени Абу Али ибн Сино Государственного комитета
Республики Узбекистан по печати.
700129, Ташкент, Навои, 30.

Арсенное предприятие Ташкентского полиграфического комбината.
700129, Ташкент, ул. Навои, 30.