



# Лабораторная диагностика желтух

# План лекции

- Обмен билирубина: гипербилирубинемия и билирубинурия. Образование билирубина и его фракций в крови, печени, кишечнике, почках. Фракции билирубина в крови, моче, кале. Свободный (непрямой) и конъюгированный (прямой) билирубин, уробилиноген и стеркобилиноген, желчные пигменты. Референтные значения, дифференциальная диагностика заболеваний печени.
- Типы желтух: надпеченочные, печеночные, подпеченочные.
- Токсичность билирубина. Желтуха новорождённых.
- Определение концентрации общего, свободного и связанного билирубина

# Желчные пигменты

- \* При физиологических условиях в организме взрослого человека за один час разрушается  $1-2 \cdot 10^8$  эритроцитов.
- \* Высвободившийся при этом Hb разрушается на белковую часть (глобин) и часть, содержащую железо (гем).
- \* Железо гема включается в общий обмен железа и снова используется.
- \* Свободная от железа порфириновая часть гема подвергается катаболизму, что в основном происходит в ретикулоэндотелиальных клетках печени, селезёнки и костного мозга.

# БИЛИРУБИН

- \* **Билирубин** - оранжево-желтый пигмент, образующийся, в основном, при разрушении стареющих эритроцитов.
- \* Он был обнаружен *R. Virchow* в 1849 г. и назван «желтым» пигментом «гематоином». Термин «билирубин» был предложен *Stadeler* в 1864 г. В 1942 г. *Fisher* и *Plieninger* синтезировали билирубин IX $\alpha$  и расшифровали его структуру.
- \* Около 85% всего билирубина образуется из гема «старых» эритроцитов, разрушающихся в ретикулоэндотелиальных клетках печени, селезенки и костного мозга.
- \* Остающиеся 15% образуются из предшественников эритроцитов, разрушающихся в костном мозге (так называемый неэффективный эритропоэз), и от расщепления других гемсодержащих белков.

# Фракции билирубина.

- \* При хроматографии выявили 4 фракции билирубина:
  - \* Неконъюгированный билирубин ( $\alpha$ -билирубин),
  - \* Моноглюкуронид ( $\beta$ -билирубин)
  - \* Диглюкуронид билирубина ( $\gamma$ -билирубин).
  - \* Билирубин, прочно связанный с белком ( $\delta$ -билирубин).
- \* Билирубин, который иногда называют билипротеином, образуется при ковалентном связывании конъюгированного билирубина с альбумином. Период его полужизни, как и у альбумина, составляет 17–20 дней.
- \* Образованием  $\delta$ -билирубина объясняют длительную желтуху у реконвалесцентов после гепатита или обструкции желчных путей.

# Стеркобилин и стеркобилиноген

- В норме большая часть бесцветных мезобилиногенов (уробилиногенов), образующихся в толстой кишке, окисляется в стеркобилиноген, который в нижних отделах толстой кишки (в основном в прямой кишке) окисляется до стеркобилина и выделяется с калом.
- Лишь небольшая часть стеркобилиногена (уробилина) всасывается в нижних участках толстой кишки в систему нижней полой вены и в дальнейшем выводится почками с мочой.
- Следовательно, в норме моча человека содержит следы уробилина, но не уробилиногена.

# Мочевая экскреция желчных пигментов

- Уровень уробилиногена в моче у здоровых людей невысок.
- Он может повышаться за счет увеличения фекального уробилиногена (стеркобилиногена) при гемолизе, а также при повышенном содержании связанного билирубина в плазме.
- Клиническое значение имеет то, что при нарушении функции печени уробилиноген может быть обнаружен в моче до того, как выявляется желтуха.
- При механической желтухе уробилиноген в моче отсутствует.
- Билирубин в моче (желчные пигменты) появляется только при увеличении в крови связанного (прямого) билирубина.

# Желтуха

- **Синдром, развивающийся вследствие накопления в крови избыточного количества билирубина**
- Причиной любой желтухи является нарушение равновесия между образованием и выделением билирубина.
- В клинике диагностируется на основании по окрашиванию кожи в различные оттенки желтого цвета
- Интенсивность зависит от кровоснабжения органа. Поэтому, рубцы дольше остаются желтыми
- Билирубин, накапливаясь в коже, придает ей желтый цвет. В дальнейшем, при окислении билирубина в биливердин, желтуха приобретает зеленоватый оттенок. При длительной желтухе кожа имеет черноватый оттенок
- Возможна желтая окраска кожи при употреблении акрихина и некоторых продуктов, содержащих каротин (апельсины, тыква, морковь)



# Механизмы развития желтухи

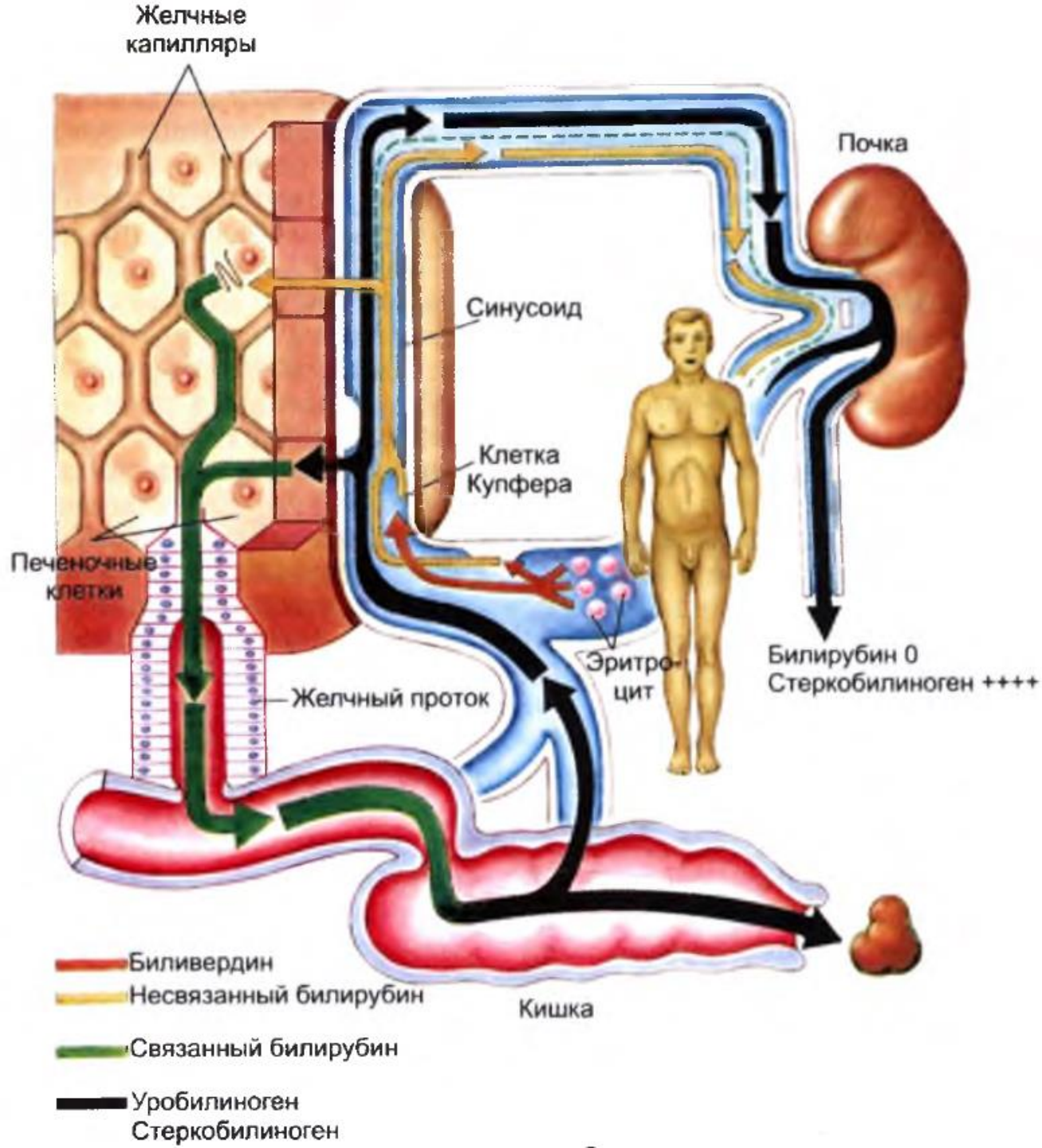
- Повышение нагрузки билирубином на гепатоциты.
- Нарушение захвата и переноса билирубина в гепатоцит.
- Нарушение процессов конъюгации.
- Нарушение экскреция билирубина в жёлчь через канальцевую мембрану или обструкция более крупных жёлчных путей.

# Типы желтухи

- Надпечёночная (гемолитическая)
- Печеночная (печёночно-клеточная, паренхиматозная)
- Подпеченочная (холестатическая), обтурационная.

# Надпеченочная желтуха.

- Обусловлена чрезмерным образованием билирубина, превышающим способность печени к его выведению.
- Практически это всегда гемолиз, внутрисосудистый или внутриклеточный, с повышением непрямого (несвязанного) билирубина в крови и увеличением стеркобилиногена в моче и кале.
- Параллельно обычно развиваются ретикулоцитоз и анемия.
- При хроническом гемолизе образуются пигментные конкременты в желчевыводящих путях.
- Другими, редкими причинами повышенного образования билирубина и желтухи могут быть инфаркты различных органов (чаще легких) и обширные гематомы (например, расслаивающая гематома аорты).
- Желтуха более выражена при сопутствующих заболеваниях печени



**Обмен  
билирубина при  
надпеченочной  
желтухе.**

# Надпеченочная желтуха. Лабораторные показатели.

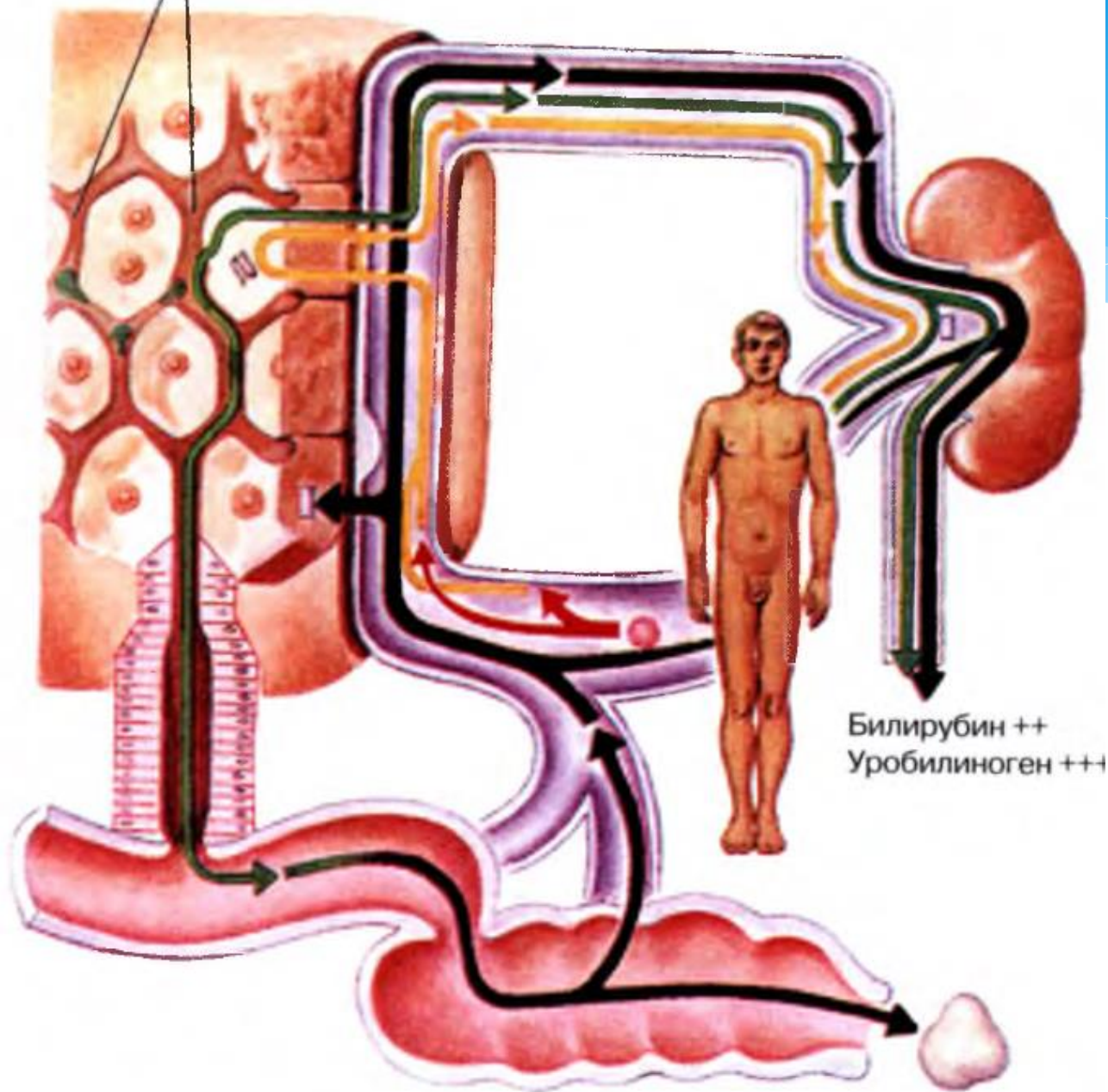
- Уровень общего билирубина в сыворотке повышается
- Активность сывороточных трансаминаз и ЩФ сохраняется в пределах нормы.
- Билирубин представлен в основном неконъюгированной фракцией.
- В моче билирубин не выявляется.
- Развивается при гемолизе и наследственных нарушениях обмена билирубина.

# Печеночноклеточная желтуха

- Может быть обусловлена изолированным или комбинированным нарушением
  - захвата,
  - связывания
  - выведения билирубина



Поврежденные  
гепатоциты



Обмен  
билирубина при  
печеночной  
желтухе.

# Печеночноклеточная желтуха.

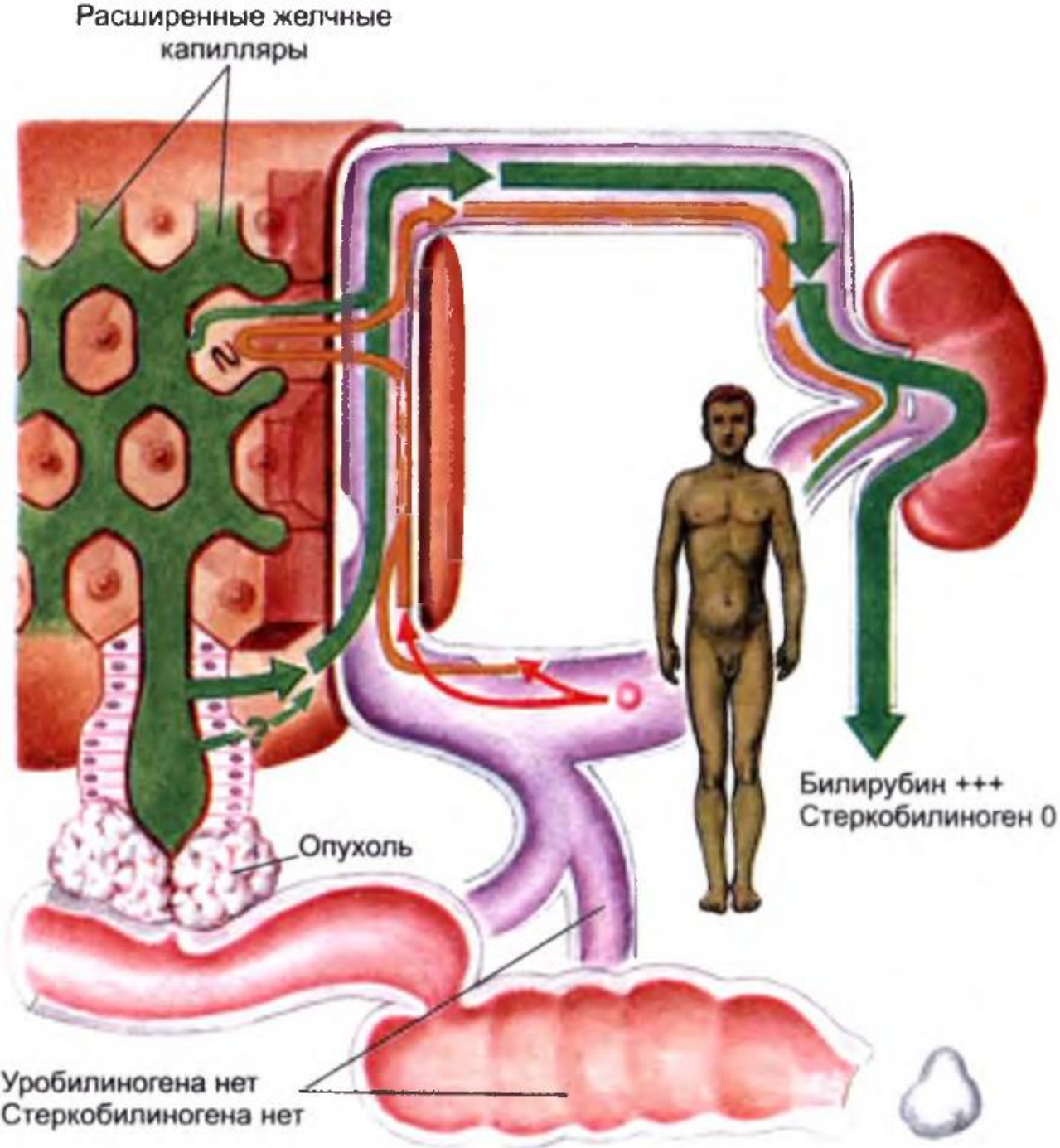
## Клиника.

- Обычно развивается быстро и имеет оранжевый оттенок.
- Больных беспокоят выраженная слабость и утомляемость.
- Возможна печёночная недостаточность (нарушения психического статуса, «хлопающий» тремор, спутанность сознания, кома).
- Задержка жидкости - увеличение массы тела, отёки и асцит.
- Вследствие нарушения синтеза печенью факторов свёртывания крови возможны кровоподтёки, как после венопункций, так и спонтанные.
- При биохимическом исследовании выявляют повышение активности сывороточных трансаминаз; при длительном течении заболевания возможно также снижение уровня альбумина в сыворотке. При внутripеченочном холестазае – повышение ЩФ желчных кислот



# Подпеченочная желтуха

- Эта желтуха является по существу холестатической, но препятствие оттоку желчи находится во внепеченочных желчевыводящих путях.
- Чаще всего это конкременты, опухоли и стриктуры. Характерно повышение уровня щелочной фосфатазы и желчных кислот с возникновением кожного зуда



## Обмен билирубина при подпеченочной желтухе

# Подпеченочная желтуха

- Значительного нарушения состояния больного (помимо симптомов основного заболевания) не происходит, отмечается интенсивный зуд.
- Желтуха прогрессирует, в сыворотке повышаются уровень конъюгированного билирубина, активность печёночной фракции ЩФ, ГГТП, а также уровень общего холестерина и конъюгированных жёлчных кислот.
- Вследствие стеатореи уменьшается масса тела и нарушается всасывание витаминов А, Д, Е, К, а также кальция.

# Токсический эффект на клетки избытка билирубина.

- \* При избытке содержания билирубина в крови он становится основным повреждающим фактором — ингибирует активность митохондриальных ферментов, нарушает синтез ДНК, блокирует синтез белка и процессы фосфорилирования.
- \* Обладая сродством к мембранным фосфолипидам, билирубин замедляет поглощение тирозина, что нарушает процессы синаптической передачи.
- \* Билирубин способен блокировать работу ионных каналов, что связывают с нарушением нервной проводимости, особенно в слуховом нерве.
- \* Билирубин ингибирует ионный обмен и транспорт воды в почке, чем объясняют отек нервных клеток, развивающийся при билирубиновой энцефалопатии.

# Билирубин. Исследуемый материал.

- \* Для определения концентрации общего билирубина методами, основанными на реакции диазосочетания, используют сыворотку или плазму.
- \* Билирубин как химическое соединение чрезвычайно нестабилен и разрушается при освещении и высокой температуре, исследуемые образцы должны быть защищены от воздействия окружающего света в ходе анализа.
- \* Концентрация билирубина может снизиться на 30–50% за 1 ч, если образец сыворотки или плазмы подвергают воздействию прямого солнечного света.
- \* После отделения клеток крови от жидкой части и хранения сыворотки или плазмы в темноте уровень билирубина не меняется в течение 2 дней при комнатной температуре, 4 дня - при 4 С, и в течение неопределенно долгого периода при 20 С.

## ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ, ОКАЗЫВАЮЩИЕ ВЛИЯНИЕ НА КОНЦЕНТРАЦИЮ БИЛИРУБИНА В КРОВИ

- \* Прием пищи (концентрация билирубина после 48-часового голодания может повыситься в 2 раза, после еды – снижается на 20–25%);
- \* Суточные колебания в течение суток могут достигать 15–30%;
- \* Физическая нагрузка – повышение до 30%;
- \* Прием оральных контрацептивов – снижение до 15%;
- \* Раса - билирубин на 33% ниже у афро-американских мужчин, на 15% ниже у афро-американских женщин
- \* Беременность - снижается ко второму триместру на 33%;
- \* Освещение образца - свет способствует превращению неконъюгированного билирубина в фотоизомеры, что приводит к снижению в образце концентрации общего билирубина на 0,34 мкмоль/ л

# Методы определения билирубина.

- \* Спектрофотометрические методы
- \* Фотометрические методы после окисления
- \* Диазометоды
- \* Электрохимические методы с использованием платинового и ртутного электродов
- \* Хроматографическое разделение отдельных фракций билирубина.

# Технология «сухой» химии.

- \* Разработаны два подхода с использованием технологии сухой химии в виде тест-полосок.
  - \* Для определения общего билирубина применена модификация диазотирующей реакции, аналогичной реакции в методе *Jendrassik-Grof*.
  - \* Конъюгированный и неконъюгированный билирубин определяют после связывания со сложным гидрофобным катионоактивным полимером. Реакция приводит к смещению спектра отражения билирубина - неконъюгированный билирубин обладает более высокой поглощающей способностью по сравнению с конъюгированным билирубином при 460 нм. Анализатор позволяет оценить обе фракции по отражению при 400 нм и 460 нм.



# Хроматографический метод.

- \* Использование высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) позволяет преодолеть многие проблемы, связанные с нестабильностью билирубина и его метаболитов.
- \* Для калибровки используют очищенные препараты конъюгатов билирубина. В одном из методов конъюгаты билирубина определяют после их превращения в соответствующие метильные производные.

# Билирубин. Погрешности определения.

- \* Гемолиз может или завышать, или занижать результаты определения концентрации билирубина. Направленность эффекта зависит как от концентрации билирубина, так и концентрации гемоглобина в образце.
- \* Липемия способствует ложному завышению концентрации билирубина.
- \* Мутная сыворотка вызывает артефакты при спектрофотометрии.
- \* Использование пробирок, содержащих барьерный гель для получения образцов крови, не приводит к изменению концентрации билирубина после 1 нед хранения образцов.



**Вопросы?**