

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ  
КАФЕДРА КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

**Методические разработки для студентов**  
**по проведению практических занятий**  
**дисциплины «Клиническая лабораторная диагностика: лабораторная аналитика,**  
**менеджмент качества, клиническая диагностика»**

**Часть I**

УДК  
ББК  
К

**Рецензенты:**

зав. кафедрой внутренних болезней педиатрического  
и стоматологического факультетов д. м. н. профессор *М. Е. Стаценко*  
зав. кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии с курсом клинической  
микробиологии ВолгГМУ, д. м. н., профессор *В. С. Замираев*

**Авторы:**

к. м. н., доцент *Е. А. Загороднева*  
к.м.н., доцент *К. П. Вахания*  
к.м.н., доцент *Н. Г. Краюшкина*  
ассистент *Е. С. Рожкова*  
ассистент *В.Н. Павловская*

Под редакцией д. м. н., профессора А.Т. Яковлева

**Клиническая лабораторная диагностика: Учебное пособие /** Е.А. Загороднева, К. П. Вахания и др. / под ред. д. м. н., проф. А. Т. Яковлева – Волгоград, 2020. – с.

В учебном пособии даны фундаментальные основы клинической лабораторной диагностики, что необходимо для формирования понимания механизмов развития патологических процессов в организме человека, для интерпретации методов лабораторной диагностики, профилактики и лечения.

Учебное пособие предназначено для студентов, обучающихся по специальности 060601 «Медицинская биохимия» медико-биологического факультета ВолгГМУ.

© Волгоградский государственный  
медицинский университет, 2020

© Авторы, указанные на обороте  
титального листа, по темам, 2020

## Содержание

№	Разделы:	Стр.
1.	Техника безопасности.....	4
2.	Организация лабораторной службы .....	11
3.	Вопросы метрологии и стандартизации .....	15
4.	Контроль качества лабораторных анализов.....	25
5.	Получение и подготовка биологического материала для исследований.....	35
6.	Биохимические методы исследования.....	44
7.	Лабораторная диагностика заболеваний печени .....	53
8.	Лабораторная диагностика желтух.....	64
9.	Исследование белкового состава крови .....	78
10.	Лабораторная диагностика заболеваний поджелудочной железы.....	91
11.	Лабораторная диагностика сахарного диабета.....	99
12.	Лабораторная оценка степени риска осложнений при сахарном диабете.....	110
13.	Лабораторная диагностика заболеваний сердечно-сосудистой системы.....	119
14.	Клинический и биохимический анализ мочи в диагностике заболеваний почек.....	148
15.	Тесты для самоконтроля.....	165
16.	Рекомендуемая литература.....	170

### **Тема занятия 1: Техника безопасности.**

**Цель занятия:** Знакомство с организацией лабораторной службы, санитарно-противоэпидемическим режимом и этическими аспектами работы КДЛ.

#### **Перечень знаний и практических навыков:**

- Знать правила техники безопасности при работе в лаборатории.
- Освоить правовые аспекты лабораторной службы.
- Уметь соблюдать санитарно-противоэпидемический режим при работе с биологическим материалом
- Охарактеризовать вопросы этики и деонтологии в работе КДЛ.

**Все мероприятия, направленные на предупреждение биологической опасности в условиях лаборатории, можно подразделить на 3 группы:**

- организационные меры;
- применение индивидуальных и коллективных защитных средств;
- соблюдение дезинфекционного режима.

#### **Организационные мероприятия**

В каждой лаборатории выделяется ответственный за технику безопасности, который обязан проводить соответствующий инструктаж среднего и младшего медицинского персонала при приеме на работу, а в последующем – не реже одного раза в квартал. О прохождении инструктажа делается отметка в специальном журнале. Для облегчения обучения младшего персонала в лабораториях с учетом местных условий составляются памятки по мерам безопасности, которые используются при периодическом инструктаже, а также размещаются непосредственно на рабочих местах.

Помещения КДЛ можно использовать только по их прямому назначению, проведение в них каких-либо других работ не разрешается.

Клинико-диагностическая лаборатория должна быть обеспечена водопроводом, горячим водоснабжением, канализацией, центральным отоплением.

Помещения лаборатории должны быть оборудованы приточно-вытяжной вентиляцией с механическим побуждением. Вентиляция во всех помещениях должна включаться до начала работы.

Независимо от наличия приточно-вытяжной вентиляции в лабораториях должны быть легко открывающиеся форточки, кроме специальных боксов бактериологической лаборатории.

В помещениях для проведения исследований мочи и кала, биохимических, серологических и гормональных исследований следует устанавливать вытяжные шкафы.

При размещении оборудования особое внимание уделяют аппаратам – потенциальным источникам биологического аэрозоля. По этой причине рекомендуется размещать центрифуги в отдельных помещениях, в которых не предусматривается постоянное пребывание персонала.

Ядовитые средства должны храниться в отдельной комнате в сейфах под замком. Ключи должны храниться у лица, ответственного за их хранение, – у заведующего КДЛ.

#### **Индивидуальные и коллективные защитные средства**

Минимальный набор средств индивидуальной защиты при работе с биологическим материалом включает медицинский халат, шапочку и резиновые перчатки. При угрозе разбрызгивания биологического материала дополнительно используют маски, очки, клеенчатый фартук. Набор спецодежды, используемый при работе с материалом, подозрительным на инфицированность возбудителями I-II групп патогенности,

регламентирован санитарными правилами «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности», СП 1.2.011-94. Работа в лабораториях диагностики СПИДа осуществляется в соответствии с режимом работы с возбудителями III группы патогенности.

Смена спецодежды в обычных КДЛ осуществляется не реже 2 раз в неделю, а при возникновении аварийных ситуаций – немедленно. В случае попадания на одежду биологического материала, перед тем как снять ее, загрязненное место обрабатывают дезинфицирующим раствором. Стирка одежды на дому категорически запрещена.

Резиновые перчатки обязательны для использования при работе не только с кровью, но и с любым биологическим материалом. Необходимо избегать уколов и порезов. Все повреждения кожи на руках должны быть закрыты лейкопластырем.

В случае загрязнения кожных покровов кровью или другими биологическими жидкостями следует немедленно обработать их в течение 2 минут тампоном, обильно смоченным 70%-ным спиртом, вымыть под проточной водой с мылом и вытереть индивидуальным тампоном.

При загрязнении перчаток кровью их протирают тампоном, смоченным 3%-ным раствором хлорамина или 6%-ным раствором перекиси водорода.

При подозрении на попадание крови на слизистые оболочки их немедленно обрабатывают струей воды, 1%-ным раствором борной кислоты или вводят несколько капель нитрата серебра; нос обрабатывают 1 %-ным раствором протаргола; рот и горло прополаскивают 70%-ным спиртом или 1%-ным раствором перманганата калия.

Запрещается пипетирование крови ртом; следует использовать автоматические пипетки, а при их отсутствии – резиновые груши.

Важный этап в предупреждении внутрилабораторного заражения – грамотная транспортировка биологического материала в лабораторию. Материал должен быть помещен в надежно закрывающуюся посуду, сопроводительная документация должна прикладываться в отдельном целлофановом пакете. Для доставки материала в центральную диагностическую лабораторию из отделений больницы используют специальные металлические или пластмассовые маркированные закрывающиеся ящики. После разгрузки они обязательно обрабатываются дезинфицирующими растворами.

Распаковка материала, доставленного в лабораторию, проводится в специально отведенном для этого месте. Персонал работает в перчатках, а емкости с материалом помещают на эмалированные или металлические подносы.

#### Соблюдение дезинфекционного режима

Лабораторные инструменты, иглы, капилляры, предметные стекла, пробирки, меланжеры, счетные камеры, кюветы фотоэлектрокалориметра, пипетки, наконечники, резиновые груши и другая посуда после каждого использования должны подвергаться дезинфекции.

Использованные изделия промывают в емкости с водой. Промывные воды обеззараживают кипячением в течение 30 мин или засыпают сухой хлорной известью в соотношении 200 г на 1 л, перемешивают и обеззараживают в течение 60 мин. Промытые изделия кипятят в закрытой емкости в воде 30 мин или в 2%-ном растворе соды в течение 15 мин. (В случае кипячения изделий в 2%-ном растворе соды дальнейшая предстерилизационная очистка не проводится).

Лабораторные инструменты могут быть обеззаражены погружением в дезинфицирующий раствор на 60 мин. В качестве дезинфицирующих используются

следующие растворы: 3%-ный раствор хлорамина; 6%-ный раствор перекиси водорода; 6%-ный раствор перекиси водорода с 0,5%-м моющим средством; 4%-ный раствор формалина; 0,5%-ный раствор нейтрального гипохлорита кальция; 0,5%-ный сульфохлорантин.

Изделия должны быть полностью погружены в раствор. При дезинфекции изделий, имеющих внутренние каналы, раствор дезинфектанта сначала прокачивают через них с помощью груши для удаления остатков биологического материала, а затем погружают в новую емкость, заполненную дезраствором.

Емкости для дезрастворов должны быть четко промаркированы и иметь крышки. В маркировке емкости указывают: название дезраствора, его концентрацию, назначение и дату приготовления. Растворы дезинфектантов используются однократно. Каждая партия сухих хлорсодержащих дезинфектантов перед использованием должна подвергаться контролю на содержание активного хлора.

Растворы перекиси водорода готовят ежедневно, хлорамина – на две недели, хлорной извести, НГК – на шесть дней. Замена дезраствора в рабочих емкостях проводится ежедневно.

Кварцевые, стеклянные, пластмассовые кюветы измерительной аппаратуры, пластиковые пробирки аппаратуры обеззараживают погружением в 6%-ный раствор перекиси водорода и промывают проточной водой.

С предметных стекол с фиксированным и окрашенным мазком крови после проведения микроскопии удаляют остатки иммерсионного масла, стекла кипятят в мыльном растворе не менее 15 мин до полного отхождения краски, затем промывают проточной водой, подсушивают на воздухе и протирают.

Остатки крови, мочи, спинномозговой жидкости и т. д., пробы, содержащие разведенную сыворотку без добавления кислот, щелочей, сливают в специальную тару и обеззараживают сухой хлорной известью в соотношении 1:5 в течение 1 ч. Посуду из-под мочи, кала обрабатывают дезраствором, но не стерилизуют.

Для обеззараживания поверхностей рабочих столов, емкостей для транспортировки материала и т. п. проводят их двукратное обтирание ветошью, смоченной 6%-ным раствором НГК, 0,5%-ным раствором сульфохлорантина. Использованную ветошь сбрасывают в специально выделенную емкость с дезинфицирующим раствором, маркированную «Для дезинфекции использованной ветоши».

Перчатки после окончания работы обеззараживают погружением в 3%-ный раствор хлорамина или 6%-ный раствор перекиси водорода на 1 ч.

Одноразовый инструментарий и посуду утилизируют в паровом стерилизаторе (режим: температура 132°C; давление – 2 кгс/см<sup>2</sup>, время – 30 мин), после чего выбрасывают. Эффективность обеззараживания при этом контролируют по расплавлению химического теста.

### **Работа в бактериологических лабораториях с микроорганизмами III-V групп патогенности**

При работе в бактериологических лабораториях с микроорганизмами III-IV групп патогенности в дополнение к вышеизложенному соблюдается ряд правил, обусловленных присутствием заведомо инфицированного материала и чистых культур микроорганизмов.

Работа с патогенными микроорганизмами возможна только после получения соответствующей лицензии в органах Госсанэпиднадзора России в соответствии с постановлением Правительства РФ от 3.04.1996 г. № 390. В помещениях,

предназначенных для работы с инфицированным материалом, запрещается прикасаться к исследуемому материалу руками, все манипуляции с ним, а также с культурами микроорганизмов проводятся только с помощью инструментов. Посевы следует выполнять вблизи зажженной горелки, обжигая в процессе работы края пробирок, петли и шпатели. Запрещается переливать инфицированные жидкости из сосуда в сосуд через край, оставлять на столах нефиксированные мазки.

Весь инструментарий должен быть дезинфицирован обжиганием или погружен в банки с дезинфицирующим раствором непосредственно после использования.

После завершения работ персонал бактериологических лабораторий обязан провести дезинфекцию рабочего стола и рук, бокса, помещения. Полы моют с применением дезинфицирующего раствора, мебель и оборудование протирают смоченной дезрастворами ветошью. Помещение бокса не реже 1 раза в неделю моют горячей водой с моющими и дезинфицирующими средствами. По окончании уборки помещения облучают бактерицидными лампами в течение 30–60 мин. Лампы устанавливают из расчета мощности 2,5 Вт/м<sup>3</sup>.

### **Уборка**

Влажная уборка помещений лаборатории проводится ежедневно с применением моющих и дезинфицирующих средств. Один раз в месяц в помещениях, где проводится работа с кровью, сывороткой, делают генеральную уборку с использованием 3%-ного раствора хлорамина, хлорной извести и т. д. Во время генеральной уборки тщательно моют стены, оборудование, мебель, проводят очистку полов от наслоений, пятен и т. д. Генеральные уборки проводят по утвержденному графику.

### **Предстерилизационная очистка и стерилизация**

После дезинфекции лабораторный инструментарий, соприкасающийся с раневой поверхностью или слизистыми оболочками обследуемого, подлежит обязательной предстерилизационной очистке и стерилизации в соответствии с ОСТ 42-21-2-85 «Стерилизация и дезинфекция изделий медицинского назначения». Предстерилизационную очистку проводят с применением моющих растворов. Для приготовления 1 л моющего раствора отмеривают 5 г стирального порошка без биодобавок, 16 мл 33%-ного раствора перекиси водорода и 979 мл воды. Моющий раствор можно использовать в течение суток, если цвет раствора не изменился.

При проведении очистки изделия замачивают при полном погружении в моющем растворе, подогретом до +50 °С, на 15 мин. Каждое изделие моют в растворе при помощи ерша и ватно-марле-вого тампона не менее 0,5 мин, затем ополаскивают проточной водой в течение 10 мин, а затем – дистиллированной водой.

Качество предстерилизационной очистки изделий оценивают на наличие крови путем постановки амидопириновой или азопирамовой пробы, на наличие остаточных количеств щелочных компонентов моющего вещества – путем фенолфталеиновой пробы.

Самоконтроль в КДЛ проводят ежедневно, контролю подвергают не менее 1 % обработанных изделий одного наименования, но не менее 3-5 единиц. При положительной пробе на кровь или моющее средство всю группу контролируемых изделий подвергают повторной обработке до получения отрицательных результатов.

После предстерилизационной очистки проводят стерилизацию инструментария и посуды. Стерилизация – это полное уничтожение микроорганизмов и их спор. Методы, средства и режимы стерилизации изделий медицинского назначения определены стандартом ОСТ 42-21 -2-85.

*Используемые в лабораторной практике методы стерилизации можно подразделить на несколько групп:*

- Физические методы: стерилизация паром; стерилизация воздушная; стерилизация излучением.
- Химические методы: стерилизация газами; стерилизация растворами.

#### Стерилизация паром

Стерилизация паром под давлением является наиболее универсальным методом. Она реализуется с помощью специального устройства – парового стерилизатора (автоклава). Выбор режима стерилизации определяется видом материала.

К работе на паровых стерилизаторах допускаются только лица, прошедшие специальное обучение и имеющие удостоверение на право работы установленного образца. Не реже чем раз в 3 года знания такого лица подлежат повторной проверке с соответствующей отметкой в удостоверении.

#### Воздушный метод стерилизации

Воздушный метод стерилизации используется в случае, если обработке подвергаются изделия или материалы, которые нельзя стерилизовать паром, например масла, порошки, а также изделия, выполненные из корродирующих металлов, стекла и термостойких пластиков (силиконовой резины).

#### **Для проведения обработки используют воздушные стерилизаторы-ГИСС.**

В ОСТ 42-21-2-85 приводятся режимы стерилизации изделий медицинского назначения с использованием сухого горячего воздуха:

- 180 °С при времени экспозиции 60 мин;
- 160 °С при времени экспозиции 150 мин.

Весь цикл работы стерилизатора включает время на разогрев стерилизатора, время на стерилизацию аппарата и обычно составляет 2-4 ч в зависимости от объема стерилизационной камеры и количества стерилизуемых изделий.

В воздушные стерилизаторы разрешается укладывать только чистые и сухие изделия, причем последние либо помещаются в металлические контейнеры, либо упаковываются в пакеты из крафт-бумаги.

Швы на бумажных пакетах заклеивают клеем, состоящим из 10%-ного поливинилового спирта или 5%-ного крахмала. В упаковке из бумаги время хранения стерильных изделий составляет не более 3-х суток. Изделия, простерилизованные без упаковки, должны быть использованы непосредственно после стерилизации.

#### **Контроль за проведением стерилизации**

Контроль за проведением стерилизации предусматривает проведение контроля режимов стерилизации и контроль стерильности изделия.

Сотрудники ЛПУ осуществляют самоконтроль режима стерилизации с помощью химических тестов, например термохимических индикаторов, выпускаемых НПФ «Винар», которые меняют свой цвет в зависимости от способа и режима стерилизации.

Наиболее достоверно оценить эффективность работы стерилизатора позволяет бактериологический метод. В нашей стране в соответствии с «Методическими указаниями по контролю работы паровых и воздушных стерилизаторов» (МУ № 16/6-5 28.2.91) в качестве биотестов используют высушенные споры *Bacillus Stearotherophilus* (штамм G) – для контроля воздушных стерилизаторов.

#### Химические методы стерилизации

Химические методы стерилизации в лабораторной практике используются крайне редко, т. к. стерилизация растворами в условиях лаборатории не технологична. Простерилизованное изделие необходимо отмывать от стерилизанта большими объемами стерильной воды в асептических условиях, а сроки хранения стерильных изделий, перенесенных после обработки в заранее простерилизованные емкости, не велики (не более 3 суток).

### **Меры безопасности при аварийных ситуациях КДЛ**

Персонал лаборатории должен быть обучен действиям при аварийных ситуациях, а в лаборатории всегда должно иметься все необходимое для ликвидации их последствий. При проливе или разбрызгивании биоматериалов о происшествии необходимо поставить в известность зав. КДЛ, который определяет вид и объем дезинфекционных мероприятий. Все случаи аварий в КДЛ любого профиля подлежат обязательной регистрации во внутрिलाбораторном журнале по технике безопасности.

В случае разрушения сосудов с материалом во время центрифугирования аварийные мероприятия начинают проводить не ранее чем через 30-40 мин, после осаждения биологического аэрозоля. В гнездо ротора заливают на 60 мин один из дезинфицирующих растворов, после чего переносят содержимое гнезда в сосуд с дезраствором. Затем ротор, стенки и крышки центрифуги протирают ветошью, смоченной в дезрастворе.

Непосредственно на рабочих местах должны находиться аптечки, содержащие стерильные ватные и марлевые тампоны, 70%-ный спирт, 1%-ный раствор нитрата серебра, 1%-ный раствор протаргола, 0,05%-ный раствор перманганата калия, 1 %-ный спиртовой раствор йода, лейкопластырь.

При повреждении кожи из раны выдавливают кровь, после чего обрабатывают поврежденное место сначала 70%-ным спиртом, а затем йодом.

### **Вопросы этики и деонтологии в лабораторной практике.**

В настоящее время проблемы этики и деонтологии, включая вопросы общения, становятся особенно актуальными и социально значимыми, что обуславливает необходимость поиска путей повышения действенности и эффективности воспитания медицинских работников.

Деонтологию в работе клинической лаборатории определяют как науку о моральном, эстетическом и интеллектуальном облике человека, посвятившего себя благородному делу – заботе о здоровье человека. Эта наука о взаимоотношениях между медиками, больными и их родственниками, а также между коллегами в медицинском коллективе и социальными учреждениями, участвующими в борьбе за жизнь и здоровье людей.

В комплексном обследовании пациента лабораторные методы исследования углубляют данные объективного осмотра и помогают расшифровать и понять сущность субъективных проявлений болезни. Вспомогательные лабораторные методы исследования имеют очень важное значение для ранней диагностики и диагностики заболеваний, протекающих бессимптомно. Таким образом, роль лаборатории в обеспечении медицинской помощи пациентам исключительно велика, от качества их работы зависит не только успех лечебно-диагностического процесса.

Для будущего медицинского работника строгое соблюдение этических норм должно стать неукоснительным правилом его жизни и поведения в семье, на улице, в общественных местах. Это поможет ему почти автоматически, без особых усилий выполнять их повседневно в профессиональной медицинской деятельности.

Деонтология в лабораторной работе включает следующие аспекты:

- взаимоотношения фельдшера-лаборанта и врача-клинициста;
- взаимоотношения специалиста с пациентом;
- взаимоотношения между коллегами;
- соблюдение соответствующей дисциплины с целью предупреждения ятрогенных заболеваний;
- предупреждение ошибок в лабораторной работе и др.

Производственная работа врача клинической лабораторной диагностики включает следующие этапы:

- взятие или прием материала от больного для анализа;
- исследование этого материала;
- заключение по результатам исследования;
- выдача результатов анализа.

Значительное количество врачей КЛД постоянно или периодически связаны непосредственно с пациентом. В данном контексте особое значение приобретает первая встреча с пациентом, результат которой зависит от взаимопонимания. Именно принятый врачом при первой встрече стиль общения в дальнейшем определит конструктивность общения в целом. Пациенты нуждаются в проявлении должного внимания и чувства сострадания со стороны персонала лаборатории. Открывая дверь лаборатории, пациент должен видеть приветливый взгляд и слышать доброжелательные слова. К сожалению, бывают случаи, когда даже слова приветствия (“Здравствуйте”, “Добрый день”) остаются без ответа со стороны персонала. Иногда остаются без внимания и слова благодарности, сказанные пациентом.

Прямой вред наносят пациентам неприветливое, недоброжелательное, официальное, сухое обращение сотрудников лаборатории с проявлением раздражительности, нетерпеливости, обидчивости, антипатии, спешки, забывчивости, панибратства, своего превосходства, а также их громкие профессиональные разговоры, особенно возгласы, неделовая обстановка, перебранки и споры, замечания старших о недобросовестном отношении к своим обязанностям младших.

### **ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ**

1. Документы, регламентирующие деятельность КДЛ.
2. Организационные мероприятия, направленные на обеспечение биологической безопасности.
3. Использование средств индивидуальной и коллективной защиты.
4. Соблюдение санитарно-дезинфекционного режима.
5. Уборка помещений в лаборатории.
6. Стерилизация и дезинфекция инструментов.
7. Меры безопасности в аварийных ситуациях.
8. Вопросы этики и деонтологии в работе КДЛ.

### **САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ**

1. Записать протокол практического занятия с указанием цели и задач.
2. Записать правила техники безопасности и санитарно-эпидемиологический режим при работе с биологическим материалом.
3. Записать основные регламентирующие документы, приказы при работе в лаборатории.

## **Тема занятия 2: Организация лабораторной службы.**

**Цель занятия:** Знакомство с основными принципами клинической лабораторной диагностики. Основными законодательными, нормативными, методическими документами, регламентирующими деятельность лабораторной службы.

### **Перечень знаний и практических навыков:**

- Знать основы организации лабораторной службы;
- Усвоить цели, задачи и место клинической лабораторной диагностики в практической медицине;
- Знать организационные основы КДЛ
- Охарактеризовать типы клиничко-диагностических лабораторий ЛПУ
- Ознакомиться с оснащением КДЛ

**Клиническая лабораторная диагностика** представляет собой медицинскую диагностическую специальность, состоящую из совокупности исследований *in vitro* биоматериала человеческого организма, основанных на использовании **гематологических, общеклинических, паразитарных, биохимических, иммунологических, серологических, молекулярно-биологических, бактериологических, генетических, цитологических, токсикологических, вирусологических методов, сопоставления результатов этих методов с клиническими данными** и формулирования лабораторного заключения.

**Клиничко-диагностические лаборатории подразделяются на две большие группы:**

- лаборатории общего типа;
- специализированные лаборатории.

Структура лабораторной службы в основном соответствует потребностям учреждений здравоохранения в лабораторной диагностике и мониторинге за терапией больных, обеспечивая повседневные запросы лечащих врачей в наиболее распространенных исследованиях (КДЛ общего типа), экстренном их выполнении в ургентной практике (экспресс-лаборатории), а также серийное производство наиболее сложных исследований. Этим занимаются специализированные лаборатории (гематологические, цитологические, биохимические, иммунологические).

Клиничко-диагностическая лаборатория является диагностическим подразделением лечебно-профилактического учреждения и создается на правах отделения. КДЛ, независимо от подчиненности и формы собственности, должна иметь сертификат на избранный вид деятельности.

Штаты КДЛ устанавливаются в соответствии с действующими нормативными документами с учетом местных условий или рассчитываются в соответствии с объемом работы (приложение 12 к приказу МЗ РФ №380).

Оснащение КДЛ осуществляется в соответствии с профилем и уровнем лечебно-профилактического учреждения (приложение 8 к приказу МЗ РФ № 380).

КДЛ размещается в специально оборудованных помещениях, полностью соответствующих требованиям правил по устройству, эксплуатации и технике безопасности.

### **Основными задачами КДЛ являются:**

- проведение клинических лабораторных исследований в соответствии с профилем ЛПУ (общеклинических, гематологических, иммунологических, цитологических, биохимических, микробиологических и других, имеющих высокую аналитическую и диагностическую надежность) в объеме согласно заявленной номенклатуре исследований при аккредитации КДЛ в соответствии с лицензией ЛПУ;
- объем выполняемых исследований не должен быть ниже минимального объема, рекомендуемого для ЛПУ данной мощности;
- внедрение прогрессивных форм работы, новых методов исследований, имеющих высокую аналитическую точность и диагностическую надежность;
- повышение качества лабораторных исследований путем систематического проведения внутрилабораторного контроля качества лабораторных исследований и участия в программе Федеральной системы внешней оценки качества (ФСВОК);
- оказание консультативной помощи врачам лечебных отделений в выборе наиболее диагностически информативных лабораторных тестов и трактовке данных лабораторного обследования больных;
- обеспечение клинического персонала, занимающегося сбором биологического материала, детальными инструкциями о правилах взятия, хранения и транспортировки биоматериала, обеспечивающими стабильность образцов и надежность результатов. Ответственность за точное соблюдение этих правил клиническим персоналом несут руководители клинических подразделений;
- повышение квалификации персонала лаборатории;
- проведение мероприятий по охране труда персонала, соблюдение техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима в КДЛ;
- ведение учетно-отчетной документации в соответствии с утвержденными формами.

### **В соответствии с указанными задачами КДЛ осуществляет:**

- Освоение и внедрение в практику методов клинической лабораторной диагностики, соответствующих профилю и уровню лечебно-профилактического учреждения;
- Проведение клинических лабораторных исследований и выдачу по их результатам заключений.

Деятельность КДЛ регламентируется нормативными документами Минздрава России и «Положением о клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» (приложение 1 приказа МЗ№380 от 25.12.1997 г.).

### **Документы, регламентирующие деятельность КДЛ**

Основные нормативные документы Минздрава России, регламентирующие деятельность КДЛ:

- Приказ Минздрава России от 25.12.1997 № 380 «О состоянии и мерах по совершенствованию лабораторного обеспечения диагностики и лечения пациентов в учреждениях здравоохранения Российской Федерации».
- Приказ Минздрава России от 07.02.2000 № 45 «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации».
- Приказ Минздрава России от 21.12.1993 № 295 «Об утверждении положения об аккредитации клинико-диагностических лабораторий».

- Приказ Минздрава России от 05.06.1996 № 233 «Об аккредитации клиничко-диагностических лабораторий в качестве экспертных».
- Приказ МЗ СССР от 23.04.1985 № 545 «О дальнейшем совершенствовании контроля качества клинических лабораторных исследований».
- Приказ МЗ СССР от 24.12.1990 № 505 «О дальнейшем совершенствовании и развитии системы межлабораторного контроля качества клинических лабораторных исследований».
- Приказ Минздрава России от 26.01.1994 № 9 «О совершенствовании работы по внешнему контролю качества клинических лабораторных исследований».
- Приказ МЗ и МП РФ от 03.05.1995 № 117 «Об участии клиничко-диагностических лабораторий лечебно-профилактических учреждений России в Федеральной системе внешней оценки качества клинических лабораторных исследований».
- Приказ МЗ и МП РФ от 19.02.1996 № 60 «О мерах по дальнейшему совершенствованию Федеральной системы внешней оценки качества клинических лабораторных исследований».
- Приказ МЗ СССР от 04.10.1980 № 1030 «Об утверждении форм первичной документации учреждений здравоохранения».
- Приказ Минздрава России от 29.04.1997 № 126 «Об организации работы по охране труда в органах управления, учреждениях, организациях и на предприятиях системы Министерства здравоохранения Российской Федерации».
- «Правила устройства техники безопасности и производственной санитарии в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР», 1971.
- «Правила устройства, техники безопасности и производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР», 1981 г.
- «Положение о порядке учета, хранения, обращения, отпуска и пересылки культур бактерий, вирусов, риккетсий, грибов, простейших, микоплазм, бактериальных токсинов, ядов биологического происхождения», МЗ СССР от 18.05.1979.
- «Правила техники безопасности при эксплуатации изделий медицинской техники в учреждениях здравоохранения», МЗ СССР, 1985 г.
- «Инструкция по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утверждена 17.01.1991 г. МЗ СССР.
- «Инструкция по противоэпидемическому режиму в лабораториях диагностики СПИД» № 42–28/39–90 от 05.06.1990 г.
- «Правила по эксплуатации и технике безопасности при работе на автоклавах» от 30.03.1991 г.
- Санитарные правила и нормы 2.1.7.728–99. «Правила сбора, хранения и удаления отходов в лечебно-профилактических учреждениях».

#### **Номенклатура лабораторных анализов.**

Номенклатура (лат. nomenclatura – роспись имен, перечень, список) – совокупность названий, употребляемых в какой-либо отрасли науки, производства и т. д. для обозначения объектов (в отличие от терминологии, содержащей также обозначения отвлеченных понятий и категорий).

Систематика (греч. *systematikos* – упорядоченный, относящийся к системе), область знания, в рамках которой решаются задачи упорядоченного определенным образом обозначения и описания всей совокупности объектов, образующих некоторую сферу реальности.

Приказ МЗ РФ №64 от 21.07.2000 «Об утверждении номенклатуры клинических лабораторных исследований»:

1. Химико-микроскопическое исследование биол.жидкостей
2. Гематологические исследования
3. Цитологические исследования
4. Биохимические исследования
5. Коагулологические исследования
6. Иммунологические исследования
7. Химико-токсикологические исследования
8. Лекарственные средства для проведения ТЛМ
9. Микробиологические исследования

В соответствии с Государственным стандартом, во всех отраслях науки и техники, в том числе и в медицине, обязательным является применение единиц Международной системы единиц (СИ). Единицей объема в СИ является кубический метр (м<sup>3</sup>). Для удобства в медицине допускается применять единицу объема литр (л; 1 л = 0,001 м<sup>3</sup>).

Единицей количества вещества, содержащего столько же структурных элементов, сколько содержится атомов в нуклиде углерода <sup>12</sup>C массой 0,012 кг, является моль, т. е. моль – это количество вещества в граммах, число которых равно молекулярной массе этого вещества.

Количество молей соответствует массе вещества в граммах, деленному на относительную молекулярную массу вещества. 1 моль = 10<sup>3</sup> ммоль = 10<sup>6</sup> мкмоль = 10<sup>9</sup> нмоль = 10<sup>12</sup> пмоль. Содержание большинства веществ в крови выражается в миллимолях на литр (ммоль/л).

Только для показателей, молекулярная масса которых неизвестна или не может быть измерена, поскольку лишена физического смысла (общий белок, общие липиды и т. п.), в качестве единицы измерения используют массовую концентрацию – грамм на литр (г/л).

Активность ферментов в единицах СИ выражается в количествах молей продукта (субстрата), образующихся (превращающихся) в 1 с в 1 л раствора – моль/(с-л), мкмоль/(с-л), нмоль/(с-л).

### **ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ**

1. Основные задачи применения лабораторного обследования.
2. Основные лабораторные методы исследования.
3. Структура и оснащение современных лабораторий.
4. Диагностическая специфичность теста.
5. Диагностическая чувствительность теста.
6. Виды клинико-диагностических лабораторий.
7. Номенклатура лабораторных анализов.

### **САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ**

1. Записать протокол практического занятия с указанием цели и задач, основных задач лабораторного исследования.
2. Записать типы лабораторий, виды оборудования и лабораторных исследований, основные обязанности врача клинической лабораторной диагностики.

### **Тема занятия 3: Вопросы метрологии и стандартизации.**

**Цель занятия:** Освоение понятия о стандартизации в КЛД, ее задачах, цели, объектах. Знакомство с понятиями: калибровочные и контрольные материалы. Изучение источников вне- и внутрилабораторных погрешностей.

#### **Перечень знаний и практических навыков:**

- Освоить понятие о стандартизации, ее цели и задачи.
- Уметь выбирать адекватные средства и методы контроля качества.
- Охарактеризовать источники внутри- и внелабораторных погрешностей.

Создание и развитие системы стандартизации в здравоохранении направлено на достижение оптимальной степени упорядочивания в системе охраны здоровья граждан посредством широкого и многократного использования установленных положений, требований, норм для решения реально существующих, планируемых или потенциальных задач.

#### **Цели, задачи и принципы стандартизации в здравоохранении**

Целью стандартизации в здравоохранении является повышение качества профилактических и лечебно-диагностических мероприятий, решение задач сохранения и улучшения здоровья населения.

Основными задачами в области стандартизации в здравоохранении являются:

- нормативное обеспечение реализации законов в области охраны здоровья граждан и Концепции развития здравоохранения и медицинской науки в Российской Федерации;
- создание единой системы оценки показателей качества и экономических характеристик медицинских услуг, установление научно обоснованных требований к их номенклатуре, объему и качеству, обеспечение взаимодействия между субъектами, участвующими в оказании медицинской помощи;
- установление требований к условиям оказания медицинской помощи, эффективности, безопасности, совместимости и взаимозаменяемости процессов, оборудования, инструментов, материалов, медикаментов и других компонентов, применяемых в здравоохранении;
- нормативное обеспечение метрологического контроля;
- установление единых требований к лицензированию и аккредитации медицинских учреждений, подготовке, аттестации и сертификации специалистов;
- нормативное обеспечение сертификации и оценки качества медицинских услуг;
- создание и обеспечение в установленном порядке надзора и контроля за соблюдением требований нормативных документов;
- содействие обеспечению национальной безопасности страны.

**В соответствии с международной организацией по стандартизации, (ИСО, International Organization for Standardization, ISO),** которая занимается выпуском стандартов, рекомендуются следующие разновидности нормативных документов, принятые в Государственной системе стандартизации РФ:

1. Стандарт – Нормативный документ, разработанный на основе консенсуса и утвержденный признанным органом, в котором устанавливаются для всеобщего и многократного использования правила, общие принципы или характеристики, касающиеся различных видов деятельности или их результатов, и

который направлен на достижение оптимальной степени упорядочения в определенной области.

- ГОСТ (ГОСТ Р) – Государственный стандарт России
- ОСТ – Отраслевой стандарт
- СТП – Стандарт предприятия
- СТО – Стандарт объединений

В состав могут входить руководящие документы, рекомендации, методические указания.

Отраслевой стандарт – стандарт, разрабатываемый в случае отсутствия на объект стандартизации ГОСТ Р или при необходимости установления требований, превышающих установленные ГОСТ Р. Порядок разработки ОСТа устанавливается отраслевым органом государственного управления.

Региональный стандарт – стандарт, принятый региональной организацией, занимающейся стандартизацией, и доступный широкому кругу потребителей.

Национальный стандарт – стандарт, принятый национальным органом по стандартизации и доступный широкому кругу потребителей. К нему можно отнести Государственные стандарты и стандарты отрасли.

Стандарт объединений (союзов, ассоциаций объединений и др.) разрабатывается в случае отсутствия на объект стандартизации ГОСТ Р и ОСТ или при необходимости установления требований, расширяющих установленные ГОСТом Р или ОСТом; порядок разработки стандарта объединения гармонизируется с государственным и отраслевым порядком разработки и устанавливается этим объединением.

Стандарт предприятия разрабатывается в случае отсутствия на объект стандартизации ГОСТ Р и ОСТ или при необходимости установления требований, расширяющих установленные ГОСТом Р или ОСТом; порядок разработки стандарта предприятия гармонизируется с государственным и отраслевым порядком разработки и устанавливается этим предприятием.

2. **Технические условия (ТУ)** – это документ, устанавливающий технические требования, которым должны удовлетворять конкретное изделие, материал, вещество и пр. или их группа.

3. **Технический регламент** – документ (нормативный правовой акт), устанавливающий **обязательные** для применения и исполнения требования к объектам технического регулирования (продукции, в том числе зданиям, строениям и сооружениям, процессам производства, эксплуатации, хранения, перевозки, реализации и утилизации), в отличие от ИСО, ГОСТ, ТУ и других стандартов, имеющих добровольное применение.

№пп	Обозначение и наименование национального стандарта
1.	ГОСТ Р ИСО 15189-2006 Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности
2.	ГОСТ Р ИСО 15195-2006 Лабораторная медицина. Требования к лабораториям референтных измерений
3.	ГОСТ Р ИСО 17511-2006 Изделия медицинские для диагностики in vitro. Измерение величин в биологических пробах. Метрологическая прослеживаемость значений, приписанных калибраторам и контрольным материалам

№пп	Обозначение и наименование национального стандарта
4.	ГОСТ Р ИСО 18153-2006 Изделия медицинские для диагностики in vitro. Измерение величин в биологических пробах. Метрологическая прослеживаемость значений каталитической концентрации ферментов, приписанных калибраторам и контрольным материалам
5.	ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003) Лаборатории медицинские. Требования безопасности
6.	ГОСТ Р ИСО 15194-2007 Изделия медицинские для диагностики in vitro. Измерение величин в пробах биологического происхождения. Описание стандартных образцов
7.	ГОСТ Р ИСО 15193-2007 Изделия медицинские для диагностики in vitro. Измерение величин в пробах биологического происхождения. Описание референтных методик выполнения измерений
8.	ГОСТ Р 53022.1-2008 Технологии лабораторные клинические – Требования к качеству клинических лабораторных исследований» Часть 1 Правила менеджмента качества клинических лабораторных исследований
9.	ГОСТ Р 53022.2-2008 Технологии лабораторные клинические – Требования к качеству клинических лабораторных исследований» Часть 2 Оценка аналитической надежности методов исследования
10.	ГОСТ Р 53022.3-2008 Технологии лабораторные клинические – Требования к качеству клинических лабораторных исследований» Часть 3 Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов.
11.	ГОСТ Р 53022.4 -2008 Технологии лабораторные клинические – Требования к качеству клинических лабораторных исследований» Часть 4 Правила разработки требований к своевременности предоставления лабораторной информации
12.	ГОСТ Р 53079.1-2008 Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 1 Описание методов исследования
13.	ГОСТ Р 53079.2-2008 Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 2 Руководство по качеству исследований в клинико-диагностической лаборатории. Типовая модель
14.	ГОСТ Р 53079.3-2008 Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 3 Правила взаимодействия персонала клинических подразделений и клинико-диагностических лабораторий медицинских организаций при выполнении клинических лабораторных исследований
15.	ГОСТ Р 53079.4-2008 Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4 Правила ведения преаналитического этапа

№пп	Обозначение и наименование национального стандарта
16.	ГОСТ Р 53133.1-2008 Технологии лабораторные клинические. Контроль качества клинических лабораторных исследований. Часть 1 Пределы допускаемых погрешностей результатов измерения аналитов в клинико-диагностических лабораториях
17.	ГОСТ Р 53133.2-2008 Технологии лабораторные клинические. Контроль качества клинических лабораторных исследований. Часть 2 Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов
18.	ГОСТ Р 53133.3-2008 Технологии лабораторные медицинские. Контроль качества клинических лабораторных исследований. Часть 3 Описание материалов для контроля качества клинических лабораторных исследований
19.	ГОСТ Р 53133.4-2008 Технологии лабораторные медицинские. Контроль качества клинических лабораторных исследований. Часть 4 Правила проведения клинического аудита эффективности лабораторного обеспечения деятельности медицинских организаций
20.	ГОСТ Р ИСО 6710 -2009 Контейнеры для сбора образцов венозной крови одноразовые. Технические требования и методы испытаний
21.	ГОСТ Р ИСО 15189 -2009 Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности
22.	ГОСТ Р ИСО/ТО 22869 -2009 Лаборатории медицинские. Руководство по внедрению ИСО 15189:2003
23.	ГОСТ Р ИСО 22870-2009 Исследования по месту лечения. Требования к качеству и компетентности
24.	ГОСТ Р ИСО15197-2009 Системы диагностические in vitro. Требования к системам мониторинга наблюдения за концентрацией глюкозы в крови для самоконтроля при лечении сахарного диабета
25	ГОСТ Р ИСО 17593-2009 Исследования лабораторные клинические и изделия медицинские in vitro. Изделия медицинские для диагностики in vitro, применяемые для самотестирования пероральной терапии антикоагулянтами
26.	ГОСТ Р ИСО 15198-2009 Клиническая лабораторная медицина. Изделия медицинские для диагностики in vitro. Подтверждение методик контроля качества, рекомендуемых производителями пользователям
27.	ГОСТ Р ЕН 592-2010 Инструкция по применению инструментов для диагностики in vitro для самотестирования
28.	ГОСТ Р ЕН12322-2010 Изделия медицинские для диагностики in vitro. Питательные среды для микробиологии. Критерии функциональных характеристик для питательных сред
29.	ГОСТ Р ЕН 13532-2010 Общие требования к медицинским изделиям для диагностики in vitro для самотестирования

№пп	Обозначение и наименование национального стандарта
30.	ГОСТ Р ЕН 13612-2010 Оценка функциональных характеристик медицинских изделий для диагностики <i>in vitro</i>
31.	ГОСТ Р ЕН 13640-2010 Исследование стабильности реагентов для диагностики <i>in vitro</i>
32.	ГОСТ Р ЕН 13641-2010 Устранение или снижение риска инфицирования, связанного с реагентами для диагностики <i>in vitro</i>
33.	ГОСТ Р ЕН 14254-2010 Изделия медицинские для диагностики <i>in vitro</i> . Одноразовые емкости для сбора образцов у человека (кроме крови)
34.	ГОСТ Р ИСО 20776.1-2010 Клинические лабораторные исследования и диагностические тест- системы <i>in vitro</i> . Исследование чувствительности инфекционных агентов и оценка функциональных характеристик изделий для исследования чувствительности к антимикробным средствам. Часть 1. Референтный метод лабораторного исследования активности антимикробных агентов против быстрорастущих аэробных бактерий, вызывающих инфекционные болезни
35.	ГОСТ Р ИСО 20776.2 Клинические лабораторные исследования и диагностические тест- системы <i>in vitro</i> . Исследование чувствительности инфекционных агентов и оценка функциональных характеристик изделий для исследования чувствительности к антимикробным средствам. Часть 2. Оценка функциональных характеристик изделий для испытания антимикробной чувствительности

**Калибровка измерительных приборов** — установление зависимости между показаниями прибора и размером измеряемой величины. Под калибровкой часто понимают процесс подстройки показаний выходной величины или индикации измерительного инструмента до достижения согласования между эталонной величиной на входе и результатом на выходе (с учётом оговоренной точности). Например, калибровкой медицинского термометра, показывающего в ванне с температурой 36,6 °С результат на дисплее 36,3 °С, будет добавление 0,3 °С. При этом неважно, будет ли эта величина внесена в память прибора или написана на приклеенной к термометру бумаге.

Калибровка необходима для правильной работы биохимических приборов. Изначальная калибровка анализатора проводится на заводе-производителе, однако для обеспечения точности ежедневных измерений приборы с определенной периодичностью калибруют в лаборатории с использованием калибровочных растворов – промышленно произведенных жидкостей с известной концентрацией аналитов.

То есть, производится измерение концентрации анализируемого вещества в калибровочном растворе, и полученный результат сравнивается с истинной концентрацией, указанной в паспорте калибровочного материала. Далее производится настройка прибора для приведения измеренной величины в соответствие с эталонной (чаще всего меняется коэффициент пересчета оптической плотности в единицы концентрации).

Чтобы оценить, насколько результат проводимого исследования соответствует истине или выявить погрешность измерения, проводят контрольные измерения с использованием специальных образцов – контрольных материалов.

Контрольные материалы – это водные растворы стандартов, слитая сыворотка крови, приготовленная в самой лаборатории, биологический материал, изготовленный производственным путем как с исследованным, так и с неисследованным содержанием компонентов (сыворотка, плазма, клетки крови, моча, цереброспинальная жидкость и т.п.), материалы искусственного происхождения, специфические контрольные средства (мазки, микробиологические культуры, патогенные грибки, суспензии цист и т.п.).

Основными требованиями к контрольным материалам являются идентичность по физико-химическим свойствам анализируемому образцу; стабильность при длительном хранении; минимальная вариабельность состава и свойств внутри серии; пригодность для выявления систематических и случайных погрешностей. Контроль сходимости и воспроизводимости результатов исследований осуществляется с помощью контрольного материала с неисследованным содержанием; для контроля правильности используется только материал с исследованным содержанием компонентов.

Погрешность измерения бывает:

1. Внелабораторная.
2. Внутрिलाбораторная.

Доаналитические (внелабораторные) ошибки составляют около 20% всех ошибок. Их подразделяют на основные группы:

- канцелярские ошибки;
- ошибки, связанные с состоянием пациента и его подготовкой к исследованию;
- ошибки взятия проб;
- хранения биологического материала;
- хранения и чистоты реактивов, инструментов и посуды, необходимых для взятия биологического материала.

Канцелярские ошибки включают в себя ошибочных больных, ошибочные образцы, перепутывание фамилий больных или их кодирующих номеров, бланков-заказов, ошибочные заявки и прочие.

При взятии крови частой причиной искажения лабораторных анализов является гемолиз крови. В гемолизированных сыворотках завышаются результаты определения железа, калия, билирубина, холестерина, активности ферментов (лактатдегидрогеназы, кислой и щелочной фосфатаз, альдолазы и др.).

К лабораторным погрешностям может привести неправильно подобранный антикоагулянт. Так, цитрат и оксалат натрия ингибируют большинство ферментов, ЭДТА ингибирует активность щелочной и кислой фосфатаз, гепарин активизирует постгепариновую липазу, расщепляющую хиломикроны, и не может использоваться для получения плазмы на исследование показателей липидного обмена, а также для исследования коагулограммы, являясь физиологическим антикоагулянтом.

При взятии крови на коагулограмму необходимо точное соотношение антикоагулянта и крови, иначе при увеличении количества цитрата натрия выявляется ложная гипокоагуляция, а при уменьшении - происходит процесс свертывания крови и образование фибриновых сгустков.

При определении групп крови могут возникать как технические ошибки, связанные с нарушением инструкции (температурный режим, чистота посуды, нанесение сывороток

на плоскость, соотношение крови и стандартной сыворотки, время учета реакции и т.п.), так и ошибки, зависящие от качества стандартных реагентов.

Скорость оседания эритроцитов (СОЭ) у пациентов с разными заболеваниями меняется в довольно значительных пределах (от 10-12 до 50-60 мм/ч), имея существенное неспецифическое клиническое значение. На величину СОЭ оказывают выраженное влияние три группы факторов:

1. Состояние эритроцитов (количество клеток, их размеры - макро, микроциты, состояние мембраны эритроцитов, заряд мембраны).

2. Состав плазмы крови (повышенная концентрация белков острой фазы, гиперглобулинемия, гиперфибриногенемия).

3. Технические факторы (диаметр и длина капилляра, положение капилляра, вибрация, температура, световая и магнитная радиация, время седиментации, избыток антикоагулянта). Эти факторы необходимо учитывать при постановке и оценке СОЭ.

К ошибкам может привести неучет времени приема и качество пищи пациентов. Липемия искажает результаты не только показателей липидного обмена, но также и общего белка, билирубина, активности ферментов и др. В течение суток (суточные, циркадные ритмы) имеются колебания таких параметров как хлориды, фосфор, креатинин, азот мочевины, общие липиды, железо, общий белок, глюкокортикоиды.

Необходимо унифицировать время забора биологического материала, исследовать кровь, взятую натощак во избежание возникновения источников погрешностей указанного рода. Однако, в неотложных случаях взятие крови производится в любое время независимо от времени последнего приема пищи. Волнение и страх перед взятием крови могут повлиять на показатели гормонального статуса, глюкозы, калия и др. Физическая нагрузка приводит к сдвигам значений активности ферментов. Курение прежде всего искажает результаты исследования показателей липидного обмена.

Проблема медикаментозных влияний на результаты лабораторных исследований становится все более актуальной. Лекарственные вещества оказывают влияние на лабораторные показатели разными путями:

- изменяют интенсивность болезненного процесса;
- оказывают побочное действие на деятельность различных органов и систем;
- интерферируют с определенными веществами в процессе лабораторного исследования.

Химическая и физическая интерференция является частой причиной ошибочных результатов при исследовании биологических проб. Результаты лабораторных исследований нередко изменяют не сами лекарственные вещества, а их промежуточные или конечные продукты. Обнаружены достоверные изменения таких показателей как билирубин, креатинин, калий, щелочная фосфатаза, аланинаминотрансфераза после приема больших доз аскорбиновой кислоты. Поэтому собирать материал для исследования необходимо до начала приема лекарственных препаратов, а также до проведения диагностических и лечебных процедур. Так, активность КФК, ЛДГ, АсАТ увеличивается после катетеризации сердца, частых внутримышечных инъекций, кислой фосфатазы - после ректального исследования и массажа предстательной железы. Не рекомендуется брать кровь для гематологических исследований после физиопроцедур и рентгеновского облучения, после физических и умственных нагрузок. Не следует производить взятие крови на реакцию Вассермана у лихорадящих больных, после приема алкоголя, общего наркоза, обширных травм, хирургических вмешательств, приема

наркотических препаратов и препаратов наперстянки. Следует также иметь в виду, что следы детергентов в стеклянных пробирках влияют на исследование активности ферментов, показателей липидного обмена (холестерина, фосфолипидов). Использование вместо стеклянных пробирок одноразовых пластмассовых позволяет избежать указанных недостатков. Весьма существенной причиной возникновения погрешностей анализа является нарушение условий хранения проб. Длительное стояние сыворотки над эритроцитами приводит к сдвигам концентрации ряда показателей.

Некоторые вещества чувствительны к влиянию ультрафиолетовых лучей (например, билирубин), поэтому пробы нельзя держать на свету. Время стояния сыворотки над сгустком крови или плазмы над эритроцитами должно строго ограничиваться (не более 1 ч после взятия крови). При необходимости сохранить сыворотку на 2-3 месяца ее следует заморозить при  $t -20/ -70^{\circ} \text{C}$  и хранить, избегая оттаивания.

Проведение бактериологических исследований часто сопровождается ошибками, связанными с забором материала. Взятие материала может быть нестерильным или он взят из неинфицированного очага. Могут быть нарушены условия доставки исследуемого материала (продолжительная транспортировка, большой промежуток времени от забора до посева), неправильная техника посева, нарушение технологии приготовления питательных сред или некачественные среды. Иногда нарушаются условия культивирования в термостате, а также неправильная идентификация возбудителей микробов, связанная с постановкой метода или учетом результата. При целевом исследовании отрицательный ответ может быть обусловлен рядом приведенных причин. Для проведения контроля качества бактериологических исследований используется специальный материал (специальные культуры).

Иммунологические показатели у здоровых людей характеризуются индивидуальностью значений, возрастными изменениями и колебаниями под влиянием биологических ритмов и нагрузочных факторов. Подобной изменчивостью характеризуются и иммунологические параметры больных. Чтобы получить максимальную информацию от иммунограммы, необходимо знать индивидуальную иммунологическую норму пациента, проводить оценку всех показателей и их соотношений с учетом клинической картины заболевания и в динамике. В подавляющем большинстве случаев анализ иммунограммы дает возможность делать ориентировочные, а не безусловные выводы диагностического и прогностического характера.

При подготовке к исследованию общеклинического анализа мочи особых ограничений в рационе не требуется. Важным является правильность сбора мочи. Необходимо воздержаться от большого количества моркови, свеклы, а также от приема мочегонных средств, амидопирин, настоев или отваров трав. За сутки до исследования не следует менять питьевой режим. Мочу собирают в сухую, чистую стеклянную посуду утром. Хранить мочу следует в прохладном месте. При длительном хранении изменяются физико-химические свойства мочи, разрушаются клеточные элементы осадка. В случае сбора суточного количества мочи используют консерванты (кристаллы тимола, хлороформенную воду и др.).

Для цитологических исследований мокрота не должна стоять более 4 часов с момента получения, так как при более длительном хранении происходит аутолиз

элементов. Спинномозговая жидкость доставляется в лабораторию сразу же после пункции.

При невозможности непосредственного исследования кала, его сохраняют в стеклянной посуде в закрытом виде в холодильнике. Условия транспортировки биопроб могут оказать определенное влияние на точность получаемых результатов исследования. Во время транспортировки следует оберегать пробы от сильного встряхивания и перегрева. Нередко источники погрешностей не поддаются качественному контролю.

Внутрилабораторные ошибки часто связаны с приготовлением стандартов, калибровкой прибора, расчетами, приготовлением образца, чистотой и качеством реагентов, их хранением, состоянием измерительной аппаратуры и ее энергообеспечением. Ошибки зависят от метода и техники исследования, интерпретации результатов, квалификации исполнителя. При выполнении исследования вручную большой процент ошибок связан с пипетированием, при этом лаборанты допускают индивидуальные грубые ошибки, при взятии как биологического материала, так и реагентов. Перед отбором сыворотки, мочи и других проб необходимо их тщательно, но без встряхивания перемешать. Эти факторы непосредственно зависят от лаборанта. Если пробы или реагенты были заморожены, то перед анализом образцы и реагенты следует согреть до комнатной температуры. Обычно на это требуется около часа. Перед исполнением анализа тщательно перемешать образцы проб и реагентов, не допуская чрезмерного пенообразования и микробиологического загрязнения. Работа с эталонированными пипетками дает меньше погрешностей, чем с обычными. Обычные пипетки нередко не точные по объему, а при работе дозаторами может быть плохо подогнана насадка (наконечник). К ошибке может привести всякая капля на пипетке, неполный забор дозатором и его физический износ. Существенным источником погрешностей является обработка стандарта. Стандартное вещество должно быть химически чистым, точно взвешено на аналитических весах, растворено в мерной калиброванной посуде. При возможности следует предпочитать стандарты, содержащие белок. Стандарты - это основа точных анализов. Единичное калибрование не является надежным, поэтому анализируемому необходимо подвергать стандарты с разной концентрацией вещества. Если в лаборатории используются дозаторы, то и стандартное вещество обрабатывается также дозаторами. Одной из причин погрешностей в работе может быть использование реактивов с истекшим сроком годности. Вода, употребляемая для приготовления реагентов, должна быть также хорошего качества (иметь рН близкий к нейтральной реакции, не содержать примесей солей и т.п.). Чтобы исключить методические погрешности, необходимо пользоваться унифицированными (стандартизированными) методами исследований.

Важным фактором является также качество оборудования и оснащения в лаборатории, стабильность энергообеспечения и температурного режима. Состояние измерительной аппаратуры должно периодически проверяться. В идеальном случае при фотометрическом измерении между значением концентрации вещества и экстинкцией (оптической плотностью) прибора соблюдается линейная зависимость (закон Ламберта-Бугера-Бэра). Ошибки будут тем больше, чем больше разница между концентрацией стандарта и анализируемой пробы. Особенно указанное правило становится важным при выполнении сложных анализов в большом интервале концентраций. Надежность результатов измерений при работе на приборах в КДЛ, в первую очередь, обеспечивается

правильной установкой и соответствующей эксплуатацией приборов, их техническим обслуживанием. Приступать к измерениям можно только после тщательного ознакомления с устройством прибора и правилами его эксплуатации. Проверка приборов производится органами метрологической службы, в ведении которых находятся поверочные средства, и лицами, имеющими допуск (сертификат) к данной аппаратуре, а также представителем фирмы-производителя данной аппаратуры. Если в лаборатории имеются калибраторы, то прибор калибруется персоналом, работающим на данном приборе. Однако, это не исключает метрологической поверки прибора. Немаловажное значение для правильности исследований имеет чистота лабораторной посуды. Пробирки и измерительные кюветы должны быть химически чистыми, сухими. Для гарантии оптимальных условий работы лаборатория должна быть оснащена хорошей вентиляцией и кондиционерами. Из суммы всех перечисленных погрешностей получается интегральная ошибка, выражающаяся в неточности конечного результата.

### **ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ**

1. Вопросы стандартизации лабораторных исследований.
2. Понятие о ГОСТах, ОСТах, ТР.
3. Понятие о метрологии.
4. Контрольные и калибровочные материалы.
5. Внешние источники ошибок лабораторного исследования.
6. Внутрилабораторные погрешности.

### **САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ**

1. Записать протокол практического занятия с указанием определения стандартизации лабораторных исследований.
2. Записать директивные документы, регламентирующие работу клинико-диагностической лаборатории.

#### **Тема занятия 4: Контроль качества лабораторных анализов.**

**Цель занятия:** Ознакомление с принципами клинической биохимии, организацией контроля качества лабораторных исследований. Знание понятий скрининговое, профилактическое и дифференциально-диагностическое исследования, экспресс-диагностика, унификация биохимических методик.

#### **Перечень знаний и практических навыков:**

- Знать организацию контроля качества лабораторных исследований;
- Сформировать понятие о скрининговом, профилактическом и дифференциально-диагностическом исследовании, экспресс-диагностике;
- Уметь оценивать правильность ведения контроля качества в лаборатории;

Правильную диагностическую информацию с помощью лабораторных исследований можно получить, зная нормальные величины данного лабораторного теста, пределы внутри- и межиндивидуальных колебаний и влияние на них различных факторов.

Источниками вариабельности показателей КЛД являются такие биологические факторы, как возраст, пол, масса и поверхность тела (особенно важны при обследовании детей); околосуточные месячные и сезонные ритмы; этническое происхождение; условия, в которых производится забор материала для анализа (положение тела, физическое напряжение, прием жидкости, курение, прием лекарств, стресс и др.), а также климатогеографические условия и экологическая обстановка в районе проживания больного.

Истинно нормальными (референтными) считают величины лабораторных показателей, установленные в группах тщательно обследованных здоровых лиц в возрасте 20-30 лет, а нормальными для контингента, отличающегося по каким-либо признакам (по полу, возрасту, профессии, месту обитания и т.д.), – величины этих показателей у здоровых лиц данного контингента. При этом в оценке отклонений величины какого-либо показателя учитывают и так называемую индивидуальную норму – величину показателя у данного пациента, установленную ранее при профилактических и диспансерных обследованиях. Сравнивая обнаруживаемые у обследуемого результаты лабораторных исследований с нормальными для него и для соответствующего ему контингента, а также с референтными величинами, можно получить наиболее достоверное суждение о характере обнаруженного отклонения. Для оценки результатов единичного анализа необходимо знание пределов колебания показателей в норме с вычислением верхней и нижней границ с помощью статистических методов.

#### **Контроль качества лабораторных исследований.**

Для выявления и оценки систематических и случайных погрешностей результатов измерений, производимых в лаборатории, осуществляют внутрилабораторный и межлабораторный контроль качества лабораторных исследований.

При этом используют ряд критериев качества:

- **Точность измерений** – близость результатов к истинному значению измеряемой величины. Высокая точность соответствует несущественным погрешностям, как при систематических, так и при случайных измерениях.
- **Погрешность измерения** – отклонение результата измерения от истинного значения измеряемой величины.
- **Систематическая погрешность измерения** – погрешность, остающаяся постоянной или закономерно изменяющаяся при повторных измерениях одной и той же величины.

• **Случайная погрешность измерения** – погрешность, изменяющаяся случайным образом при повторных измерениях одной и той же величины.

• **Правильность измерений** – отсутствие систематических погрешностей в результатах (для контроля правильности используется только материал с исследованным содержанием компонентов).

• **Прецизионность** – степень близости (или степень разброса) результатов для серии измерений, выполненных по данной методике на различных пробах одного и того же однородного образца. Прецизионность может рассматриваться на трех уровнях: сходимость, внутрилабораторная прецизионность и воспроизводимость.

• **Сходимость результатов измерений** – отсутствие существенных различий между результатами измерений, выполняемых в одинаковых условиях (контроль сходимости и воспроизводимости результатов исследований может осуществляться с помощью контрольного материала с неисследованным содержанием).

• **Воспроизводимость результатов измерений** – отсутствие существенных различий между результатами измерений, выполняемых в отличающихся условиях (в разное время, в разных местах). Воспроизводимость результатов исследований характеризуется степенью их совпадения при многократном исследовании одной и той же пробы биологического материала. Воспроизводимость выражается величиной, обратной коэффициенту вариации результатов. Чем меньше коэффициент вариации, тем выше воспроизводимость. Контроль качества лабораторных исследований проводят путем сопоставления результатов измерений, производимых в лаборатории, с контрольным и определения величины отклонения.

*Внутрилабораторный контроль включает контроль сходимости, воспроизводимости и правильности измерений.*

Воспроизводимость считают достаточной, если величина коэффициента вариации результатов для исследований субстратов не превышает 5%, а для определения активности ферментов – 10%, что соответствует процентному выражению отношения примерно 1/8 пределов нормальных колебаний исследуемых параметров к средней величине нормы. Для оценки воспроизводимости результатов удобно использовать контрольные карты, на которых отмечают повседневные результаты контрольных исследований. Для построения карты предварительно в течение 20 дней исследуют контрольный материал одной серии выпуска и результаты ежедневно регистрируют. Из полученных 20 результатов вычисляют среднюю величину и коэффициент вариации.



Рисунок 1



Рисунок 2



Рисунок 3

Если коэффициент вариации больше допустимого, проверяют весь ход анализа, устраняют причины неудовлетворительной воспроизводимости и повторяют предварительный этап. Контрольную карту строят для каждого контролируемого показателя и только для данной серии контрольного материала. Результаты ежедневного исследования контрольных проб той же серии в последующие дни наносят на карту в виде точки и используют для оценки воспроизводимости лабораторных исследований.

Контроль правильности результатов измерений проводят при условии хорошей их сходимости. Методами контроля могут быть сравнение результатов собственных определений с номинальным значением контрольных материалов; сравнение результатов с результатами референтного метода; участие в межлабораторном эксперименте по контролю качества; дополнительное исследование пробы материала, к которой предварительно добавлено точное количество чистого вещества; исследования проб с различными концентрациями. Полученные результаты обрабатывают статистически.

*Межлабораторный контроль* – это сравнительный контроль качества результатов исследований, полученных в ряде лабораторий при использовании единого контрольного материала. Он включает контроль воспроизводимости и правильности, осуществляется не реже чем один раз в квартал под методическим руководством контрольных центров республиканского, краевого и областного уровней. Контрольные центры определяют цели, задачи и порядок проведения контрольного эксперимента, собирают и изучают результаты контрольных определений и вырабатывают рекомендации по улучшению качества работы лаборатории.

Важной предпосылкой преемственности ведения больных в различных лечебных учреждениях (в поликлинике, больнице, в разных городах и т. д.) является унификация диагностических методов лаб. диагностики на уровне страны. Внедрение в клиническую и лабораторную практику международной системы единиц помогло унифицировать результаты методов лаб. диагностики в разных странах мира.

Для правильного выбора метода КЛД и интерпретации полученных показателей необходимо знание возможностей каждого из методов, зависимости результатов анализа от условий взятия исследуемого материала, его транспортировки, а также от соблюдения правил выполнения анализов.

Надежность результатов зависит от качества применяемых лабораторией методов, приборов, реактивов, калибровочных материалов, от тщательности работы персонала. Если отклонение лабораторных показателей обусловлено патологией, то при повторных исследованиях в большинстве случаев выявляются повторяемость и направленность отклонений. Для некоторых форм патологии характерны изменения нескольких лабораторных показателей, например, при острых воспалительных процессах одновременно могут изменяться количество лейкоцитов в крови, СОЭ, содержание ряда ферментов и др.

Некоторые лабораторные тесты специфичны для нарушений деятельности определенных органов или для определенного вида патологии (например, органоспецифические изоферменты, парапротеины при миеломной болезни); однако большая часть тестов дает результаты, которые имеют лишь вероятностный диагностический характер. Так, повышение СОЭ отмечается и при бактериальном воспалении, и при аутоиммунном процессе, и при опухоли. В оценке пригодности лабораторного теста для диагностики определенной формы патологии используют

критерии диагностической специфичности, чувствительности, эффективности лабораторного теста и применяемого метода исследования. При этом учитывают частоту как истинных, так и ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

- Диагностическая чувствительность теста при определенной болезни представляет собой процентное выражение частоты только истинно положительных результатов теста у больных данной болезнью. Например, рассмотрим метод исследования, обладающий 90% чувствительностью. Если 100 человек, страдающих данным заболеванием, пройдут обследование с помощью этого метода, он позволит выявить заболевание у 90 из 100 пациентов. Остальные 10 обследуемых также страдают этим заболеванием, но метод исследования не может его выявить. Для этих 10% выявленные «нормальные» результаты исследования окажутся ложноотрицательными. Чувствительность методов исследования приобретает особенно большое значение в случаях, когда требуется исключить наличие особо опасного инфекционного заболевания. **Чем чувствительнее данный метод исследования, тем реже он дает "ложноотрицательные" результаты. Ложноотрицательными называют результаты, не позволяющие выявить имеющееся у пациентов заболевание.**

- Диагностическая специфичность теста при определенной болезни – процентное выражение частоты истинно отрицательных результатов теста у лиц, не страдающих данной болезнью. Например, рассмотрим метод исследования, обладающий 90% специфичностью. Если этим методом обследовать 100 человек, не страдающих искомым заболеванием, только у 90 из этих 100 здоровых людей результаты исследования окажутся «нормальными» (свидетельствующими об отсутствии заболевания). У остальных 10 человек, также не страдающих заболеванием, результаты исследования будут показывать, будто оно имеется. Для этих 10% обследуемых такое «отклонение результатов исследования от нормы» на самом деле является ложно-положительным результатом. Специфичность особенно важна для исследований, используемых при подтверждении диагнозов, требующих применения тяжелых методов лечения. **Чем специфичнее данный метод исследования, тем реже он дает "ложно-положительные" результаты. Ложно-положительные результаты исследования могут привести к неправильному диагнозу и назначению ненужных и, возможно, ухудшающих качество жизни пациента диагностических и лечебных процедур.**

Диагностическая значимость положительных результатов выражается процентным отношением истинно положительных к общему числу положительных результатов, включающему также и ложноположительные. Диагностическая значимость отрицательных результатов представляет собой процентное отношение истинно отрицательных результатов к общему числу отрицательных результатов. Диагностическая эффективность теста выражается процентным отношением истинных (и положительных, и отрицательных) результатов теста к общему числу полученных результатов. В расчеты перечисленных характеристик лабораторного теста вводится поправка на частоту заболевания данной болезнью среди общего числа обследованных.

#### **Виды лабораторных исследований**

В зависимости от клинических задач лабораторные исследования могут производиться однократно и многократно (в динамике), а также в процессе проведения функциональных или фармакологических тестов со стимуляцией или торможением этапов исследуемого вида обмена веществ, клеточных или гуморальных реакций либо других

функций, выраженность или качество которых отражается в параметрах определяемого лабораторного показателя.

При массовых осмотрах населения, а также при первом контакте с больным в поликлинике или стационаре применяют многостороннее лабораторное обследование, которое не исключает целенаправленных исследований, проводимых при необходимости для уточнения диагноза.

Осуществляются также одномоментные массовые профилактические **скрининговые исследования** одного показателя, («screening» означает "просеивание"). Это профилактическое обследование крупных контингентов населения с помощью метода, обладающего высокой пропускной способностью, для выявления относительно небольшой группы повышенного риска, нуждающейся в дополнительном обследовании. Дообследование группы повышенного риска проводится методами, разрешающие способности которых позволяют осуществлять окончательную диагностику онкологического заболевания на ранних стадиях развития. Типичными примерами скрининговых методов являются анкетирование, флюорография, пальцевое исследование прямой кишки, пальпаторное исследование молочных желез, анализ кала на скрытую кровь, определение простатоспецифического антигена в крови, маркера СА15-3, выявления у детей генетической патологии (фенилкетонурии и других врожденных энзимопатий). Основные требования, предъявляемые к скрининговому методу: идеальный метод скрининга должен не только обладать высокими чувствительностью и специфичностью, но и быть безопасным, широко доступным и недорогим.

**Экспресс-методы** лабораторной диагностики – ускоренные методы лабораторных анализов, обеспечивающие проведение исследования в срок до 10-15 мин после получения материала. Экспресс-методы основаны на тех же или аналогичных химических реакциях, что и классические методы анализа. Широкое развитие экспресс-тестов стало возможным на основе достижений клинической биохимии и промышленного производства наборов сухих реактивов (экспресс-тесты) для определения различных ингредиентов крови, мочи и других биологических жидкостей.

Различают монотесты, т.е. сухие реактивы для определения в биожидкости какого-либо одного вещества, и политесты – комбинированные реактивные полоски, на которых имеется несколько индикаторных зон, предназначенных для исследования 5 и более биохимических параметров одновременно. Результаты анализа могут быть только качественными или позволяют определить концентрацию вещества в исследуемой жидкости, т.е. являются количественными. Наиболее распространены экспресс исследования мочи и крови. Использование таких тестов особенно ценно в отделениях интенсивной терапии и реанимации, где в процессе круглосуточного наблюдения за больным необходим частый контроль динамики ряда лабораторных показателей, отражающей состояние больного и эффективность проводимого лечения. Для проведения экспресс тестирования как правило не требуется сложной аппаратуры, поэтому их целесообразно использовать в приемных отделениях больниц, в амбулаторной практике, при посещении больных на дому врачом или средним медицинским персоналом. Они могут применяться специально проинструктированными больными в порядке самонаблюдения («карманная» лаборатория). С помощью экспресс-тестов проводят массовые (скрининговые) обследования и динамические наблюдения за лицами, нуждающимися в медицинском патронировании. Одним из направлений перспективного

развития экспресс-исследований является внедрение микроэкспресс-методов, позволяющих использовать минимальный объем биологических жидкостей для анализа.

### **Основные разделы лабораторных исследований**

**Клиническая биохимия** – один из наиболее обширных разделов лабораторной медицины, включающий исследования содержания органических и неорганических веществ, образующихся в процессе биохимических реакций, а также активности ферментов в сыворотке, плазме, крови, моче, ликворе и других биологических жидкостях. Современные приборы для биохимических исследований автоматически определяют одновременно до 20-30 показателей, используя несколько микролитров крови. Аналитические возможности современных лабораторий практически сняли вопрос «как определить?», так как в настоящее время имеются возможности определять вещества, содержащиеся в биологическом материале в концентрациях  $10^6$ - $10^9$  Моль на литр, а их перечень включает несколько сотен органических и неорганических компонентов. Широкое внедрение методов «сухой химии» позволяет перенести ряд биохимических анализов из пробирки на специальные тест-полоски и без приборов определять многие показатели почти мгновенно.

Биохимические анализы крови и других биологических жидкостей составляют около 40% всех лабораторных анализов. Они могут характеризовать как состояние всего организма, например, показатели кислотно-щелочного равновесия, так и отдельных органов, например, органоспецифические ферменты. Поскольку обмен веществ между органами и тканями опосредован кровотоком, в плазме крови содержатся в разных концентрациях все вещества, поступающие в организм и синтезирующиеся в нем.

**Клинико-лабораторная иммунология** – раздел лабораторной медицины, обеспечивающий определение на основе комплекса показателей степени противoinфекционной и противоопухолевой защиты организма, а также лабораторную диагностику и контроль эффективности терапии аллергических заболеваний. Человек постоянно находится в окружении огромного количества различных патогенных бактерий и вирусов, которые содержатся в воздухе, воде, почве, на окружающих предметах, продуктах питания и теле самого человека. Они могут вызывать множество заболеваний, но происходит это в течение жизни относительно редко, так как в организме имеется сложная система защиты от чужеродных агентов – иммунная система. Организм человека можно сравнить с государством, располагающим большой хорошо вооруженной армией – иммунитетом. Огромное число «солдат» – иммунокомпетентных клеток – циркулирует в крови, «патрулируя» все органы и ткани и ликвидируя не только инфекционные агенты (микробы, их токсины, вирусы и т.д.), но и очищая организм от патологически измененных, злокачественных, отмирающих и пересаженных клеток (органов). Таким образом, основной функцией иммунной системы является распознавание и уничтожение тел и веществ чужеродной природы. Определение иммунного статуса человека включает комплекс анализов, дающих качественную и количественную характеристику иммунитета и становится необходимым условием успешного лечения очень многих заболеваний.

### **Клиническая микробиология (бактериология, микология, вирусология)**

Лабораторные микробиологические исследования проводятся для выявления возбудителей инфекционно-воспалительных процессов, определения их чувствительности к лекарственным препаратам и контроля эффективности лечения. В последние десятилетия в этой области достигнут большой прогресс благодаря широкому внедрению

иммунологических и молекулярно-генетических методов, позволяющих с высокой точностью определять специфические поверхностные антигены и фрагменты ДНК вирусов, бактерий, грибов, простейших с помощью реакции иммунофлюоресценции (РИФ), иммуноферментного анализа (ИФА), полимеразной цепной реакции (ПЦР), ДНК-зондов. Это дает возможность точно определять возбудителей, которые с помощью культуральных и серологических методов выявлены быть не могут.

#### **Цитология (эксфолиативная и пункционная)**

Цитологическая диагностика заключается в изучении строения и выявлении патологических изменений в структуре клеток, полученных из экссудатов, синовиальной и спинномозговой жидкости, с поверхности слизистых оболочек, а также из тканей и органов при их пункционной биопсии. Пункционная цитология является основным методом дооперационной и операционной диагностики доброкачественных и злокачественных новообразований. Современные методы автоматизированной цитофотометрии, гистохимии, радиоизотопного исследования делают цитологический анализ оперативным и точным.

#### **Клиническая молекулярная биология и диагностическая генетика**

Исследует генетический материал – хромосомы, гены, нуклеиновые кислоты для выявления разных типов мутаций, лежащих в основе наследственных заболеваний и пороков развития. Современные методы ДНК-диагностики – гибридизационный анализ, амплификация геномов, полимеразная цепная реакция, ДНК-зонды и другие незаменимы в пренатальной диагностике, а также широко используются для определения вирусов и бактерий.

#### **Клиническая токсикология**

Обеспечивает лабораторную диагностику острых и хронических отравлений, вызванных органическими и неорганическими веществами, лекарственными препаратами и т.д. Высокая степень загрязнения окружающей среды, производства с вредными условиями, техногенные аварии и многие другие факторы определяют современную значимость этой области медицины.

#### **Клинико-лабораторная паразитология**

Выявляет и идентифицирует возбудителей паразитарных заболеваний – насекомых, гельминтов, простейших. Такие заболевания имеют определенные территориальные и социальные особенности распространения, но в связи с высокой миграционной активностью населения у людей появляются паразитарные заболевания, не характерные для мест постоянного проживания, поэтому лабораторная паразитология в настоящее время сохраняет высокую актуальность и значимость.

#### **Лабораторный контроль (мониторинг) лекарственной терапии**

Используя комплекс биохимических, физико-химических, цитологических и других методов осуществляет контроль соотношения дозы и эффекта лекарственных препаратов, их индивидуальной фармакокинетикой. Такой лабораторный контроль распространен еще недостаточно широко, хотя необходим и эффективен при лекарственной терапии опухолей, неотложных состояний, длительных хронических заболеваниях и т.д. Современные автоматизированные системы регистрации обеспечивают высокую скорость и точность анализов.

#### **Клинические анализы крови**

Когда говорят об анализах крови, всегда нужно иметь в виду, что собственно кровь является только частью системы, включающей в себя еще органы кроветворения (костный мозг, селезенка, лимфотические узлы, печень) и кроверазрушения (селезенка, ткани). Все звенья в этой системе взаимосвязаны и взаимозависимы.

Костный мозг является органом, в котором рождаются и созревают клетки крови. Через определенное время клетки поступают в кровеносное русло, в котором эритроциты живут около 120 суток, тромбоциты – 10, а нейтрофилы всего около 10 часов. Причем, если эритроциты и тромбоциты функционируют в кровеносном русле, то гранулоциты (нейтрофилы, эозинофилы, базофилы) и макрофаги – еще и в тканях.

Подсчет количества клеточных элементов, который может производиться, как в ручную, с помощью микроскопа, так и автоматически, позволяет определить функциональное состояние костного мозга, диагностировать целый ряд заболеваний, связанных с нарушением его деятельности.

Кроме того, определяя количество эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов и других элементов, концентрацию гемоглобина и скорость оседания эритроцитов (СОЭ), можно выявить наличие воспалительного заболевания (пневмонии, ревматизма, полиартрита, туберкулеза и др.).

### **Исследования свертывающей системы крови**

Кровь – уникальная жидкая ткань, обладающая не только текучестью, но и способностью свертываться (коагулировать), то есть сгущаться и образовывать плотные сгустки (тромбы). Свойство текучести предотвращает слипание клеток, и они легко перемещаются по всем сосудам, включая самые тонкие – капилляры. Благодаря свертывающей способности при повреждении мелких и средних сосудов кровотечение через некоторое время самостоятельно останавливается, так как брешь в сосуде закрывается тромбом. Как текучесть, так и свертываемость крови обеспечивается многими веществами и клетками, которые, взаимодействуя между собой, образуют систему гемостаза.

Расстройства гемостаза могут быть причинами самостоятельных заболеваний, но чаще всего они играют очень серьезную роль в течении, а иногда и в исходе других заболеваний, в первую очередь, травм, хирургических вмешательств, сердечно-сосудистых заболеваний, обширных воспалений, родов. Поэтому определение показателей свертывающей системы крови (гемостаза) является очень информативным для оценки состояния, прогноза и эффективной терапии многих острых и хронических заболеваний.

### **Исследования эндокринной системы**

Железы внутренней секреции или эндокринные железы – гипофиз, эпифиз, щитовидная и паращитовидные железы, надпочечники, поджелудочная железа, мужские и женские половые железы – получили свое название в связи с тем, что выделяют синтезируемые ими вещества – гормоны – непосредственно в кровь. Это обеспечивается очень развитой сосудистой сетью желез.

Продукция гормонов находится под контролем нервной системы, которая через гипоталамус осуществляет регуляцию синтеза гормонов в гипофизе. Гормоны периферических желез, в частности мозгового слоя надпочечников, в свою очередь, контролируют секрецию гипоталамических гормонов. Благодаря такому тесному взаимному влиянию и контролю железы внутренней секреции образуют единую эндокринную систему. Поэтому повышение или снижение содержания гормона в организме может возникать не только из-за изменений в самой железе (опухоль, атрофия, склероз и др.), но и в результате нарушения регуляции со стороны других систем.

Получить информацию об активности эндокринной железы можно путем непосредственного определения уровня соответствующего гормона, промежуточных

продуктов его синтеза или превращения, а, также, определяя биохимические, физиологические и другие параметры процессов, на которые влияет тот или иной гормон.

### **Исследования функции почек**

Почки участвуют в удалении конечных продуктов обмена веществ, чужеродных и ядовитых веществ, поступающих в организм из внешней среды, поддерживают постоянство в крови осмотически активных веществ, кислотно-щелочное равновесие, участвуют в регуляции водного баланса, продуцируют вещества, регулирующие артериальное давление, эритропоэз и т.д. В конечном итоге, основная функция почек – образование мочи.

Пробы, используемые для изучения функции почек, в одних случаях позволяют оценивать их способность концентрировать мочу и выводить воду, в других – характеризовать отдельные процессы, связанные с мочеобразованием (функцию клубочков, извитых канальцев, исследовать почечный кровоток и т.д.).

### **Исследования функции печени**

Печень занимает центральное место в процессах обмена веществ организме человека. Большое количество крови, проходящее через печень, позволяет этому органу выделять в кровоток и извлекать из него многие биологические вещества. Выделение желчи – лишь одна из функций печени.

Печень участвует в синтезе белков, углеводов, жиров, в пигментном обмене, образовании мочевины, креатина и целого ряда других соединений. Велика роль печени в обезвреживании различных токсических веществ путем образования безвредных комплексов, удаляемых из организма через почки.

### **Маркеры опухолей**

Маркеры опухолей – белки с углеводными или липидными компонентами, которые выявляются в опухолевых клетках или сыворотке крови, являются показателем злокачественного процесса в организме. Эти белки обладают равной степенью специфичности – одни могут появляться при нескольких видах опухолей разной локализации, другие – только при каком-то одном определенной злокачественном новообразовании. Различна частота их обнаружения и диагностическая значимость, так как в 10-35% случаев (для разных опухолей эти величины различны) белок-маркер может не выявляться при наличии опухоли.

Опухолевые маркеры используются для контроля течения заболевания и эффективности проводимой химиотерапии, хирургического и биологического лечения. Динамическое наблюдение за уровнем опухолевого маркера позволяет делать заключение о полной остановке или прогрессировании процесса, появлении метастазов. Нередко повышение концентрации опухолевого маркера отмечается значительно раньше каких-либо клинических признаков заболевания.

### **Лабораторные информационные системы**

Автоматизация лабораторий – одна из типичных задач, которые приходится решать в крупных диагностических центрах, стационарах или специализированных коммерческих лабораториях. Лабораторная диагностика для лечащего врача – это один из важнейших методов обследования пациента.

Лабораторная информационная система – это информационная управляющая система, созданная специально для автоматизации деятельности лаборатории.

За рубежом этот термин называется аналогично – Laboratory Information System (LIS). Основное назначение ЛИС – это автоматизация труда сотрудников лаборатории,

повышение эффективности организации работы лаборатории, сокращение числа ошибок и ручных операций. Подключение автоматических лабораторных анализаторов позволяет сотрудникам в автоматизированном режиме передавать заказы в анализаторы и получать от них результаты исследований, не прибегая к ручному управлению материалами и сортировке ответов. Другие типичные функции ЛИС заключаются в следующем:

- Интеграция с госпитальными медицинскими информационными системами в плане автоматизированного получения заказов на исследования с рабочих мест лечащих врачей;
- Регистрация материала, поступающего в лабораторию;
- Распределение материалов (заказов) по рабочим местам, формирование рабочей документации (заданий) для лаборантов;
- Контроль выполнения процессов лабораторной диагностики;
- Автоматический ввод (или автоматическое получение от анализаторов) результатов исследований;
- Внутрилабораторный контроль качества, участие во внешних системах контроля качества;
- Аналитическая обработка полученных данных;
- Передача ответов в госпитальные информационные системы, либо экспорт данных в различных электронных форматах, либо подготовка результатов для распечатки;
- Формирование отчетов.

### **ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ**

1. Организация контроля качества лабораторных исследований.
2. Референтные величины и средний показатель.
3. Скрининговое, профилактическое и дифференциально-диагностическое исследования. Экспресс-диагностика.
4. Средства контроля качества. Методы контроля качества (контроль воспроизводимости, контроль правильности). Внешняя оценка качества.
5. Основные статистические критерии в контроле качества лабораторных исследований.
6. Унификация биохимических методик.
7. Лабораторные информационные системы.

### **САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ**

1. Записать протокол практического занятия с указанием цели и задач, видов контроля качества.
2. Записать стадии внутрилабораторного контроля качества и их особенности, критерии качества лабораторных исследований.
3. Записать характерные черты внешней оценки качества.

## **Тема занятия 5: Получение и подготовка биологического материала для исследований.**

**Цель занятия:** Знакомство со способами получения и подготовки биологического материала. Изучение методов фиксации и окраски мазков.

### **Перечень знаний и практических навыков:**

- Знать способы забора биологического материала
- Ознакомиться с правилами хранения, маркировки и транспортировки биологического материала
- Уметь микроскопически дифференцировать способы окраски мазков

### **Условия взятия материала для клинических лабораторных исследований**

Наиболее распространенным материалом для лабораторных исследований является кровь, моча и некоторые другие биологические жидкости.

Взятие материала для лабораторных исследований должно проводиться **до принятия обследуемым пищи (натошак)**. Последний прием пищи за 8–12 часов (12 часов для исследований липидного спектра) до взятия. Исключением из этого правила являются исследования, которые проводятся при неотложных состояниях, в любое время, но с учетом этого фактора.

**Время** взятия с 7 до 9 ч утра при плановых исследованиях и в любое время для срочных случаев диагностики (неотложные состояния). Не допустим забор крови для плановых биохимических исследований накануне вечером.

Лекарственные средства существенно влияют на результаты лабораторных исследований различным образом. Поэтому при подготовке обследуемых к проведению лабораторных исследований приняты следующие подходы:

- лекарственные средства, мешающие определению компонентов, исключаются до взятия биоматериала, если они даются не по жизненным показаниям;
- утренний прием лекарственных средств проводится только после взятия биоматериала;
- взятие крови с диагностической целью проводится перед проведением инфузии лекарственных средств и растворов.

Взятие биоматериала осуществляется **до проведения диагностических или лечебных процедур:** операций, инфузий, переливаний крови, растворов, пункций, инъекций, биопсий, общего массажа тела, эндоскопии, физических нагрузок, выполнения ЭКГ, рентгеновского обследования.

Во время проведения глюкозотолерантного теста (тест с нагрузкой глюкозой) не должно проводиться никаких других манипуляций, в том числе диагностических.

**Значительная физическая и мышечная нагрузка** должны быть исключены как минимум за 3 дня до взятия биоматериала.

Для исключения **влияния изменения положения тела** обследуемый должен находиться в покое, сидеть или лежать не менее 5 мин в связи с изменением концентрации ряда компонентов при переходе пациента из горизонтального в вертикальное положение. Особенно это важно при исследовании показателей кислотно-основного равновесия и активности ферментов. Предпочтительно, за исключением тяжелобольных, кровь у пациентов должна забираться в положении сидя.

При динамическом наблюдении за пациентом взятие материала нужно проводить в идентичном положении тела.

При гормональных исследованиях у женщин репродуктивного возраста (примерно с 12–13 лет и до наступления климактерического периода) на результаты влияют физиологические факторы, связанные со стадией менструального цикла. Поэтому при подготовке к обследованию на гормоны ФСГ (фолликулостимулирующего гормона), ЛГ (лютеинизирующего гормона), пролактин, эстриол, эстрадиол, прогестерон следует указать фазу цикла. При проведении исследования на половые гормоны нужно строго придерживаться рекомендаций лечащего врача о дне менструального цикла, в который необходимо сдать кровь (на ФСГ, ЛГ, эстрадиол, тестостерон на 6–7 день менструального цикла).

При контроле лабораторных показателей в динамике рекомендуется проводить повторные исследования в одинаковых условиях – в одной лаборатории, сдавать кровь в одинаковое время суток и пр.

#### **Получение крови для клинических лабораторных исследований**

1. Нативная венозная кровь, взятая из крупных вен (чаще из локтевой) без применения антикоагулянтов.

2. Венозная кровь с добавлением антикоагулянтов.

3. Капиллярная кровь из пальца для определения глюкозы, общего анализа крови (ОАК) и других компонентов.

4. Артериальная кровь, взятая из крупных артерий (чаще бедренной или подключичной) – для определения газов крови.

#### **Венозная кровь**

Использование венозной крови для биохимических исследований наиболее предпочтительно.

В настоящее время взятие венозной крови осуществляется одноразовым шприцем с толстой иглой в стеклянную или пластиковую пробирку или вакуумными системами промышленного производства, например, Вакутайнером. В зависимости от того, какой материал необходимо получить (сыворотку или плазму), кровь собирают в чистые сухие центрифужные пробирки без добавок (для получения сыворотки), либо с добавлением антикоагулянтов (для получения плазмы).

#### **Капиллярная кровь**

Капиллярная кровь чаще всего используется для определения глюкозы или общего анализа крови. Для взятия пробы капиллярной крови используют стерильные скарификаторы-копья одноразового применения или лазерные перфораторы. Между объемом получаемой крови и глубиной прокола имеется прямая зависимость. В связи с этим скарификатор должен выбираться в зависимости от места прокола и количества крови, необходимого для выполнения различных исследований с лезвиями разных размеров.

Свернувшаяся и гемолизированная пробы не подлежат исследованию. Количество собираемой крови зависит от количества назначенных анализов и требуемых для них объемов биоматериала. Для биохимии хотя бы 6 мл, для коагулограммы – 4,5 мл.

#### **Основные химические добавки, используемые при взятии крови на анализ:**

Этилендиаминтетраацетат (ЭДТА) – антикоагулянт, который предохраняет кровь от свертывания, связывая и эффективно удаляя ионы кальция, присутствующие в плазме (кальций необходим для свертывания крови). ЭДТА также защищает клетки крови от

разрушения. Добавляют в пробирки для сбора крови с целью полного подсчета клеток крови и выполнения некоторых других гематологических тестов.

Гепарин (в виде натриевой или калиевой соли этой кислоты, т. е. натрий гепарина или калий гепарина) – антикоагулянт, который предохраняет кровь от свертывания, ингибируя превращение протромбина в тромбин. Добавляют в пробирки для сбора крови с целью проведения биохимических исследований, для которых необходима плазма. Антикоагулянтные свойства гепарина используются в терапии.

Цитрат (в виде натриевой соли, т. е. цитрата натрия) – антикоагулянт, который предохраняет кровь от свертывания, связывая ионы кальция (подобно ЭДТА). Добавляют в пробирки для сбора крови с целью изучения процессов свертывания.

Оксалат (в виде натриевой или аммонийной соли, т. е. оксалата натрия или аммония) – антикоагулянт, который предохраняет кровь от свертывания, связывая ионы кальция (подобно ЭДТА). Используют вместе с фторидом натрия для определения содержания глюкозы в крови.

Фторид натрия – это ферментный яд, который прекращает метаболизацию глюкозы в крови после ее сбора, т. е. сохраняет ее концентрацию. Используется вместе с оксалатом аммония специально для определения содержания глюкозы в крови.

### **Сыворотка**

Сыворотку получают из спонтанно свернувшейся цельной крови путем центрифугирования (1000–1200 об в течение 10–15 минут). Она не содержит факторов свертывания крови. Центрифугирование свернувшейся крови с целью получения сыворотки следует выполнять, только убедившись в том, что кровь полностью свернулась (в нормальных условиях кровь свертывается около 30 минут).

### **Плазма**

Плазма получается из крови путем отделения клеток крови. В противоположность сыворотке она содержит факторы свертывания крови, т.е. является бесклеточной надосадочной жидкостью, получаемой при центрифугировании крови, свертываемость которой ингибирована добавлением антикоагулянтов. После этого полученную плазму (верхняя фаза) отобрать индивидуальным наконечником с фильтром (аэрозольным барьером) в количестве не менее 1 мл в сухую стерильную пластиковую пробирку типа Эппендорф.

### **Получение мочи для клинических лабораторных исследований**

Сбор мочи проводится после тщательного туалета наружных половых органов, чтобы в мочу не попали выделения из них.

Моча, собранная для анализа, может храниться не более 1,5 – 2 часов (обязательно на холоде). Длительное стояние ведет к изменению физических свойств, размножению бактерий и разрушению элементов осадка мочи. При этом рН мочи будет сдвигаться к более высоким значениям из-за аммиака, выделяемого в мочу бактериями. Микроорганизмы потребляют глюкозу, поэтому при глюкозурии можно получить отрицательные или заниженные результаты. Желчные пигменты разрушаются при дневном свете. Наиболее приемлемый способ сохранения мочи - охлаждение (можно хранить в холодильнике, но не доводить до замерзания). При охлаждении не разрушаются форменные элементы, но возможно влияние на результаты определения относительной плотности.

Далее сбор мочи, в зависимости от вида исследования, имеет свои особенности.

1. Для проведения **общего анализа мочи** собирают только утреннюю мочу, взятую в середине мочеиспускания, так как она более концентрированная и с ней вымываются патологические элементы, скопившиеся в почках и в мочевыводящих путях за ночь.

2. Для проведения **пробы по Зимницкому** (оценка концентрационной способности почек) за сутки собирают 8 порций мочи. Условием правильного проведения пробы, является исключение избыточного потребления воды. Необходимо предупредить больного о том, что желательно, чтобы количество принимаемой жидкости в день сбора мочи не превышало 1-1,5 л. В остальном пациент остается в обычных условиях, принимает обычную пищу, но учитывает количество выпиваемой за сутки жидкости.

Заранее необходимо подготовить 8 чистых сухих банок для сбора мочи. Каждую банку подписывают, указывая фамилию и инициалы пациента, отделение, дату и время сбора мочи.

- 1-я банка – с 6 до 9 часов,
- 2-я – с 9 до 12 часов,
- 3-я – с 12 до 15 часов,
- 4-я – с 15 до 18 часов,
- 5-я – с 18 до 21 часа,
- 6-я – с 21 до 24 часов,
- 7-я – с 24 до 3 часов,
- 8-я – с 3 до 6 часов.

Собирают за сутки 8 порций мочи. В 6 часов утра больной опорожняет мочевой пузырь (эта порция выливается). Затем, начиная с 9 часов утра, точно каждые 3 часа собирают 8 порций мочи в отдельные банки (до 6 часов утра следующего дня). Все порции доставляют в лабораторию. Вместе с мочой доставляют сведения о количестве принятой за сутки жидкости.

3. Для определения количества форменных элементов в 1 мл мочи по **методу Нечипоренко** (выявление скрытого воспалительного процесса) собирается средняя порция первой утренней мочи – не более 15-20 мл.

4. **Двухстаканная проба** чаще используется в урологии у женщин. Мочу при мочеиспускании делят на две части. Важно, чтобы первая порция в этом случае была небольшой по объему. Посуду также готовят предварительно и указывают номер порции на каждом сосуде.

5. **Сбор суточной мочи.** Пациент собирает мочу в течение 24 часов, соблюдая обычный питьевой режим (1,5-2 л в сутки). Утром в 6-8 часов он опорожняет мочевой пузырь и отмечает время (эту порцию мочи выливают), а затем в течение суток собирают всю мочу в чистый широкогорлый сосуд емкостью не менее 2 л, с плотно закрывающейся крышкой. Последняя порция берется точно в то же время, когда накануне был начат сбор (время начала и конца сбора отмечают). Если не вся моча направляется в лабораторию, то количество суточной мочи измеряют мерным цилиндром, отливают часть в чистую посуду, в которой ее доставляют в лабораторию, и обязательно указывают объем суточной мочи.

6. **Порядок подготовки для проведения исследования на пробу Реберга (оценка секреторной и экскреторной функции почек):**

1. Утром помочиться в туалет.
2. Выпить 300-400 мл жидкости.
3. Через 10-15 минут помочиться в туалет.

4. Лечь в постель и через 60 и через 120 минут помочиться в отдельную посуду (2раза)

5. Измерить объем мочи.

6. В промежутке между опорожнением мочевого пузыря взять кровь для исследования на креатинин.

Доставить в лабораторию и провести исследование в тот же день.

7. **3-стаканная проба.** Используется для установления уровня гематурии и источника лейкоцитурии. Пробу проводят только в утренние часы без предварительного туалета наружных половых органов. Без перерывов в акте мочеиспускания больной собирает мочу в 2 сосуда, не опорожняя полностью мочевого пузыря. Затем после массажа простаты в 3-ий сосуд собирается 3-я порция мочи.

*Соскоб эпителиальных клеток из урогенитального тракта женщины.*

Соскобы производят из трех точек тремя разными зондами: цервикальный канал, задний свод влагалища, уретра – в одну пробирку, поочередно ополаскивая каждый зонд. При необходимости берут материал из эрозивно-язвенных поражений. Отделяемое забирают в небольшом количестве. Присутствие примесей (слизь, кровь, гной) недопустимо, т. к. приводит к деградации исследуемых микроорганизмов.

Ни в коем случае нельзя смачивать в пробирках типа «Эппендорф» зонды перед забором отделяемого, т. к. они заполнены или содержат транспортную среду (может вызвать зуд, раздражение, ожог)!

Для получения мазков урогенитального тракта наносят материал зондом на предметное стекло и подсушивают на воздухе.

*Соскоб эпителиальных клеток из уретры мужчин.*

Перед взятием соскоба из уретры необходимо воздержаться от мочеиспускания в течение не менее двух часов. При наличии свободно стекающих из уретры выделений удаляют их сухим зондом (после чего его выкидывают). Вводят зонд в уретру на глубину 3-4 см. несколькими вращательными движениями производят соскоб эпителиальных клеток и переносят зонд в пробирку типа «Эппендорф» с транспортной средой. Погрузив рабочую часть зонда в транспортную среду, вращают зонд в течение 10-15 сек., избегая разбрызгивания раствора. Вынимают зонд из раствора, прижимая его к стенке пробирки. Отжав избыток жидкости, удаляют зонд и закрывают пробирку. Присутствие примесей (слизь, кровь, гной) недопустимо, т. к. приводит к деградации исследуемых микроорганизмов. В процедурном кабинете должен быть запас стерильных зондов (либо тампонов) для удаления слизи. Шпатель гинекологический входит в гинекологический набор.

Для получения мазка, вынув зонд из уретры, наносят мазок такими же вращательными движениями в обратном направлении (против часовой стрелки) на всю поверхность предметного стекла тонким слоем.

*Сперма.*

Взятие спермы осуществляют в стерильный одноразовый флакон. Для анализа спермограммы каплю исследуемого материала наносят на предметное стекло и накрывают покровным стеклом. Анализируют нативный препарат в темном поле.

*Мокрота.*

Взятие материала осуществляют утром натощак после гигиены полости рта при глубоком откашливании в количестве не менее 0,5 мл в стерильный одноразовый флакон с широким горлом, завинчивающейся крышкой, объемом не менее 50 мл.

#### *Биопсийный материал.*

Взятие материала осуществляют из зоны предполагаемого местонахождения возбудителя инфекции, из поврежденной ткани или из пограничного с повреждением участка. Материал помещают в одноразовые стерильные пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл, содержащие 0,5 мл транспортной среды. Возможно приготовление препарата сразу после взятия материала (мазки-отпечатки, распределение материала по предметному стеклу).

#### *Спинномозговая жидкость (ликвор).*

Взятие ликвора производится только врачом в условиях стационара. Ликвор получают путем прокола поясничной, субоктиципитальной области или мозговых желудочков одноразовыми пункционными иглами.

#### *Слюна.*

Перед взятием материала следует провести тщательную гигиену полости рта (почистить зубы, прополоскать рот водой до полного удаления зубной пасты) через 30 минут можно начинать сбор слюны в стерильную емкость. Забор слюны можно производить в течение дня.

### **Приготовление, фиксация и окраска мазков крови**

#### Подготовка стекол

Мазки крови делают на предметных стеклах с помощью более узкого шлифованного предметного стекла.

1. С предметных стекол, бывших в употреблении и соприкасавшихся с иммерсионным маслом, последнее удаляют сухой тряпкой или бензином. Затем стекла кипятят без мыла и соды в течение 15-20 мин, промывают чистой водой и погружают на 1 ч в насыщенный раствор двуххромовокислого калия в серной кислоте. Обработанные таким образом стекла промывают в течение не менее 1 ч под струей водопроводной воды и насухо вытирают чистым полотенцем.
2. При отсутствии двуххромовокислого калия и серной кислоты стекла, бывшие в употреблении, кладут в мыльный раствор и выдерживают в нем 8-10 ч, а затем в том же растворе кипятят их 5-10 мин. От более длительного кипячения стекла делаются мутными. После кипячения стекла вынимают и тщательно промывают под струей водопроводной воды, а затем насухо вытирают.
3. Стекла, не бывшие в употреблении, промывают в горячей воде и насухо вытирают.

#### Приготовление мазков.

Взяв предметное стекло за длинные края, прикасаются его поверхностью (отступая 0,5-1 см от узкого края) к капле крови (но не к коже). Предметное стекло держат на столе или в левой руке за узкие края. Правой рукой приставляют шлифованное стекло узким краем к стеклу с кровью слева от капли под углом 45° и продвигают его вправо до соприкосновения с кровью.

Выжидают, пока кровь расплывется по всему ребру шлифованного стекла, и затем легким быстрым движением ведут его справа налево до тех пор, пока не будет исчерпана вся капля. Капля крови должна быть небольшой (не более 10 мкл) и соразмерена так, чтобы весь мазок помещался на стекле, не доходя 1-1,5 см до его края. Нельзя прекращать

размазывание и отнимать стекло раньше, чем капля будет исчерпана. Нельзя также сильно нажимать на стекло, так как многие клетки могут оказаться поврежденными. Хорошо сделанный мазок тонок, имеет желтоватый цвет и оканчивается «метелочкой».

Густо-розовые и красноватые мазки непригодны для счета, так как они слишком толсты и клеточные элементы при этом дифференцировать невозможно. После приготовления мазки быстро сушат на воздухе до исчезновения влажного блеска. При медленном высыхании может изменяться морфология клеток.

На высушенном мазке уголком предметного стекла или карандашом (только не химическим) пишут фамилию, инициалы больного, дату. При необходимости переслать мазок с консультационной целью в другой город мазок рекомендуется делать на хорошо отмытой использованной рентгеновской пленке, нарезанной по размеру предметного стекла. Такие мазки можно пересылать в письмах.

#### Симптом крошковатости мазка крови.

При заболеваниях, протекающих с повышенным содержанием фибриногена в крови, мазок, сделанный на предметном стекле, имеет крошковатый характер. На этот простой, и доступный признак рекомендуется обратить особое внимание при взятии крови.

#### Фиксация мазков.

После высыхания производится обработка мазков фиксирующими жидкостями, придающими форменным элементам стойкость по отношению к содержащейся в красках воде, которая без фиксации мазков гемолизует эритроциты и изменяет строение лейкоцитов. Кроме того, фиксация, вызывая коагуляцию белка, прикрепляет препарат к стеклу. Лучшим фиксатором является метиловый спирт.

Препараты в специальных штативах опускают в раствор фиксатора. В метиловом спирте мазки выдерживают не менее 5 мин, а в этиловом и денатурированном спирте и смеси Никифорова – не менее 30 мин.

По окончании срока фиксации препараты вынимают, сушат на воздухе или ополаскивают в банке с нейтрализованной дистиллированной водой и укладывают мазками вверх на стеклянный мостик для окраски.

#### Окраска мазков.

Краску следует готовить на воде нейтральной реакции.

Все предложенные методы окраски мазков основаны главным образом на химическом сродстве основных частей клеток к определенным анилиновым краскам и в меньшей степени на их физических свойствах. Цитоплазма одних клеток, будучи щелочной, имеет сродство к кислым краскам, выявляя оксифильные элементы крови. Цитоплазма других клеток, содержащих базофильные и нейтрофильные субстанции, поглощает и кислые, и основные краски. Ядра, содержащие в значительном количестве нуклеиновую кислоту, связывают главным образом основные краски.

К основным гематологическим краскам относятся метиленовый синий и его производные – азур I (метиленазур) и азур II (смесь равных частей азура I и метиленового синего), к кислым – водорастворимый желтый эозин.

Азур-эозиновые смеси красок обладают высокой чувствительностью к реакции воды и поэтому применяемая для приготовления красителей и для смывания их дистиллированная вода должна иметь нейтральную реакцию, т. е. рН 7,0. При кислой реакции воды клетки долго не прокрашиваются и имеют красный оттенок. При щелочной

реакции эритроциты окрашиваются в серовато-синий цвет, а ядра и цитоплазма клеток – в очень темные цвета.

#### Окраска по Романовскому

Окрашивание различных элементов клеток в разные цвета и оттенки смесью основных (азур II) и кислых (водорастворимый желтый эозин) красок.

В продаже имеется готовый раствор краски Романовского, а также сухая краска Романовского (Гимзы), из которой готовят раствор.

Раствор оставляют на 3-5 сут, часто взбалтывая для лучшего растворения краски. Затем прибавляют 250 мл чистого глицерина и вновь оставляют на 3-5 сут, периодически взбалтывая. Приготовленная таким образом краска хорошо сохраняется длительное время в темных бутылках в шкафу, где нет ни кислот, ни щелочей.

Вновь полученный или приготовленный раствор красителя Романовского перед употреблением оттитровывают, т. е. окрашивают несколько фиксированных мазков крови в течение 25-40 мин различно разведенной краской (1-2 капли краски на 1 мл дистиллированной воды). По хорошо окрашенному препарату устанавливают нужное количество капель краски на 1 мл воды и время окрашивания.

Фиксированные мазки укладывают на мостик, состоящий из двух стеклянных палочек, уложенных на два противоположных края кюветы.

Затем мазки заливают разведенной краской, которую наливают на мазок возможно более высоким слоем. Окрашивание длится в зависимости от температуры воздуха в помещении от 25 до 45 мин.

Если температура в помещении низкая или требуется быстрее окрасить мазки, то разведенную краску можно подогреть до 60–70° (до кипения доводить нельзя).

После окончания окраски краску смывают (но не сливают) сильной струей воды и ставят мазки вертикально в штатив для просушивания. Разведенной краской можно пользоваться только в течение одного дня.

#### Окраска по Паппенгейму – Крюкову.

Это комбинированная окраска фиксатором-красителем Мая-Грюнвальда и краской Романовского, дающая возможность очень хорошо дифференцировать составные части клеток.

При отсутствии готового красителя-фиксатора Мая-Грюнвальда его можно приготовить растворением 0,3-0,5 г сухой краски Мая-Грюнвальда в 100 мл чистого метилового спирта с добавлением (или без него) 50 мл чистого глицерина. Краситель в обоих случаях созревает 4 дня при комнатной температуре.

На нефиксированный мазок наливают пипеткой 10-15 капель готового красителя-фиксатора Мая-Грюнвальда, через 3 мин прибавляют по каплям столько же воды и продолжают окрашивание еще 1 мин, после чего краситель смывают водой и мазок высушивают на воздухе.

Затем на высушенный мазок наливают свежеприготовленный водный раствор красителя Романовского на 8-15 мин в зависимости от температуры в помещении, смывают краску водой и мазок высушивают на воздухе. Этот способ окраски является наилучшим.

#### Приготовление и окраска толстой капли

В данной технологии используется больший объем крови с целью улучшения условий обнаружения в крови малярийных плазмодиев, спирохет возвратного тифа, эозинофилов и полихроматофилов.

Приготавливают обычный мазок крови и на толстые места его наносят отдельно две большие капли крови. Каждую каплю концом иглы или углом другого стекла размазывают до величины двух- или трехкопеечной монеты и сушат на воздухе.

Мазок до нанесения толстых капель и после не фиксируют, а наливают на него на несколько минут дистиллированную воду для извлечения гемоглобина. Окрашенную гемоглобином воду затем осторожно сливают и на препарат наливают разведенную, как обычно, краску Романовского на 20-30 мин. После окраски препарат осторожно промывают водой, чтобы не смыть каплю, и высушивают на воздухе.

Большой объем крови, чем в мазках, и гемолиз эритроцитов позволяют легче обнаружить в крови малярийные плазмодии, спирохеты возвратного тифа, а также эозинофилы и полихроматофилы.

При хорошей фиксации и окраске любым из приведенных выше способов ядра лейкоцитов окрашиваются в вишнево-красный цвет с хорошо видимой структурой хроматина, ядрышки – в синевато-голубоватый или в светло-фиолетовый, цитоплазма нейтрофилов – в светло-розовый, лимфоцитов – в чистый сине-голубой, моноцитов – в серо-голубой или дымчатый, зернистость нейтрофильная – в красновато-фиолетовый, эозинофильная – в оранжево-красный, базофильная – в темно-фиолетовый или темно-серый, азурофильная – в вишнево-красный, эритроциты – в бледно-розовый цвет.

#### Окраска для выявления базофильной пунктации эритроцитов по Фрейфельд

Базофильная зернистость эритроцитов хорошо воспринимает щелочной раствор метиленового синего.

Мазок фиксируют в течение 3 мин в метиловом спирте, а затем окрашивают в течение часа раствором метиленового синего (5 капель 1% раствора на 20 мл водопроводной воды). Краску смывают водой и мазок высушивают.

Базофильную пунктацию можно обнаружить и в мазках крови, окрашенных обычными способами по Романовскому, Паппенгейму-Крюкову и др. В этом случае она приобретает фиолетово-синий цвет.

Обычно сосчитывают 10 000 эритроцитов и отмечают количество эритроцитов с базофильной пунктацией. Лучше считать 1 000 000 эритроцитов, а ответ давать в пересчете на 10 000.

У здоровых людей количество эритроцитов с базофильной пунктацией колеблется от 0 до 3-4 на 10 000 эритроцитов.

### **ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ**

1. Способы забора биологического материала для исследования.
2. Виды пробирок и антикоагулянтов для гематологических исследований.
3. Способы хранения и транспортировки биологического материала.
4. Методы приготовления, фиксации и окраски гематологических мазков.

### **САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ**

1. Записать протокол практического занятия с указанием цели и задач, основных способов получения биологического материала.
2. Записать условия хранения и транспортировки основных видов биологического материала.

## **Тема занятия 6: Биохимические методы исследования.**

**Цель занятия:** Изучить аналитические методы и методы разделения применяющиеся в биохимических исследованиях биологических жидкостей.

### **Перечень знаний и практических навыков:**

- Иметь представление о биохимических методах исследования, которые применяются в диагностической медицине.
- Значение и принцип основных биохимических методов, применяемых в медицине.
- Освоить методы биохимического исследования: аналитические методы и методы разделения.

Биохимические исследования проводятся для получения информации о многочисленных химических и физико-химических процессах, протекающих в клетках и тканях живых организмов в норме и при патологии.

Клинические биохимические тесты составляют свыше одной трети всех лабораторных клинических исследований.

Чаще всего биохимические лаборатории выполняют «**базовые**», или «**основные**», исследования – наиболее часто требуемые врачами тесты. Распространенными являются определенные комбинации биохимических исследований (мочевина и электролиты, тесты функции печени, газы крови).

Не каждая лаборатория оборудована для выполнения всех возможных биохимических тестов. Ряд специальных исследований для диагностики редких заболеваний может выполняться только в крупных лабораториях или диагностических центрах.

Еще одна группа биохимических исследований связана с необходимостью срочного принятия решения клиницистами в экстренных ситуациях – это так называемые **ургентные тесты**, или **тесты при неотложных состояниях**.

При различных патологических состояниях происходят изменения химического состава в клетках, тканях, биологических жидкостях и выделениях. Наиболее часто биохимическому анализу подвергают кровь, мочу, кал, слюну, ликвор, желчь и желудочный сок. Реже исследуют химический состав красного костного мозга, околоплодной жидкости, пота, рвотных масс, волос, ногтей и спермы.

Химический состав биологического материала может изменяться как количественно (увеличение или понижение содержания каких-либо веществ, нарушение соотношения между ними), так и качественно (выявление отсутствующих или не определяющихся в норме веществ). В связи с этим биохимический анализ в некоторых случаях проводят прицельно, определяя уровень вещества в исследуемом материале или выявляя только его присутствие.

Многие наследственные заболевания связаны с нарушением обмена веществ. Часто это вызвано генетически обусловленным дефицитом каких-либо ферментов, в таком случае биохимические исследования помогают поставить точный диагноз. Иногда для этого подвергают анализу и кусочки тканей внутренних органов.

Биохимические исследования позволяют выявить некоторые нарушения обмена веществ уже в период внутриутробного развития или сразу после рождения ребенка, при этом возможно раннее начало лечения наследственных заболеваний, что дает

возможность нормализовать состояние плода или ребенка, наилучшим образом обеспечить условия для его развития в соответствии с возрастом.

С помощью распространенных биохимических анализов можно выявить наличие нарушений обмена веществ, а для постановки точного диагноза проводят более детальные исследования. Многие биохимические анализы, позволяющие выявить наследственные нарушения обмена веществ, угрожающие жизни или развитию детей, в настоящее время проводят массово в форме скрининг-тестов. Например, всех новорожденных в роддоме обследуют на фенилкетонурию. Кроме того, с помощью биохимических тестов выявляют такие заболевания, как энзимопатии, гликогенозы, муковисцидоз, адреногенитальный синдром. Исследованию в таких случаях подвергают наиболее доступный материал от больного (кровь и мочу). После скринингового обследования делают уточняющие биохимические анализы, определяют количество вещества, свидетельствующего о заболевании, в единице исследуемого материала и следят за его уровнем в организме в дальнейшем.

Аналитическая химия – это наука о методах определения химического состава вещества и его структуры.

Изучение состава веществ, проводится с помощью химического анализа. Химический анализ может быть:

- Количественным.
- Полуколичественным.
- Качественным.

Количественное определение исследуемых компонентов проводится обычно «мокрым» анализом, когда и исследуемые вещества и химические реагенты находятся в растворенном состоянии.

Для полуколичественных и иногда количественных определений используется также метод «сухого» анализа, когда на специальную бумагу или пленку в определенных пропорциях наносятся химические реагенты, необходимые для анализа, высушиваются и стабилизируются. После нанесения точного объема биологической жидкости (кровь, сыворотка и др.) реагенты активируются и химическая реакция протекает так же, как и при «мокром» анализе. Разработанные для этих целей тест-полоски, имеют довольно сложное строение и состоят из нескольких слоев. В наружном слое происходит отделение сыворотки от форменных элементов. Сыворотка затем проникает в нижележащие слои, содержащие химические реагенты, которые отделены друг от друга. Изменение окраски продуктов реакции регистрируется с помощью отражательного фотометра.

Для качественной оценки или полуколичественных определений широко используются диагностические полоски, которые позволяют определять в биологических жидкостях различные вещества (белки, углеводы, кетоновые тела, желчные пигменты и др.). Полоску опускают в биологическую жидкость, затем извлекают, подсушивают фильтровальной бумагой и прикладывают к цветной стандартной шкале. Сравнивают окраски и делают вывод о наличии определенных веществ и их примерном содержании.

В Аналитической химии в зависимости от вида анализа различают:

- методы разделения;
- методы определения (обнаружения);
- гибридные, сочетающие методы первых двух групп.

В методах разделения основная задача – отделение мешающих компонентов или выделение определяемого компонента в виде, пригодном для количественного определения.

С целью разделения неоднородных жидких сред применяют центрифугирование. Центрифугирование позволяет разделить смесь, состоящую из двух или более компонентов с разной удельной плотностью, если по крайней мере один из этих компонентов – жидкость. Разделение веществ с помощью центрифугирования основано на разном поведении частиц в центробежном поле. В центробежном поле частицы, имеющие разную плотность, форму или размеры, осаждаются с разной скоростью. Таким образом, получают сыворотку и плазму крови для анализа их состава, а также осадок мочи для микроскопии.

В методах определения содержание анализируемого компонента находят в пробе без предварительного разделения.

Методы определения подразделяют на:

- химические методы анализа (гравиметрический анализ, титриметрия);
- физико-химические методы анализа (например, электрохимический, фотометрический, кинетический, хроматографический);
- физические методы анализа (спектральные, ядерно-физические и др.).

Гравиметрический метод – определение количества аналита посредством взвешивания сухого продукта реакции. В современной лабораторной диагностике применяют при определении концентрации фибриногена в плазме: высушивают свернувшийся сгусток плазмы с помощью фильтровальной бумаги до постоянного веса и взвешивают на аналитических весах.

Из физико-химических методов в клинической биохимии чаще всего используют оптические методы – колориметрию, спектрофотометрию, нефелометрию, атомно-абсорбционную фотометрию, флюорометрию.

Оптические методы исследования веществ основаны на способности этих веществ породить оптическое излучение или взаимодействовать с ним. На данном свойстве основаны все исследования в современных биохимических лабораториях: к биологической жидкости добавляется реагент или колорант в определенной пропорции, и после инкубации измеряется оптическая плотность раствора относительно холостой пробы (обычно дистиллированная вода или воздух). По формуле из закона Бугера-Ламберта-Бера определяется концентрация аналита.

Из физических методов в современной практике используется пламенная фотометрия, а также определение концентрации электролитов в анализируемой пробе с помощью ионообменных электродов.

### **Электрофорез и хроматография**

В процессе проведения биохимического анализа при клинко-лабораторных исследованиях часто возникает необходимость предварительного выделения анализируемых веществ, отделения их от других компонентов, находящихся в исследуемом биологическом материале. Для этих целей чаще всего используются такие физико-химические методы, как электрофорез и хроматография.

*Электрофорез* – процесс разделения заряженных частиц в электрическом поле. Многие биологически важные молекулы (белки, аминокислоты, нуклеиновые кислоты и др.) имеют в своем составе ионизирующие группы. Поэтому в биологических жидкостях

(крови, лимфе и др.) они существуют в виде катионов и анионов. Помимо этого молекулы имеющие примерно одинаковый заряд могут отличаться молекулярными массами и отношением заряда к массе. На этих различиях и основано разделение ионов при движении их в растворе под действием электрического поля.

Скорость перемещения зависит от величины заряда, а также в ряде случаев, от размера и формы молекул. Так как в большинстве случаев молекулы отличаются по своим физическим и химическим свойствам то очень немногие из них имеют одинаковую электрофоретическую подвижность. Скорость движения частиц (см/с) при напряженности электрического поля 1 В/см называется электрофоретической подвижностью.

В зависимости от способа проведения электрофореза его делят на:

- свободный или фронтальный (электрофоретическое разделение осуществляется в водной фазе);
- зональный (электрофорез на поддерживающей среде, когда разделение осуществляется на каком-либо инертном носителе – бумага, асбестовые пластины, целлюлоза, агаровый, крахмальный и полиакриламидный гели и др.).

Суть зонального электрофореза заключается в том, что раствор смеси веществ подлежащих разделению вводят на определенный участок носителя, пропитанного электролитом. Биологический материал, подлежащий электрофоретическому разделению, растворяют или суспензируют в буфере, чтобы обеспечить проведение электрического тока, этим же буфером насыщают и носитель. В растворе между электродами ток обусловлен ионами буфера и образца, в остальной части цепи – электронами. После снятия электрического поля ионы исследуемой смеси распределяются в соответствии с их электрофоретической подвижностью.

В клиничко-лабораторных исследованиях чаще используется зональный электрофорез на агаре или полиакриламидном геле. При наложении электрического поля частицы подлежащей разделению смеси придут в состояние направленного движения (будут двигаться к противоположно заряженному полюсу) и распределятся на носителе в виде отчетливых зон, которые легко обнаружить соответствующим аналитическим методом.

Важными характеристиками процесса зонального электрофореза являются градиент потенциала (В/см) и сила тока, приходящаяся на 1 см поперечного сечения полосы (плотность тока – мА/см).

Под градиентом потенциала понимают падение напряжения на 1 см носителя расположенного между электродами.

В зависимости от градиента потенциала различают:

- низковольтный электрофорез (5-15 В/см) – используется для разделения высокомолекулярных соединений типа белков, липопротеинов, гликопротеинов и др.,
- высоковольтный (более 50 В/см) – используется для разделения низкомолекулярных веществ, типа аминокислот, их производных и др. Т. к. различие в заряде и молекулярной массе у таких веществ невелико, то нужен большой градиент потенциала, чтобы произошло эффективное разделение частиц.

В зависимости от целей исследования электрофорез делят на:

- аналитический;
- препаративный.

В клинико-биохимических исследованиях используют обычно аналитический электрофорез, который позволяет работать с очень небольшими количествами исследуемого вещества и вести их количественное определение. В тех случаях, когда требуется получить большое количество изучаемого вещества, необходимого для дальнейших исследований используют препаративный вариант электрофореза.

В настоящее время для анализа биологических смесей все шире используется капиллярный электрофорез, при котором электрофоретическое разделение проводится в тонких капиллярах диаметром 25-200 мкм и длиной 10-100 см, заполненных буферным раствором. Под действием электрического поля (электрофорез проводится при напряжении 10000-30000 В) в капилляре создается электроосмотический поток, направленный к отрицательному полюсу, вместе с которым перемешаются и компоненты подлежащие разделению. В зависимости от заряда и массы скорость их движения будет различной, что приводит к фракционированию смеси. В конечной точке капилляра разделенные компоненты количественно определяют, используя различные оптические детекторы. Близким к электрофорезу является метод изоэлектрического фокусирования, когда разделение белков и некоторых других анализируемых веществ идет в зависимости от величины их изоэлектрических точек.

Изоэлектрической точкой называют такое состояние белковой молекулы, при котором ее суммарный заряд равен нулю. В методе изоэлектрического фокусирования вначале между электродами устанавливают градиент рН с помощью веществ особой химической природы, получивших название амфолитов-носителей. Заряженные молекулы белков в ходе опыта будут двигаться в направлении противоположно заряженного электрода в соответствии с их действительным зарядом. Так как молекулы белков амфотерны, то при перемещении в градиенте рН их суммарный заряд будет меняться до тех пор, пока он не станет равным 0. Это произойдет в том месте, где величина рН будет равна изоэлектрической точке. Поэтому молекулы с одинаковой изоэлектрической точкой сконцентрируются в одной узкой зоне.

### ***Хроматография.***

Хроматография – это метод разделения и определения веществ, основанный на распределении компонентов между двумя фазами – подвижной и неподвижной. Неподвижной (стационарной) фазой служит твердое пористое вещество (часто его называют сорбентом) или пленка жидкости, нанесенная на твердое вещество. Подвижная фаза представляет собой жидкость или газ, протекающий через неподвижную фазу, иногда под давлением.

Компоненты анализируемой смеси (сорбаты) вместе с подвижной фазой передвигаются вдоль стационарной фазы. Ее обычно помещают в стеклянную или металлическую трубку, называемую колонкой. В зависимости от силы взаимодействия с поверхностью сорбента (за счет адсорбции или по какому-либо другому механизму) компоненты будут перемещаться вдоль колонки с разной скоростью. Одни компоненты останутся в верхнем слое сорбента, другие, в меньшей степени взаимодействующие с сорбентом, окажутся в нижней части колонки, а некоторые и вовсе покинут колонку вместе с подвижной фазой (такие компоненты называются неударживаемыми, а время их удерживания определяет “мертвое время” колонки). Таким образом происходит быстрое разделение сложных смесей компонентов. Следует подчеркнуть следующие достоинства хроматографических методов:

1. Разделение носит динамический характер, причем акты сорбции-десорбции разделяемых компонентов повторяются многократно. Этим обусловлена значительно большая эффективность хроматографического разделения по сравнению со статическими методами сорбции и экстракции.

2. При разделении используют различные типы взаимодействия сорбатов и неподвижной фазы: от чисто физических до хемосорбционных. Это обуславливает возможность селективного разделения широкого круга веществ.

3. На разделяемые вещества можно накладывать различные дополнительные поля (гравитационное, электрическое, магнитное и др.), которые, изменяя условия разделения, расширяют возможности хроматографии.

4. Хроматография – гибридный метод, сочетающий одновременное разделение и определения нескольких компонентов.

5. Хроматография позволяет решать как аналитические задачи (разделение, идентификация, определение), так и препаративные (очистка, выделение, концентрирование). Решение этих задач можно сочетать, выполняя их в режиме “on line”.

Методы хроматографического анализа различаются:

- по агрегатному состоянию системы, в которой проводится разделение - на газовую и жидкостную;
- по механизму разделения - на адсорбционную, распределительную, ионообменную, гель-хроматографию, аффинную и др.

В ряде случаев разделение оказывается результатом нескольких одновременно протекающих процессов с различными механизмами. Это приводит к образованию хроматограммы смешанного типа, но один из процессов всегда является доминирующим.

В газовой хроматографии подвижной фазой является газ. В зависимости от состояния неподвижной фазы газовая хроматография подразделяется на газо-адсорбционную, когда неподвижной фазой является твердый адсорбент и газо-жидкостную, когда неподвижной фазой является жидкость, или точнее пленка жидкости на поверхности частиц твердого адсорбента.

Жидкостная хроматография основана на адсорбции твердым веществом, играющим роль неподвижной фазы, определяемых компонентов, находящихся в растворенном состоянии.

В основе адсорбционной хроматографии лежит различная сорбируемость разделяемых веществ на твердом сорбенте в соответствии с их сродством к адсорбенту. При этом сорбируемость растворителя должна быть незначительной по сравнению с таковой анализируемой смеси. Процесс адсорбции зависит от свойства адсорбента, адсорбируемых соединений, растворителя. В зависимости от этих свойств вещества, подлежащие хроматографическому разделению, образуют адсорбционный ряд выражающий относительное адсорбционное сродство его членов к адсорбенту. Образующееся в колонке адсорбента зональное распределение веществ соответствует их положению в адсорбционном ряду. В качестве адсорбентов в адсорбционно-жидкостной хроматографии применяются органические и неорганические вещества: сахароза, крахмал, оксид алюминия, силикагель, активированный уголь и др.

Ионообменная хроматография основана на способности некоторых твердых веществ (ионитов) обмениваться ионами с подлежащими разделению веществами. Применяемые в ионообменной хроматографии иониты могут быть как органическими, так

и неорганическими. Способность к ионному обмену определяется строением ионита, представляющего собой каркас, на котором закреплены активные группы (-COOH, -SO<sub>3</sub>H, -NH<sub>3</sub>Cl, -NH<sub>2</sub>Cl и др.). В зависимости от обмена катионов или анионов иониты делят на катиониты, аниониты и амфолиты. На принципах ионообменной хроматографии основано разделение аминокислот в аминокислотных анализаторах.

Распределительная хроматография основана на распределении компонентов разделяемой смеси между несмешивающимися фазами. Образующая неподвижную фазу жидкость находится на поверхности или в порах твердого носителя, на который наносится смесь веществ, подлежащих разделению. Затем создают ток подвижного растворителя. Чем лучше вещество растворимо в жидкости, играющей роль подвижной фазы, тем дальше оно продвинется по направлению тока растворителя. Вещества, плохо растворимые в подвижной фазе, расположатся ближе к точке нанесения. В зависимости от техники выполнения распределительная хроматография выполняется как колоночная, бумажная или тонкослойная. Методика распределительной хроматографии в колонках аналогична адсорбционной или ионообменной: вначале в колонку с носителем и закрепленным на нем неподвижной фазой вводят небольшой объем раствора смеси компонентов и затем промывают колонку подвижным растворителем.

При бумажной хроматографии разделение проводят на полосах бумаги, где роль неподвижной фазы играет вода, удерживаемая гидрофильными целлюлозными волокнами бумаги, а подвижной фазой является какой-либо органический растворитель. В каждый момент имеет место определенное перераспределение разделяемых компонентов между слоем органического растворителя и водой. В результате одни вещества движутся быстрее вслед за фронтом органического растворителя, другие в той или иной степени отстают, а некоторые вообще остаются на стартовой линии.

При тонкослойном варианте разделение идет в тонком слое носителя. Чаще всего для этих целей используются пластинки из силикагеля (например, Silufol) широко используемые для фракционирования липидов, аминокислот и других биосубстратов.

Гель-хроматография основана на различии в размерах и молекулярных массах белков и других макромолекул, являющихся важнейшей характеристикой молекулы. В качестве материала-носителя в гель-хроматографии используется сшитый декстран (сефадекс), сшитый полиакриламид (биогель Р) и агароза. Они получили широкое распространение как в аналитической, так и в препаративной лабораторной работе, а также в производстве, в химической и биологической промышленности.

Колонка с сефадексом действует по принципу «молекулярного сита». Молекулы большие, чем самые крупные поры разбухшего сефадекса не могут проникать в гранулы и сравнительно быстро проходят в жидкой фазе вне частиц геля, поэтому элюируются первыми. В настоящее время имеется большое число сефадексов, позволяющих разделить белки и полипептиды в диапазоне молекулярных масс от 700 до 800000 Да.

Были разработаны также хроматографические материалы для разделения белков, путем связывания некоторых ионообменных групп с сефадексами. Полученные производные-ДЭАЭ-сефадекс, КМ-сефадекс и другие широко используются при хроматографии.

Аффинная хроматография или (биоспецифическая по сродству хроматография), основана на принципе специфического взаимодействия с особыми веществами (лигандами), закрепленными на носителе. Биологические макромолекулы обладают

способностью обратимо связывать многие вещества. Например, ферменты образуют комплексы с субстратами, антитела взаимодействуют с антигенами, мРНК с комплементарной ДНК и т. д. Все эти взаимодействия строго специфичны. Образование специфических комплексов биологических макромолекул, способных в определенных условиях к диссоциации лежит в основе метода разделения получившего название аффинной хроматографии. Если закрепить один из компонентов этого комплекса на матрице, иммобилизовать его, то получится специфический сорбент для второго компонента (аффинат). Нерастворимые аффинаты готовят обычно путем ковалентного присоединения лиганда к нерастворимому носителю. Если смесь белков пропустить через колонку, заполненную таким аффинатом, то все молекулы, которые не обладают сродством к лиганду, закрепленному на носителе пройдут не задерживаясь, а белок, имеющий сродство к аффинному лиганду, будет адсорбироваться на колонке. Вымыть адсорбированный белок с колонки можно буферными смесями с измененной величиной рН, ионной силой, а также введением в состав элюента веществ, ослабляющих связи между белками и лигандами.

Одними из первых биоспецифических сорбентов, были антигены, ковалентно связанные с нерастворимым носителем. Они были использованы для получения моноспецифических антител. Затем аналогичным путем были получены иммобилизованные ферменты. Стало возможным создание ферментных реакторов для получения различных веществ с использованием иммобилизованных ферментов.

#### **Автоматизация гематологических исследований**

В современных автоматических устройствах для гематологического анализа используются в основном два технологических принципа - кондуктометрический и оптический.

Основными параметрами, которые позволяют определять современные гематологические анализаторы, являются: количество лейкоцитов, эритроцитов, тромбоцитов, содержание гемоглобина, показатель гематокрита, объем эритроцита, содержание гемоглобина в эритроците, лейкограмма и др.

Кондуктометрический принцип определения заключается в изменении сопротивления клетки в постоянном электрическом поле. Технология определения состоит в том, что фиксируется момент прохода через отверстие малого диаметра (апертуру) клеток крови. Для этого по обе стороны отверстия располагаются электроды с поданным на них напряжением. При протекании через отверстие чистого раствора электролита сопротивление в цепи мало, но в момент прохождения через апертуру клетки оно резко возрастает, что приводит к увеличению напряжения в цепи. Импульсы скачкообразного изменения напряжения фиксируются и подсчитываются специальным датчиком. Специальный прибор (дискриминатор) пропускает импульсы заранее заданной амплитуды, что позволяет регистрировать клетки в зависимости от их размера. О количестве однотипных частиц судят по числу импульсов, возникающих при прохождении клеток крови через апертуру строго определенного размера.

Оптический принцип определения в своей основе имеет измерение величины светопоглощения или светорассеивания. В анализаторах этого типа регистрируются электрооптические импульсы, возникающие при прохождении клеток крови в луче светового потока. Интенсивность импульса прямо пропорциональна размеру исследуемых частиц. Световой луч фокусируется на капилляр, через который проходят клетки, в

результате чего происходит либо светопоглощение, либо светорассеяние светового потока. Величина светопоглощения или светорассеяния обусловлена размером, формой и структурой клеток крови.

Для дифференциации клеток крови используется также радиочастотный анализ. Под действием токов высокой частоты, клетки в момент прохождения ими апертуры посылают сигналы, амплитуда которых зависит от размеров ядра, его плотности, характера цитоплазматических включений. Перед подсчетом лейкоцитов вызывают гемолиз эритроцитов гипотоническим раствором, подсчет тромбоцитов проводят после осаждения эритроцитов.

В зависимости от типа анализаторов они делятся на полуавтоматические, где подготовка пробы к исследованию (ее взятие, разбавление соответствующими растворами) производится вручную и полностью автоматические, где все эти процедуры проводятся в автоматическом режиме.

#### **Автоматизация биохимических исследований**

По аналогии с гематологическими, существуют полуавтоматические и автоматические биохимические анализаторы. При использовании полуавтоматического прибора реагенты и биопроба смешиваются оператором и подаются в пробозаборник, прибор измеряет оптическую плотность смеси и по заданной программе рассчитывает концентрацию аналита.

При использовании полностью автоматического анализатора необходимо запрограммировать его на необходимые виды анализа, ввести порядок установки проб пациентов на борту прибора и загрузить эти пробы, а также наборы реагентов на борт анализатора. По прошествии времени, необходимого для анализа, прибор выдает результат в печатном и электронном виде.

### **ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ**

1. Основные задачи биохимических методов.
2. Количественные и полуколичественные методы исследования.
3. Фотометрия. Определение, суть метода.
4. Электрофорез. Определение, суть метода.
5. Хроматография. Определение, суть метода.
6. Автоматизированные методы исследований.
7. Методы биохимического исследования. Аналитические методы и методы разделения. Фотометрия, электрофорез, хроматография, автоматизированные методы исследований.
8. Основные методы исследования состава биологических жидкостей.

### **САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ**

1. Записать протокол практического занятия с указанием цели и задач, основных способов получения биологического материала.
2. Записать методы биохимического анализа в КДЛ.

## **Тема занятия 7: Лабораторная диагностика заболеваний печени.**

**Цель занятия:** Освоить основные лабораторные методы диагностики заболеваний печени, изучить основные функции печени, клинические и биохимические синдромы поражения печени, диагностическое значение определения ферментов.

### **Перечень знаний и практических навыков:**

- Знать основные функции печени.
- Охарактеризовать клинические и биохимические синдромы поражения печени.
- Изучить методы лабораторной диагностики заболеваний печени.
- Уметь оценить правильность выбора лабораторного метода исследования функции печени.
- Овладеть навыком определения характера заболевания печени, основываясь на лабораторных данных.

Печень играет важную роль в обмене белков, углеводов, липидов. Клетки печени метаболизируют, детоксицируют и экскретируют экзо- и эндогенные вещества. Важной функцией печени является синтез белков плазмы. В печени также синтезируются желчные кислоты, необходимые для переваривания и всасывания жиров. Гликолиз, цикл Кребса, синтез и распад аминокислот, реакции окислительного фосфорилирования – все эти процессы представлены в гепатоцитах, богатых митохондриями. В печени представлены 2 основных типа клеток: гепатоциты или паренхиматозные клетки, составляющие около 60% всей клеточной массы, и Купферовы клетки, входящие в состав ретикуло-эндотелиальной системы и составляющие 30% от всех клеток печени.

### **Функции печени**

#### **Обмен углеводов.**

Выход глюкозы из печени поддерживает уровень сахара крови в промежутках между приемами пищи; основными источниками глюкозы при этом является гликоген (гликогенолиз и глюконеогенез). Печень также превращает в глюкозу галактозу и фруктозу.

#### **Обмен аминокислот и белков.**

Аминокислоты, получаемые из пищи и образующиеся при катаболизме белков тканей, поступают в печень. В печени некоторые из них дезаминируются или трансаминируются до кетокислот, другие метаболизируются до мочевины и аммиака. В печени также синтезируется большинство белков плазмы (за исключением иммуноглобулинов, синтезируемых лимфоидной тканью).

#### **Обмен липидов.**

Печень извлекает из сосудистого русла остатки хиломикронов и синтезирует липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП), которые превращаются печеночной липазой в липопротеины низкой плотности (ЛПНП). На поверхности гепатоцитов находится большое количество ЛПНП-рецепторов. В печени синтезируются предшественники ЛПНП, также как и фермент лецитин-холестерин ацилтрансфераза (ЛХАТ), превращающий предшественники в функциональные ЛПНП-частицы. Роль печени в обмене липидов включает также продукцию кетонных тел из неэтерифицированных жирных кислот, секрецию холестерина в желчь.

### **Обмен желчных кислот.**

Основными желчными кислотами являются холевая и хенодезоксихолевая кислоты, синтезируемые из холестерина только в печени. Они секретируются в желчь, и большая их часть вновь возвращается по кровотоку из кишечника в печень. Синтез новых желчных кислот регулируется количеством «реутилизированных» кислот. Кишечная микрофлора дегидроксилирует первичные желчные кислоты до вторичных кислот – дезоксихолевой и литохолевой.

### **Конъюгация и детоксикация.**

Конъюгации и детоксикации подвергаются стероидные гормоны и лекарственные препараты.

### **Функции печени и методы их оценки**

<b>Функции</b>		<b>Методы оценки</b>
Обмен углеводов	Глюконеогенез	Уровень глюкозы в крови, продукция глюкозы печенью
	Утилизация лактата	Уровень лактата в крови
	Обмен галактозы	Способность к элиминации галактозы
Обмен белков и аминокислот	Синтез белков плазмы	Концентрация белков плазмы
	Мочевина	Уровень мочевины сыворотки
	Метаболизм аммиака	Уровень аммиака крови
Обмен липидов	Метаболизм липопротеинов	Уровень липидов и липопротеинов сыворотки
	Гидроксилирование витамина D	Уровень 25-гидроксихолекальциферола
	Синтез желчных кислот	Уровень желчных кислот в сыворотке, тесты на мальабсорбцию жиров
Детоксикация и экскреция	Обмен билирубина	Уровень билирубина в сыворотке, билирубин в уробилиноген в моче
	Экскреция ксенобиотиков	Экскреция аминопирина, экскреция бромсульфалеина
	Метаболизм гормонов	Определение гормонов, оценка электролитного баланса

### **Лабораторные тесты диагностики заболеваний печени**

Под тестами оценки функций печени обычно подразумеваются измерения компонентов крови, свидетельствующих о наличии и типе поражения печени. В повседневной клинической практике для этого используется определение уровня билирубина, активности ферментов (трансаминаз и щелочной фосфатазы) в образцах сыворотки. Определение концентрации сывороточного альбумина также может быть одним из показателей заболеваний печени. Эти биохимические определения могут помочь в дифференциации следующих состояний:

- Обструкция билиарного тракта.
- Острое гепатоцеллюлярное повреждение.
- Хронические заболевания печени.

Концентрация общего билирубина сыворотки и активность сывороточной фосфатазы свидетельствует о холестазах, блокаде оттока желчи.

Концентрация альбумина сыворотки является одним из существенных показателей синтетической способности печени, хотя на уровень альбумина влияют и многие другие факторы.

### **Клинические и биохимические синдромы**

Болезни печени сопровождаются рядом лабораторных синдромов. При анализе результатов биохимического исследования у больных с заболеваниями печени целесообразно выделять четыре лабораторных синдрома, каждый из которых в известной степени соответствует определенным морфологическим и функциональным изменениям в органе: цитолитический синдром, мезенхимально-воспалительный синдром, холестатический синдром (синдромхолестаза), синдром малой печеночно-клеточной недостаточности. Обычно в каждом конкретном случае заболевания имеет место сочетание нескольких биохимических синдромов.

**Синдром нарушения целостности гепатоцитов** (синдром цитолиза или цитолитический синдром). Характеризуется повышением в плазме крови активности индикаторных ферментов – АсАТ (аспартатаминотрансферазы), АлАТ (аланинаминотрансферазы), ЛДГ (лактатдегидрогеназы) и ее изоферментов – ЛДГ4 и ЛДГ3; специфических печеночных ферментов: фруктозо-1-фосфатальдолазы, сорбитдегидрогеназы, а также концентрации ферритина, сывороточного железа, витамина В<sub>12</sub> и билирубина главным образом за счет повышения прямой фракции.

В оценке степени выраженности патологического процесса основное значение придается активности АлАТ и АсАТ. Повышение их уровня в сыворотке крови менее чем в 5 раз по сравнению с верхней границей нормы рассматривается как умеренная, от 5 до 10 раз – как средняя степень и свыше 10 раз – как высокая степень выраженности.

Морфологической основой этого синдрома являются гидропическая и ацидофильная дистрофия и некроз гепатоцитов с повреждением и повышением проницаемости клеточных мембран.

**Синдром холестаза** (эксреторно-билиарный синдром, холестатический синдром – нарушение эксреторной функции печени). Сопровождается повышением уровня в сыворотке крови ЩФ (щелочная фосфатаза), ЛАП (лейцинаминопептидаза), ГГТФ, холестерина, Р-липопротеинов, конъюгированной фракции билирубина, желчных кислот, фосфолипидов, снижается экскреция бромсульфалеина (вофавердина) и радиофармакологических препаратов. Морфологической основой внутриклеточного холестаза являются ультраструктурные изменения гепатоцита – гиперплазия гладкой цитоплазматической сети, изменения билиарного полюса гепатоцита, накопление компонентов желчи в гепатоците, которые нередко сочетаются с цитолизом гепатоцитов. При внутрипеченочном холестаза выявляют накопление желчи в желчных ходах, а при внепеченочном – расширение междольковых желчных протоков.

**Синдром печеночно-клеточной недостаточности** (синдром синтетической недостаточности). Проявляется уменьшением содержания в сыворотке крови общего белка и особенно альбумина, трансферрина, холестерина, II, V, VII факторов свертывания крови, холинэстеразы, альфа-липопротеинов, но в то же время повышением билирубина за счет неконъюгированной фракции. Морфологическим субстратом синдрома являются выраженные дистрофические изменения гепатоцитов и/или значительное уменьшение функционирующей паренхимы печени вследствие ее некротических изменений.

Нарушенная функция гепатоцитов может приводить к нарушению синтеза альбумина, что наблюдается при хронических заболеваниях печени. Наиболее выраженные гипоальбуминемии выявляются при портальном циррозе, жировой дистрофии печени.

**Мезенхимально-воспалительный синдром.** Характеризуется гипергаммаглобулинемией, повышением показателей белково-осадочных проб, увеличением СОЭ, появлением в крови продуктов деградации соединительной ткани (С-реактивный белок, серомукоид и др.). Наблюдаются изменения показателей клеточных и гуморальных иммунных реакций: появляются антитела к субклеточным фракциям гепатоцита, ревматоидный фактор, антимитохондриальные и антиядерные антитела, изменения количества и функциональной активности Т- и В-лимфоцитов, а также повышение уровня иммуноглобулинов.

При морфологических исследованиях печени характерна активация и пролиферация лимфоидных и ретикулогистиоцитарных клеток, усиление фиброгенеза, формирование активных септ с некрозами гепатоцитов, внутрипеченочная миграция лейкоцитов, васкулиты.

<b>Синдром цитолиза</b> (цитолитический синдром или синдром нарушения целостности гепатоцитов)	↑ АсАТ, АлАТ, ЛДГ и ее изоферментов – ЛДГ4 и ЛДГ3, фруктозо-1-фосфатаальдозазы, сорбит-дегидрогеназы, а концентрации ферритина, сывороточного железа, витамина В12 и билирубина за счет повышения прямой фракции
<b>Синдром холестаза</b> (экскреторно-билиарный синдром, холестатический синдром)	↑ ЩФ, ЛАП, ГГТФ, холестерина, Р-липопротеинов, конъюгированной фракции билирубина, желчных кислот, фосфолипидов
<b>Синдром печеночно-клеточной недостаточности</b> (синдром синтетической недостаточности)	↓ общего белка (особенно альбумина), трансферрина, холестерина, II, V, VII факторов свертывания крови, холинэстеразы, альфа-липопротеинов ↑ билирубина за счет неконъюгированной фракции
<b>Мезенхимально-воспалительный синдром</b>	↑ СОЭ, появление в крови С-реактивного белка, ревматоидного фактора, антител к субклеточным фракциям гепатоцита, антимитохондриальных и антиядерных антител, изменение количества и функциональной активности Т- и В-лимфоцитов, повышение уровня иммуноглобулинов.

### Энзимодиагностика заболеваний печени

Печень продуцирует большое число ферментов, поступающих непосредственно в кровь. При поражениях печени количество одних ферментов в сыворотке крови понижается, а других – повышается.

Ферменты, которые обнаруживаются в норме в плазме или сыворотке крови, условно можно разделить на 3 группы.

Секреторные ферменты, синтезируясь в печени, в норме выделяются в плазму крови, где играют определенную физиологическую роль, например ферменты,

участвующие в процессе свертывания крови (протромбиназа), холинэстераза. При поражении печени их синтез снижается, и активность этих ферментов падает.

Индикаторные ферменты попадают в кровь из тканей, где они выполняют определенные внутриклеточные функции. Одни из них находятся в цитозоле клеток (ЛДГ, АлАТ, АсАТ), другие – в митохондриях (ГДГ, АсАТ) и т.д.

При поражении печени ферменты из клеток вымываются в кровь, и активность их возрастает. Наибольшее диагностическое значение имеет определение активности АлАТ и АсАТ. Активность трансаминаз в сыворотке крови: АсАТ – 5-40 Е/л, АлАТ – 5-43 Е/л. При остром паренхиматозном гепатите АлАТ увеличивается в 20-30, а иногда в 100 раз и более. Несколько меньше повышается активность АсАТ.

### ***Определение активности АЛАТ и АСАТ по Райтману-Френкелю***

#### ***Принцип метода***

Под действием фермента аланинаминотрансферазы (АЛТ) в результате переаминирования происходит перенос аминогруппы с аланина на  $\alpha$ -кетоглутарат. Пируват с 2,4-динитрофенилгидразином в щелочной среде образует окрашенный гидразон, интенсивность окраски которого прямо пропорциональна активности АЛТ и измеряется фотометрически при длине волны 505(500-560) нм.

АЛТ

Аланин +  $\alpha$ -кетоглутарат  $\longrightarrow$  пируват + L-глутамат

Аспаратаминотрансфераза в присутствии  $\alpha$ -кетоглутарата катализирует реакцию переаминирования L-аспартата с образованием оксалоацетата, который декарбоксилируется до пирувата.

АСТ

самопроизвольное декарбоксилирование

$\alpha$ -кетоглутарат + L-аспартат  $\longrightarrow$  L-глутамат + оксалоацетат  $\longrightarrow$  пируват.

Пируват с 2,4-динитрофенилгидразином в щелочной среде образует динитрофенилгидразон, интенсивность окраски которого прямо пропорциональна активности АСТ и измеряется фотометрически при длине волны 505(500-560) нм.

Линейная область определения активности АЛАТ и АСАТ находится в диапазоне от 4,0 до 70 Е/л, чувствительность – не более 3,0 Е/л. нормальные величины активности в сыворотке крови человека составляют 4,0 –12 Е/л.

Материалом для исследования служит негемолизированная сыворотка крови. Сыворотку крови следует отделить от форменных элементов крови не позднее, чем через 1 час после забора крови.

#### ***Процедура анализа***

Отмерить, мл	Опытная проба	Холостая проба	Контрольная проба на сыворотку
Реагент 1	0,25	0,25	0,25
Инкубировать при температуре +37°C в течение 5 минут, добавить			
Сыворотка крови	0,05	—	—
Дистиллированная вода	—	0,05	—
Перемешать и инкубировать при температуре +37°C точно 30 минут, добавить			

Реагент 2	0,25	0,25	0,25
Сыворотка крови	—	—	0,05
Перемешать и выдержать при комнатной температуре (+18-25°C) в течение 20 минут, добавить			
Щелочной раствор	2,5	2,5	2,5

Пробы тщательно перемешать и выдержать при комнатной температуре в течение 5 минут. Измерить оптические плотности опытной пробы ( $E_1$ ) и контрольной пробы на сыворотку ( $E_2$ ) против холостой пробы в кювете с длиной оптического пути 10 мм при длине волны 505(500-560) нм. Окраска растворов стабильна в течение 30 минут.

Для определения активности фермента использовать разность оптических плотностей ( $E$ ) опытной пробы и контрольной пробы на сыворотку:  $E = E_1 - E_2$ .

При определении АЛАТ:

Реагент 1: субстратно-буферный раствор, рН 7,4, содержащий калий фосфорнокислый однозамещенный, 100 ммоль/л; L-аланин, 200 ммоль/л; α-кетоглутарат, 2,0 ммоль/л; динатриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), 5,0 ммоль/л; азид натрия, 0,095%.

Реагент 2: раствор, содержащий 2,4-динитрофенилгидразин, 1,0 ммоль/л; соляную кислоту, 1,0 моль/л.

При определении АСАТ:

Реагент 1: субстратно-буферный раствор, рН 7,4, содержащий калий фосфорнокислый однозамещенный, 100 ммоль/л; L-аспартат, 200 ммоль/л; α-кетоглутарат, 2,0 ммоль/л; динатриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), 5,0 ммоль/л; азид натрия, 0,095%.

Реагент 2: раствор, содержащий 2,4-динитрофенилгидразин, 1,0 ммоль/л; соляную кислоту, 1,0 моль/л.

Расчеты:

Расчет активности аланинаминотрансферазы в сыворотке крови произвести по калибровочному графику.

**Построение калибровочного графика**

№№ пробирок	Калибратор	Дистиллированная вода	Реагент 1	Реагент 2	Активность	
	мл				Е/л	мккат/л
1	—	0,1	0,50	0,5	—	—
2	0,05	0,1	0,45	0,5	17	0,28
3	0,10	0,1	0,40	0,5	34	0,56
4	0,15	0,1	0,35	0,5	50	0,83
5	0,20	0,1	0,30	0,5	67	1,11
6	0,25	0,1	0,25	0,5	83	1,39

После добавления Реагента 2 пробы тщательно перемешать, выдержать при комнатной температуре (+18-25°C) в течение 20 минут, затем во все пробирки добавить по 5,0 мл щелочного раствора, тщательно перемешать, выдержать при комнатной температуре

в течение 5 минут. Измерить оптическую плотность растворов в пробирках №№ 2-6 против раствора в пробирке № 1 в кювете с длиной оптического пути 10 мм при длине волны 505(500-560) нм. Окраска растворов стабильна в течение 30 минут.

Построить калибровочный график, откладывая на оси ординат значения оптической плотности для каждой пробы, а на оси абсцисс – соответствующие им значения активности фермента

#### ***Определение активности АЛАТ и АСАТ энзиматическим кинетическим методом***

Аланинаминотрансфераза катализирует в присутствии  $\alpha$  - кетоглутарата переаминирование L - аланина с образованием пирувата. В присутствии лактатдегидрогеназы происходит окисление НАДН. Скорость окисления НАДН прямо пропорциональна активности аланинаминотрансферазы и измеряется фотометрически при длине волны 340 нм.

Аспаратаминотрансфераза катализирует в присутствии  $\alpha$  - кетоглутарата переаминирование L-аспартата с образованием оксалоацетата. В присутствии малатдегидрогеназы и оксалоацетата происходит окисление НАДН. Скорость окисления НАДН прямо пропорциональна активности аспаратаминотрансферазы и измеряется фотометрически при длине волны 340 нм.

Линейная область определения активности ферментов находится в диапазоне от 20 Е/л до 260 Е/л, чувствительность – не более 15 Е/л, нормальные величины активности ферментов составляют в сыворотке крови у женщин не более 31 Е/л, у мужчин не более 41 Е/л.

Рекомендуется в каждой лаборатории уточнить диапазон значений нормальных величин для обследуемого контингента людей.

#### ***Процедура анализа:***

Приготовить рабочий раствор реагента, содержащий L-аланин (аспартат), лактатдегидрогеназу, азид натрия, НАДН,  $\alpha$  – кетоглутарат (и малатдегидрогеназу в при определении активности АСАТ) из реагентов биохимического набора.

Перед проведением анализа рабочий реагент следует нагреть до температуры  $+37 \pm 0,5^\circ \text{C}$  в течение 5 мин.

В этой методике производится определение оптической плотности только в опытной пробе.

Отмерить, мкл	Опытная проба
Сыворотка крови	100
Рабочий реагент	1000

Соотношение сыворотки крови к рабочему реагенту составляет 1:10.

Пробу перемешать и инкубировать в кювете с длиной оптического пути 10 мм при температуре  $+37^\circ \text{C}$  в течение 1 мин. Измерить оптическую плотность пробы ( E1 ) при температуре  $+37^\circ \text{C}$  при длине волны 340 нм против воздуха, включить секундомер и через 1 минуту ( точно ) аналогично измерить оптическую плотность пробы ( E2 ).

Рассчитать изменение оптической плотности пробы в минуту:

$$\Delta E/\text{мин} = E1 - E2.$$

#### ***Расчеты:***

Активность аланинаминотрансферазы в сыворотке крови определить по формуле:

$$A = \Delta E/\text{мин} \times 1745,$$

где: A — активность фермента, Е/л;

$\Delta E/\text{мин}$  — изменение оптической плотности пробы за одну минуту,

1745 — фактор пересчета для выражения активности фермента в Е/л.

1 Е/л = 16,67 нмоль/л/(с х л).

Экскреторные ферменты синтезируются главным образом в печени (щелочная фосфатаза). В физиологических условиях эти ферменты в основном выделяются с желчью. При многих патологических процессах выделение экскреторных ферментов с желчью нарушается, а активность их в плазме крови повышается.

### **Щелочная фосфатаза.**

Увеличение активности щелочной фосфатазы (ЩФ) при заболеваниях печени является результатом увеличенного синтеза фермента клетками, расположенными в желчных канальцах, обычно в ответ на холестаза, который может быть интра- и внепеченочным. Холестаз, даже непродолжительный, приводит к увеличенной активности фермента, по крайней мере, вдвое превышающий нормальный уровень. Высокая активность ЩФ может также наблюдаться при инфильтративных заболеваниях печени (например, опухолях). Это также характерно для цирроза.

Печень не является единственным источником активности ЩФ. Умеренные количества ЩФ представлены в костях, тонком кишечнике, плаценте, почках.

### ***Определение активности щелочной фосфатазы энзиматическим кинетическим методом***

#### Принцип метода

Щелочная фосфатаза катализирует реакцию гидролиза п-нитрофенилфосфата с образованием эквимольного количества п-нитрофенола и фосфата. Скорость образования п-нитрофенола прямо пропорциональна активности щелочной фосфатазы и измеряется фотометрически при длине волны 405 нм. Существуют различные модификации данного метода, однако принципиальное их различие состоит в использовании разных буферных растворов.

Линейная область определения активности щелочной фосфатазы находится в диапазоне от 40 Е/л до 700 Е/л. Чувствительность метода – не более 30 Е/л.

Нормальные величины активности щелочной фосфатазы в сыворотке или плазме крови человека составляют: для женщин – 64 - 306 Е/л; для мужчин – 80 - 306 Е/л.

Рекомендуется в каждой лаборатории уточнить диапазон значений нормальных величин для обследуемого контингента людей.

Материалом для исследования служит негемолизированная сыворотка или плазма крови. Сыворотку или плазму крови следует отделить от форменных элементов крови не позднее, чем через 1 час после забора крови.

#### Процедура анализа

Перед проведением анализа рабочий реагент, содержащий нитрофенилфосфат, следует нагреть до температуры  $37 \pm 0,5^\circ \text{C}$  в течение 5 мин.

Отмерить, мкл	Опытная проба
Сыворотка или плазма крови	20
Рабочий реагент	1000

Соотношение сыворотки или плазмы крови к рабочему реагенту составляет 1:50.

Пробу перемешать и инкубировать в кювете с длиной оптического пути 10 мм при температуре + 37<sup>0</sup> С в течение 1 мин. Измерить оптическую плотность пробы (E1) при температуре + 37<sup>0</sup> С при длине волны 405 нм против воздуха, включить секундомер и через 1 минуту (точно) аналогично измерить оптическую плотность пробы ( E2). Рассчитать изменение оптической плотности пробы в минуту:  $\Delta E/\text{мин} = E1 - E2$ .

Расчеты:

Активность щелочной фосфатазы в сыворотке и плазме крови определить по формуле:

$$A = \Delta E/\text{мин} \times 2757 ,$$

где: А — активность щелочной фосфатазы, Е/л;

$\Delta E/\text{мин}$  — изменение оптической плотности пробы за одну минуту;

2757 — фактор пересчета для выражения активности щелочной фосфатазы в Е/л (указывается в паспорте на набор).

**Лактатдегидрогеназа.**

Уровень ЛДГ часто возрастает при гепатоцеллюлярной дисфункции, хотя на практике определение активности этого фермента редко используют в диагностике заболеваний печени из-за низкой специфичности показателя (фермент широко распространен в организме).

**$\gamma$ -глутамилтранспептидаза.**

$\gamma$ -глутамилтранспептидаза (ГГТП) – это микросомальный фермент, широко представленный в тканях, особенно таких, как печень и почечные каналцы.

Активность  $\gamma$ -глутамилтранспептидазы в плазме резко повышается (иногда более, чем в 50 раз) при холестазе и является показателем печеночной недостаточности. Увеличение активности ГГТП наблюдается также у лиц, употребляющих алкоголь, даже в отсутствии явной патологии печени. При остром поражении печени изменение активности ГГТП параллельны изменениям активности трансаминаз.

***Определение активности ГГТП энзиматическим кинетическим методом***

Принцип метода:

Гамма-глутамилтрансфераза катализирует реакцию переноса глутаминовой кислоты на акцептор - глицил-глицин, с образованием 5-амино-2-нитробензоата. Скорость образования 5-амино-2-нитробензоата, сопровождающаяся повышением оптической плотности образца, прямо пропорциональна активности гамма-глутамил-трансферазы и измеряется фотометрически при длине волны 405 нм.

Линейная область определения активности гамма-глутамилтрансферазы находится в диапазоне от 8,0 Е/л до 230 Е/л. Чувствительность метода – не более 4,0 Е/л.

Нормальные величины активности гамма-глутамилтрансферазы в сыворотке крови у женщин составляют 10-32 Е/л, у мужчин – 18-49 Е/л.

Рекомендуется в каждой лаборатории уточнить диапазон значений нормальных величин для обследуемого контингента людей.

Материалом для исследования служит негемолизованная сыворотка крови. Сыворотку крови следует отделить от форменных элементов крови не позднее, чем через 1 час после забора крови.

Процедура анализа:

Перед проведением анализа рабочий реагент, содержащий субстрат (L-γ-глутамил-3-карбокси-4-нитроанилид) и акцептор (глицил-глицин) следует нагреть до температуры +37°C в течение 5 минут.

Отмерить, мкл	Опытная проба
Сыворотка крови	100
Рабочий реагент	1000

Пробу перемешать и инкубировать в кювете с длиной оптического пути 10 мм при температуре +37°C в течение 1 минуты. Измерить оптическую плотность пробы ( $E_1$ ) при температуре +37°C при длине волны 405 нм против воздуха, включить секундомер и через 1 минуту (точно!) аналогично измерить оптическую плотность пробы ( $E_2$ ). Рассчитать изменение оптической плотности пробы в минуту:  $\Delta E/\text{мин} = E_2 - E_1$ .

Соотношение сыворотки крови к рабочему реагенту составляет 1:10.

Расчеты:

Активность гамма-глутамилтрансферазы в сыворотке крови (в Е/л) определить по формуле:

$$A = \Delta E/\text{мин} \times 1158,$$

где: А — активность гамма-глутамилтрансферазы, Е/л;

$\Delta E/\text{мин}$  — изменение оптической плотности пробы за одну минуту;

1158 — фактор пересчета для выражения активности гамма-глутамилтрансферазы в Е/л.

**Глутаматдегидрогеназа** катализирует превращение глутаминовой кислоты в альфа-кетоглутаровую и аммиак; фермент сосредоточен в митохондриях клеток, преимущественно в гепатоцитах. Он также обнаружен в незначительном количестве в нервной ткани, скелетных мышцах, миокарде и молочной железе.

Глутаматдегидрогеназа - один из органоспецифических ферментов, определяется в сыворотке крови при заболеваниях печени.

Поскольку фермент является митохондриальным, то степень повышения его активности отражает глубину цитолиза при заболеваниях печени, по её уровню можно судить о тяжести патологического процесса.

**Сорбитолдегидрогеназа** — органоспецифический фермент печени, катализирующий обратимое превращение сорбитола во фруктозу с участием НАД в качестве кофермента. Фермент локализован в цитоплазме гепатоцитов. Сывороточная активность энзима повышается при вирусных гепатитах. Как правило повышение активности СДГ наблюдается в дожелтушный период вирусного гепатита, предшествует увеличению активности других (ферментов, отражающих поражение печени. Однако высокие цифры активности СДГ выявляются в разгар болезни, иными словами, тест уступает по чувствительности другим органоспецифическим ферментам и определению

активности аминотрансфераз. Кроме того, активность СДГ нормализуется быстрее, чем активность аминотрансфераз, что также является недостатком теста. Другие заболевания печени (токсические гепатиты, циррозы, гипоксические поражения печени) сопровождаются незначительным увеличением активности энзима.

### **ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ**

1. Функции печени.
2. Лабораторные методы диагностики заболеваний печени.
3. Клинические и биохимические синдромы при заболеваниях печени.
4. Энзимодиагностика заболеваний печени.
5. Значение аланин- и аспартат-аминотрансфераз, лактатдегидрогеназы,  $\gamma$ -глутамилтранспептидазы, щелочной фосфатазы, глутаматдегидрогеназы, сорбитолдегидрогеназы.
6. Гипер- и гипо-ферментемия.
7. Определение активности аминотрансфераз по Райтману-Френкелю.
8. Определение активности аминотрансфераз энзиматическим кинетическим методом.
9. Определение активности  $\gamma$ -глутамилтранспептидазы;
10. Определение активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови.

### **САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ**

1. Записать протокол практического занятия с указанием цели и задач, перечислить основные функции печени.
2. Записать виды клинических и биохимических синдромов при заболеваниях печени. Дать характеристику каждому из синдромов с описанием основных биохимических показателей.
3. Записать основные ферменты, используемые для лабораторной диагностики заболеваний печени.

### **ЗАДАЧИ**

1. Активность щелочной фосфатазы в сыворотке крови пациента не определяется. Результат исследования контрольных образцов отличается от аттестованных значений. Ваши действия?
2. После устранения причины ошибки были измерены следующие показатели:  $E_1 = 226,68$ ,  $E_2 = 226,77$ . Вычислите активность щелочной фосфатазы в образце. Какие рекомендации вы дадите пациенту?

## **Тема занятия 8: Лабораторная диагностика желтух.**

**Цель занятия:** ознакомиться с основными типами желтух, механизмом образования билирубина и его фракций, изучить дифференциальную диагностику заболеваний печени.

### **Перечень знаний и практических навыков:**

- знать основные типы желтух;
- уметь осуществлять дифференциальную диагностику заболеваний печени;
- охарактеризовать основные фракции билирубина;
- усвоить механизм образования основных фракций билирубина;
- уметь определять тип желтухи, основываясь на лабораторных данных;
- уметь определять характер заболевания печени на основании лабораторных данных;
- освоить основные методики определения билирубина в сыворотке крови.

Желтуха представляет собой желтое неестественное окрашивание кожи или склер. Это связано с присутствием в плазме билирубина в концентрациях, превышающих 40 мкмоль/л. В норме концентрация билирубина в плазме менее 22 мкмоль/л.

Имеются 3 основные причины повышения уровня билирубина в крови:

- Скорость синтеза билирубина повышена и превышает выделительную способность печени (гемолитическая, надпеченочная желтуха).
- Угнетение конъюгационных и/или выделительных механизмов в печени – снижается способность печени метаболизировать синтезируемый в нормальных количествах билирубин (печеночная, гепатоцеллюлярная желтуха).
- Обструкция билиарной системы, препятствующая оттоку желчи (холестатическая, подпеченочная, механическая, обструкционная желтуха).

### **Типы желтух**

#### **Надпеченочная (гемолитическая) желтуха.**

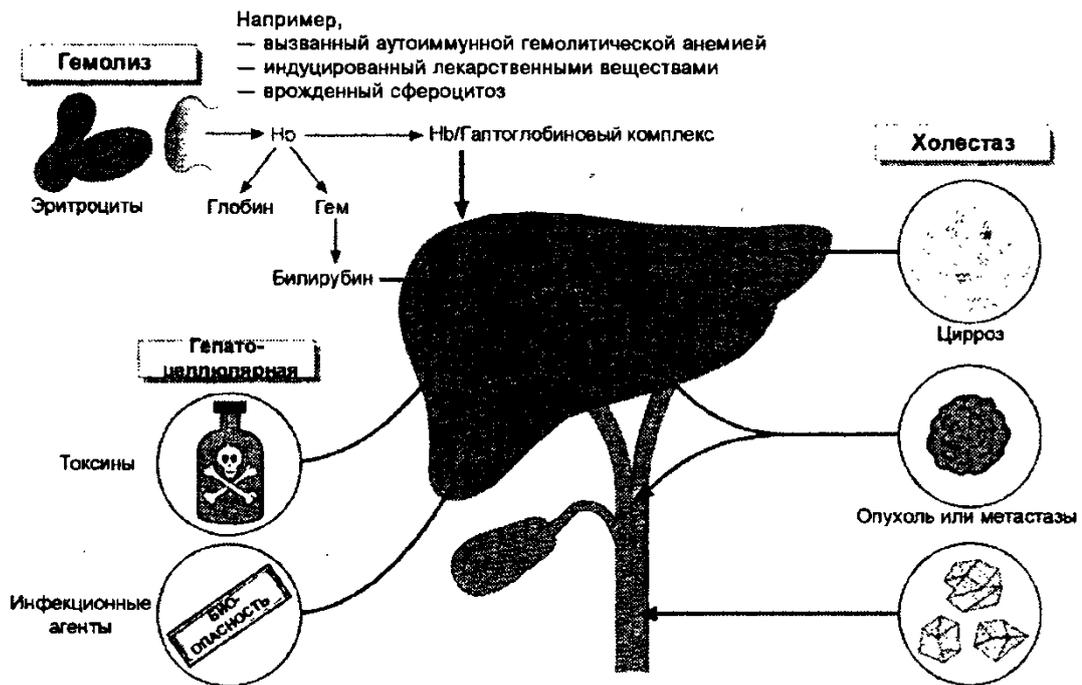
Чаще всего надпеченочная желтуха вызывается повышенным разрушением эритроцитов – как зрелых клеток, так и их предшественников. Разрушение зрелых клеток может быть результатом гемолиза или следствием утилизации крови после внутренних кровотечений, например, в поврежденных мягких тканях. Неэффективный эритропоэз имеет место при пернициозной анемии (нарушение созревания эритроцитов) или талассемии (аномальная структура гемоглобина). Гипербилирубинемия при надпеченочной желтухе является следствием накопления неконъюгированного билирубина, который не выводится почками. При этом возрастает поступление билирубина из печени в кишечник. Продуцируется большое количество уробилиногена, уровень которого в моче повышается.

### Типы желтух

Тип	Механизм	Причина
Надпеченочная	Неэффективный эритропоэз	Пернициозная анемия Талассемия
	Усиленный распад эритроцитов	Гемолиз Внутренние кровотечения
Гепатоцеллюлярная	Незрелость ферментов конъюгации	Желтуха новорожденных
	Наследственные нарушения транспорта билирубина	Заболевания Гильберта Синдром Клиглера-Найяра Синдром Ротора Синдром Дубина-Джонсона
	Генерализованная дисфункция гепатоцитов	Гепатит Портальный цирроз
	Индукцированная лекарственными препаратами	Парацетамол Изониазид
Холестатическая	Внутрипеченочная	Гепатит Цирроз желчных путей Фенотиазины Злокачественные заболевания печени
	Внепеченочная	Желчные камни Опухоли желчевыводящего протока Сдавление желчевыводящего протока Карцинома головки поджелудочной железы

#### Гепатоцеллюлярная желтуха.

Врожденные нарушения транспорта билирубина приводят к желтухе из-за несовершенного поглощения, сниженной конъюгации или ослабленного выведения билирубина. Генерализованная гепатоцеллюлярная дисфункция может иметь место при гепатитах и декомпенсированных печеночных циррозах. Патогенез желтухи в этих случаях сложен, свой вклад вносят нарушения захвата, внутриклеточного транспорта, сниженная конъюгация билирубина. Лекарственные вещества могут вызывать гепатоцеллюлярные повреждения в связи со своей дозозависимой гепатотоксичностью (например, парацетамол) или идиосинкратической чувствительностью (например, изониазид). Если гипербилирубинемия вызвана нарушением конъюгации, билирубин не конъюгируется и отсутствует усиление потока билирубина через печень. Следствием этого является то, что отсутствует билирубурия и уровень уробилиногена в моче не повышен. При наличии генерализованной дисфункции захват билирубина печенью снижается и, следовательно, большее его количество экскретируется почками. Билирубин в сыворотке может быть конъюгированным и неконъюгированным, так как могут быть дефектными УДФ-глюкоронилтрансфераза и внутриклеточный транспорт билирубина. Если скорость конъюгации превышает экскреторную способность, в крови повышается уровень конъюгированного билирубина и он может экскретироваться с мочой. Такое иногда случается при выздоровлении после вирусного гепатита.



### Холестатическая желтуха.

Холестатическая желтуха может быть результатом препятствия оттоку желчи из гепатоцитов в двенадцетиперстную кишку. Она может вызываться поражениями в самой печени (внутрипеченочный холестаз) или в желчных каналах и головке поджелудочной железы (внепеченочный холестаз).

Внутри- и внепеченочный холестаз могут быть отифференцированы ультразвуковым исследованием или биопсией печени, но не оценочными пробами функции печени.

Внутрипеченочный холестаз часто является результатом генерализованной гепатоцеллюлярной дисфункции, развивающейся, например, при гепатите или декомпенсированном циррозе печени. Это состояние также является симптомом первичного билиарного цирроза. Блокировать ветви желчного дерева могут злокачественные опухоли. Некоторые лекарственные препараты, такие как анаболические стероиды, фенотиазины и сульфаниламочевина, могут пприводить к внутрипеченочному холестазу.

Внепеченочная обструкция часто является результатом опухолей главных желчевыводящих путей, опухоли головки поджелудочной железы и увеличения лимфоузлов в воротах печени. К обструкции желчных протоков также могут приводить желчные камни или склерозирующий холангит.

Желтуха вызывается нарушением выведения и накоплением конъюгированного билирубина, фильтрующегося в клубочках и появляющегося в моче. Вместе с тем, билирубин в моче может и не определяться, возможно потому, что изменения процессов конъюгации приводят к образованию менее водорастворимого билирубина, связанного с альбумином. При полной обструкции билирубин не поступает в кишечник, уробилиноген не образуется и не определяется в моче, а каловые массы могут иметь окраску.

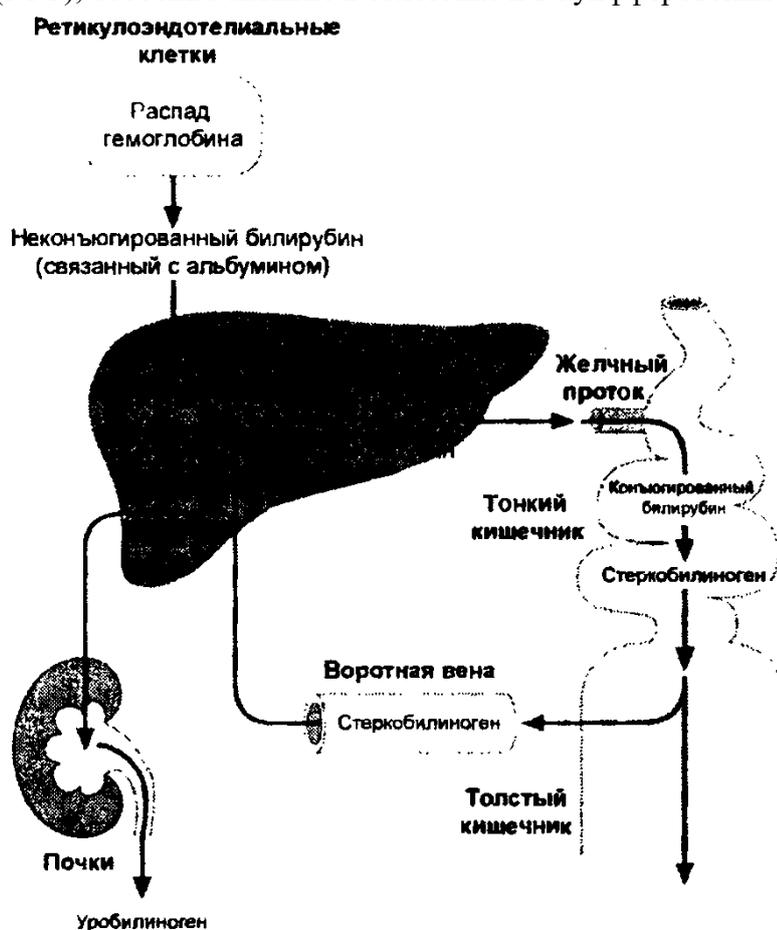
### Дифференциальная диагностика желтух

Признаки	Гематологическая желтуха	Гепатоцеллюлярная желтуха	Холестатическая желтуха
Тип билирубина	Неконъюгированный	Смешанный	Конъюгированный
Уровень билирубина	Обычно < 75 мкмоль/л	Билирубин ↑ Позднее	Билирубин может быть ↑↑↑
Билирубин в моче	нет	Есть	есть
Уробилиноген в моче	увеличен	Увеличен	снижен
Активность ферменты	ЛДГ↑	АсАТ+АлАТ↑↑ ЩФ↑ позднее	ЩФ обычно в 3 раза больше нормы, АсАТ, АлАТ+ЛДГ обычно умеренно↑

### Образование билирубина и его фракций в крови, печени, кишечнике, почках.

#### Токсичность билирубина.

Билирубин образуется при распаде гемоглобина в клетках ретикулоэндотелиальной системы (РЭС), особенно активно в селезенке и в купфферовских клетках печени.



### Метаболизм билирубина

У взрослого человека образуется 250–350 мг билирубина в сутки. Билирубин слабо растворим в воде, в плазме билирубин первично появляется в неконъюгированной

форме, связанный с альбумином (непрямой, свободный билирубин). Неконъюгированный билирубин не может проникнуть через почечный барьер. В печени происходит переход билирубина от альбумина на синусоидальную поверхность гепатоцитов. В клетках печени непрямой билирубин подвергается энзиматической конъюгации с глюкуроновой кислотой и превращается в билирубинмоно- и билирубиндиглюкоронид (конъюгированный, прямой, связанный билирубин). Конъюгированный билирубин водорастворим, он поступает с желчью в желчный пузырь или непосредственно в кишечник. Здесь билирубин теряет глюкуроновую кислоту и восстанавливается до группы бесцветных тетрапольных соединений, называемых уробилиногенами. Часть уробилиногенов всасывается в тонкой кишке и по системе воротной вены вновь попадает в печень, где окисляется до дипирролов. В толстой кишке билирубин желчи под влиянием нормальной кишечной флоры превращается в стеркобилиноген. В нижнем участке толстой кишки основное количество бесцветностеркобилиногена окисляется в коричневый стеркобилин, который выделяется с калом. Незначительная часть стеркобилиногена всасывается в кровь и через геморроидальные вены и нижнюю полую вену попадает в почки и затем в мочу. Нормальная моча содержит минимальное количество конъюгированного билирубина (7–20 мкг/л), не выявляемое качественными методами.

**Жёлчные пигменты** – продукты распада гемоглобина и других производных порфирина, экскретируемые с желчью, мочой, калом.

Основная их масса образуется в процессе катаболизма гемоглобина при распаде эритроцитов в клетках системы мононуклеарных фагоцитов. Желчные пигменты представляют собой соединения, содержащие 4 пиррольные группы, соединенные одноуглеродными мостиками в открытую, незамкнутую цепь (в отличие от замкнутой структуры гема). В результате разрыва  $\alpha$ -метинового мостика в геме гемоглобина образуется вердоглобин (холеглобин) – железосодержащее порфириновое соединение с открытой пиррольной структурой, окрашенное в зеленый цвет. После отщепления от молекулы вердоглобина белка глобина и железа образуется зеленый желчный пигмент биливердин. Альтернативный путь образования биливердина заключается в отщеплении белковой части от молекулы гемоглобина, образовании железопорфиринового пигмента гематина и окисления гематина с разрывом метинового мостика и утратой железа. В клетках системы мононуклеарных фагоцитов биливердин восстанавливается до *билирубина*, который с кровью поступает в печень. Небольшое количество билирубина образуется в клетках системы мононуклеарных фагоцитов из гема, не использованного для синтеза гемоглобина, из гема, образующегося в печени при катаболизме других гемсодержащих белков (миоглобина, цитохромов и др.), или из гемоглобина, обновляющегося в процессе созревания эритроцитов. Билирубин – основной и наиболее диагностически ценный желчный пигмент, обнаруживаемый в желчи человека. Биливердин присутствует в желчи в следовых количествах (общее содержание Ж. п. в желчи составляет 15–20% ее сухой массы). В печени билирубин формирует парные соединения, или конъюгаты, главным образом с глюкуроновой кислотой (альдегидкарбоновой/уроновой кислотой – производным глюкозы) и в меньшей степени – с серной кислотой. Связанный билирубин, секретируемый печенью, на 75% состоит из билирубинглюкуронида и на 15% – из билирубинсульфата.

#### **Желтуха новорождённых.**

#### ***Гемолитическая болезнь новорожденного***

Причины. Несовместимость крови матери и плода по группе или по резус-фактору. Накопление гидрофобной формы билирубина в подкожном жире обуславливает желтушность кожи. Однако реальную опасность представляет накопление билирубина в сером веществе нервной ткани и ядрах ствола с развитием "ядерной желтухи" (билирубиновая энцефалопатия).

Клиническая диагностика. Проявляется сонливостью, плохим сосанием, умственной отсталостью, ригидностью затылочных мышц, тоническими судорогами, тремором конечностей, изменением рефлексов с возможным развитием глухоты и параличей.

Лабораторная диагностика. В крови выявляются выраженная анемия, ретикулоцитоз, эритро- и нормобластоз. Гипербилирубинемия за счет непрямой фракции от 100 до 342 мкмоль/л, в дальнейшем присоединяется и прямая фракция. Уровень билирубина в крови быстро нарастает и к 3–5 дню жизни достигает максимума.

#### ***Физиологическая (транзиторная) желтуха новорожденных***

##### Причины:

- относительное снижение активности УДФ-глюкуронилтрансферазы в первые дни жизни, связанное с повышенным распадом фетального гемоглобина,
- абсолютное снижение активности УДФ-глюкуронилтрансферазы в первые дни жизни,
- дефицит лигандинна,
- слабая активность желчевыводящих путей.

##### Клиническая диагностика.

- окрашивание кожи на 3–4 день после рождения,
- гемолиза и анемии нет.

Симптомы исчезают спустя 1–2 недели после рождения.

Лабораторная диагностика. Увеличение концентрации свободного билирубина в сыворотке до 140–240 мкмоль/л.

#### ***Желтуха недоношенных***

##### Причины:

- относительное снижение активности УДФ-глюкуронилтрансферазы в первые дни жизни, связанное с повышенным распадом фетального гемоглобина,
- абсолютное снижение активности УДФ-глюкуронилтрансферазы в первые дни жизни,
- дефицит лигандинна,
- слабая активность желчевыводящих путей.

##### Клиническая диагностика.

- окрашивание кожи,
- гемолиза и анемии нет.

Исчезает спустя 3–4 недели после рождения.

Лабораторная диагностика. Увеличение концентрации свободного билирубина в сыворотке до максимума на 5–6 дни после рождения, более выражено по сравнению с физиологической желтухой.

#### ***Негемолитическая гипербилирубинемия новорожденных***, вызываемая молоком матери.

Встречается у 1% вскармливаемых грудью новорожденных.

Причины. Подавление активности УДФ-глюкуронилтрансферазы, предположительно, эстрогенами материнского молока.

Клиническая диагностика. Проявляется желтухой, иногда с явлениями поражения ЦНС.

Лабораторная диагностика. Увеличение концентрации свободного билирубина в сыворотке.

### **Лабораторная дифференциальная диагностика заболеваний печени**

#### **Заболевания печени.**

У 5% практически здоровых людей может наблюдаться незначительное повышение показателей печеночных ферментов, без каких либо признаков поражения печени. Практическим подходом к обследованию пациентов с изолированным повышением аминотрансфераз является повторение теста и дальнейшее обследование только при 2х кратном превышении нормы или выявлении факторов риска заболевания печени. Данные ферменты присутствуют не только в печени, но и АсАТ в сердечной мышце, скелетных мышцах, почках, головном мозге, поджелудочной железе, легких лейкоцитах и эритроцитах; АлАТ в скелетных и сердечной мышце (хотя в гораздо меньших чем АсАТ количествах); ЛДГ практически во всех клетках и биологических жидкостях, для печени более характерны изоферменты ЛДГ5 и ЛДГ4.

Уровень аминотрансфераз не коррелирует с исходом поражения печени, так острый гепатит В с повышением уровня ферментов в более чем 20 раз часто заканчивается полным выздоровлением, тогда как алкогольный гепатит с гораздо более низким их подъемом может закончиться печеночной недостаточностью. Снижение АлАТ, АсАТ чаще всего является признаком выздоровления, однако быстрое их падение в ряде случаев может быть признаком произошедшей массивной гибели печеночных клеток.

Незначительное (менее чем в 3 раза) повышение уровня аминотрансфераз наблюдается в случае жирового гепатоза, неалкогольного стеатогепатита и хронического вирусного гепатита, их подъем в 3–20 раз характерен для острого вирусного гепатита, аутоиммунного и алкогольного гепатитов (иногда для хронического вирусного гепатита) и, наконец, увеличение более чем в 20 раз наиболее вероятно для острого вирусного гепатита, лекарственного (или токсического) поражения печени и ишемического гепатита.

Для алкогольной болезни печени характерно повышение АсАТ при практически нормальной (или слегка повышенной) концентрации АлАТ. Соотношение АсАТ/АлАТ у 70% таких пациентов больше 2.

Изолированное повышение аминотрансфераз характерно для неалкогольной жировой болезни печени (при условии отрицательного уровня печеночных маркеров и отсутствия анамнеза злоупотребления алкоголем). Повышение этого показателя может наблюдаться и при целиакии, туберкулезе, саркоидозе и амилоидозе с поражением печени и при метастазах в печень.

#### **Холестаз**

Холестаз оценивается по следующим показателям: ГГТП, щелочная фосфатаза, билирубин и уровень желчных кислот сыворотки. ГГТП может повышаться не только при заболеваниях печени, но и инфаркте миокарда, заболеваниях почек и диабете. Однако этот фермент более специфичен для оценки поражения печени, чем ЩФ, которая в больших количествах содержится в костной ткани, что делает оценку природы ее повышения затруднительным, особенно у детей. Разумно использовать совместное определение двух этих показателей для подтверждения печеночной причины их повышения. Срок полураспада щелочной фосфатазы около недели, следовательно не следует ждать ее падения сразу после ликвидации билиарной обструкции.

Уровень билирубина отражает баланс между его выработкой, в результате разрушения гемоглобина и элиминацией его печенью. В норме 70% билирубина

сыворотки представлено неконъюгированной его формой. Незначительная неконъюгированная билирубинемия может наблюдаться при синдроме Жильбера (врожденном нарушении конъюгации билирубина). Голодание приводит к повышению неконъюгированного билирубина при этом синдроме. Другими причинами повышения неконъюгированного билирубина (патологическим считается его повышение  $> 85\%$  общего билирубина) являются: гемолиз, желтуха новорожденных, желтуха у недоношенных, синдром Криглера-Найяра, лекарственное воздействие. Неконъюгированная билирубинемия может наблюдаться при молниеносной форме болезни Вильсона, в сочетании низкими цифрами щелочной фосфатазы (как следствие гемолиза из-за массивного выброса меди в кровь). Конъюгированная форма повышается при гепатоцеллюлярных заболеваниях (цирроз, гепатит, токсическое воздействие лекарств), внутрипеченочном холестазае, сепсисе, синдромах Дабина-Джонсона и Ротора и обструктивной желтухе. Желтушная окраска склер становится заменой при концентрации билирубина в  $30 \mu\text{mol/l}$ . Т.к. конъюгированный билирубин выводится почками, то его концентрация редко превышает  $510 \mu\text{mol/l}$  (при отсутствии почечной недостаточности).

**Желчные кислоты (ЖК).** Первичные ЖК образуются исключительно в печени с ежедневным уровнем синтеза  $250\text{--}500 \text{ мг}$  (примерно столько же теряется с калом), вторичные ЖК возникают в результате действия бактерий кишечника на первичные ЖК. Повышение уровня ЖК характерно для гепатобилиарного заболевания и отражает как поражение печени так и нарушение ее экскреторной функции. Их уровень имеет определенное дифференциально-диагностическое значение, так при синдроме Жильбера уровень ЖК нормальный.

#### **Оценка синтетической функции печени**

**Альбумин.** Альбумин полностью синтезируется в печени в количестве примерно  $150 \text{ мг/кг/день}$ . Время полураспада альбумина 20 дней. Следовательно, при острой печеночной недостаточности это не очень удобный показатель. Кроме того, причиной снижения альбумина также может быть переход его в  $3\text{e}$  пространство (например при сепсисе), недостаток питания, потери через почки (нефрит) и кишечник (энтеропатия с потерей белка). Если мы видим снижение альбумина при заболеваниях печени мы можем утверждать о достаточно длительном течении печеночной недостаточности у данного пациента.

**Протромбиновое время (РТ).** Этот показатель наиболее точно и главное быстро отражает синтетическую функцию печени т.к. все факторы свертывания (кроме VIII) синтезируются в печени, а время полураспада фактора VII составляет всего  $3\text{--}5$  часов. Ряд факторов свертывания (II, VII, IX, X) нуждаются в витамине К как кофакторе. Учитывая возможную недостаточность этого витамина (например при холестазае) необходимо назначить его в дозе  $10 \text{ мг/день}$  на 3 дня для оценки связанно ли снижение РТ с его недостатком или с нарушением синтетической функции печени. Если через сутки после введения РТ улучшается, по крайней мере, на  $30\%$  говорят о сохраненной синтетической функции печени. РТ является ценным прогностическим фактором при оценке печеночной недостаточности и помогает определить время когда пациент должен быть направлен для пересадки печени.

**Мочевина и аммиак.** Эти показатели не играют основной роли в лабораторной диагностике патологии печени, однако их правильная интерпретация может помочь в установлении диагноза и предсказать возможность появления таких осложнений как печеночная недостаточность. Позволим себе напомнить, что мочевина синтезируется печенью из  $\text{NH}_3$ , который, в свою очередь, в основном является продуктом жизнедеятельности толстокишечных бактерий. Концентрация аммиака плазмы может повышаться в следующих случаях:

1. Увеличение его продукции (гастроинтестинальное кровотечение, большое количество белка в диете).
2. Порто-системное шунтирование.
3. Печеночная недостаточность.
4. Врожденные (генетические) дефекты.

#### Изменение лабораторных показателей при различных видах заболевания печени

Тест	Заболевания печени		
	Заболевания печени связанные с некрозом гепатоцитов (вирусные гепатиты, лекарственные гепатиты, аутоиммунный гепатит, болезнь Вильсона, гемохроматоз, дефицит $\alpha_1$ -антитрипсина)	Холестатическое заболевание (первичный билиарный цирроз)	Инфильтративный процесс (рак печени)
<i>Аминотрансферазы</i>	Умеренное или значительное повышение	Норма или слабое повышение	Норма или слабое повышение
<i>Щелочная фосфатаза</i>	Норма или слабое повышение	Умеренное или значительное повышение	Умеренное или значительное повышение
<i>Билирубин общий</i>	От нормы до значительного повышения	От нормы до значительного повышения	От нормы до слабого повышения
<i>Протромбиновое время</i>	Увеличено, не зависит от витамина К	Увеличено, зависит от витамина К	Норма
<i>Альбумин</i>	Снижен при хроническом заболевании	Норма	Норма
<i>Желчные кислоты</i>	От незначительного до значительного повышения	От незначительного до значительного повышения	Норма

#### Референтные значения печеночных проб

Тест	Норма
<b><u>Белковые фракции</u></b>	
Общий белок	65—85 г/л
Альбумины	40—50 г/л
Глобулины	20—30 г/л
<b><u>Показатели пигментного обмена</u></b>	
Общий билирубин	11,12 (8,6-20,5) мкмоль/л
Прямой билирубин	2,57 мкмоль/л
Непрямой билирубин	8,6 мкмоль/л
<b><u>Ферменты</u></b>	
АлАТ	0,1—0,68 ммоль/(ч·л)
АсАТ	0,1—0,45 ммоль/(ч·л)
Щелочная фосфатаза	1,0—3,0 ммоль/(ч·л)
<b><u>Липиды и липопротеины</u></b>	
Общие липиды	4,6—10,4 ммоль/л

<b>Триглицериды</b>	0,565—1,695 % ммоль/л
<b>Общий холестерин</b>	3,11—6,48 ммоль/л
<b><u>Показатели азотистого обмена</u></b>	
<b>Мочевина</b>	3,3—6,6 ммоль/л
<b>Креатинин</b>	Муж - 0,088—0,177 ммоль/л Жен - 0,044—0,141 ммоль/л
<b>Мочевая кислота</b>	0,12—0,38 ммоль/л

#### Дополнительные тесты:

Тест	Норма
<b>Общая лактатдегидрогеназа (ЛДГ)</b>	0,8—4,0 ммоль/(ч·л)
<b>Гамма-глутамилтранспептидаза (ГГТП)</b>	0,6—3,96 ммоль/(ч·л)
<b>Сорбитолдегидрогеназа (СДГ)</b>	0—0,02 мкмоль/(мл·ч)
<b>Глутаматдегидрогеназа (ГлДГ)</b>	Муж – 0-7 Ед/л Жен – 0-5 Ед/л
<b>Холинэстераза (ХЭ)</b>	5300 — 12900 Ед/л
<b>Альфа-фетопrotein (АФП)</b>	0-10 Ед/мл

#### Фракции билирубина в крови

- Общий билирубин
- Прямой (связанный) билирубин
- Непрямой (несвязанный)

#### Фракции билирубина в моче

В норме в сыворотке крови содержится в среднем 17 мкмоль/л общего билирубина, из которого только 10–15% входит в состав прямой фракции. Непрямой билирубин не может проходить через почечные тельца, и поэтому моча здорового человека не содержит этого пигмента. Появление в моче билирубина указывает на повышение в крови прямой его фракции и, как правило, является признаком нарушения экскреции желчных пигментов в кишки.

#### Фракции билирубина в кале

При кишечных инфекциях уробилиноген (уробилин) образуется в верхних отделах кишечника (в тонкой и в начале толстой кишки) из билирубина-глюкуронида (поступившего из печени). Часть образовавшегося уробилиногена резорбируется через кишечную стенку с кровью портальной системы переносится в печень, где расщепляется полностью, в связи с чем в общий кровоток не поступает и не выделяется с мочой. При поражении печени уробилиноген поступает в общий кровоток и выделяется с мочой.

Стеркобилиноген образуется также из билирубин-глюкуронида, поступающего из печени в двенадцатиперстную кишку и попавшего в толстую кишку. Этот билирубин-глюкуронид при участии анаэробной кишечной микрофлоры восстанавливается до стеркобилиногена. Окраска кала у здорового человека определяется присутствием стеркобилиногена и продукта его окисления – стеркобилина. Определение стеркобилина в кале имеет значение в дифференциальной диагностике желтух. При гемолитической желтухе содержание в кале стеркобилина значительно повышается, а при механической желтухе и холестатической форме вирусного гепатита он не обнаруживается.

Методы определения прямого билирубина основаны на его водорастворимости. Так как реакция происходит в водной среде, для определения прямого билирубина требуется только реагент, образующий с ним окрашенный комплекс. Если необходимо определить общий билирубин, к реакционной смеси прибавляют детергент, который переводит свободный билирубин в растворимое состояние. Нормы билирубина в сыворотке составляют до 22 мкмоль/л для общего билирубина и до 4,0 мкмоль/л для прямого. Рассмотрим методы определения билирубина в сыворотке.

### ***Метод Йендрашека-Гроффа***

#### ***Принцип метода***

Билирубины, прямой (конъюгирован с глюкоронатом) и непрямой (неконъюгированный, связанный с альбумином), в присутствии кофеина и детергента, соединяются с диазотированной сульфаниловой кислотой. Кофеин высвобождает билирубин, связанный с альбумином. Образуется азосоединение, окрашенное в красный цвет, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации билирубина в пробе и измеряется фотометрически при длине волны 500-560 нм.

Метод линеен до концентрации общего билирубина в сыворотке и плазме 425 мкмоль/л

Минимально выявляемая концентрация общего билирубина в пробе, определяемая с приемлемым уровнем воспроизводимости составляет 1,5 мкмоль/л.

Материалом для исследования служит сыворотка пациента без признаков гемолиза или липемии.

#### ***Процедура анализа***

Для определения общего и прямого билирубина готовят четыре пробирки:

- 1) Общий билирубин (сюда мы добавим детергент)
- 2) Прямой билирубин (без детергента, в водной среде будет реагировать только водорастворимый прямой билирубин)
- 3) Калибровочная проба
- 4) Контрольная проба

Перед процедурой анализа необходимо приготовить диазореактив. Для этого смешивают сульфаниловую кислоту и нитрит натрия в соотношении 40:1. Данный реагент стабилен в течение 7 суток.

Добавить реагенты в пробирки по схеме:

	Общий билирубин	Прямой билирубин	Калибровочная проба	Контрольная проба
Кофеиновый реагент	1,4	–	1,4	–
Сыворотка	0,2	0,2	0,2	–
Диазореактив	0,2	0,2	0,2	–
Физ. раствор	0,2	1,6	0,2	1,8
Калибратор	–	–	0,2	–

Количество добавляемых реагентов может меняться в зависимости от используемого диагностического набора. Цифры приведены для примера.

Для определения прямого билирубина ровно через 5 минут инкубации при комнатной температуре измеряют оптическую плотность пробы против контроля при длине волны 546 нм.

Для определения общего билирубина пробы инкубируют в течение 20 минут, затем измеряют оптическую плотность опытной пробы против контрольной, а также оптическую плотность калибровочной пробы против дистиллированной воды.

Расчет концентрации билирубина производим по формуле:

$$C = \frac{A_{оп.}}{A_{кал.}} \times C_{кал.},$$

где:  $C$  — концентрация билирубина в анализируемой пробе, мкмоль/л;

$A_{оп.}$  — оптическая плотность анализируемой пробы;

$A_{кал.}$  — оптическая плотность калибратора;

$C_{кал.}$  — содержание билирубина в калибраторе, мкмоль/л.

### **Метод Уолтерс-Джерарда**

#### Принцип метода

Прямой (связанный, конъюгированный с глюкуроновой кислотой) билирубин непосредственно реагирует с диазотированной сульфаниловой кислотой, а общий билирубин определяется в присутствии диметилсульфоксида (ДМСО) с образованием окрашенного азосоединения. Интенсивность окраски реакционной среды пропорциональна концентрации билирубина и измеряется фотометрически при длине волны 550 (540-560) нм.

Для исследования используется сыворотка, гепаринизированная или ЭДТА-плазма крови без следов гемолиза и липемии.

Процедура анализа не отличается от таковой в методе Йендрашека-Гроффа.

Имеется реагент для определения общего билирубина (в своем составе содержит ДМСО), а также реагент для определения прямого билирубина (без ДМСО). Сыворотка и реагенты смешиваются в соотношении 1:10.

### **Метод определения общего билирубина с 3,5 – дихлорфенилдиазониевой солью (DPD)**

#### Принцип метода

Общий билирубин в присутствии детергента и акселератора реакции взаимодействует с диазокомплексом 3,5-дихлорфенил-диазоний-тетрафлюороборатом (DPD) в кислой среде с образованием азобилирубина. Интенсивность окраски реакционной среды пропорциональна концентрации билирубина и измеряется фотометрически при длине волны 510 (500-530) нм.

Материалом для исследования служит сыворотка пациента без признаков гемолиза и липемии.

Линейность метода – до 513 мкмоль/л.

#### Процедура анализа

Исследование проводят непосредственно в термостатируемой кювете при  $t +37^{\circ}\text{C}$  с длиной оптического пути 1 см при длине волны 510 нм.

Готовят и маркируют три пробирки:

- 1) Опытная проба

- 2) Калибровочная проба
- 3) Дистиллированная вода

В опытную и калибровочную пробирки вносят по 1 мл раствора детергента, а также по 20 мкл сыворотки пациента и калибровочного раствора соответственно. В третью пробирку вносят 1 мл дистиллированной воды.

Пробирки инкубируют 5 минут при 37°C и измеряют оптическую плотность  $A_1$  против дистиллированной воды. Далее в пробирки 1 и 2 вносят по 200 мкл DPD-реагента, инкубируют еще 5 минут при 37°C и измеряют оптическую плотность  $A_2$  против дистиллированной воды.

Расчет:

$$C = \frac{\Delta A_{оп.}}{\Delta A_{кал.}} \times C_{кал.},$$

где:  $C$  — концентрация билирубина в анализируемой пробе, мкмоль/л;  
 $A_{оп.}$  — разность оптических плотностей опытной пробы;  
 $A_{кал.}$  — разность оптических плотностей калибровочной пробы;  
 $C_{кал.}$  — содержание билирубина в калибраторе, мкмоль/л.

Если концентрация билирубина в пробе превышает 513 мкмоль/л, пробу разбавить физиологическим раствором в 2 раза, анализ повторить и полученный результат умножить на 2.

### ***Метод с дихлоранилином***

#### Принцип метода.

Альбумин-билирубиновый комплекс разрушается детергентом. Затем освободившийся билирубин (прямой и неконъюгированный) в присутствии диазотированного дихлоранилина вступает в реакцию азосочетания и образует окрашенный в красный цвет комплекс азокрасителя в кислом растворе, интенсивность окраски которого прямо пропорциональна содержанию билирубина в пробе и измеряется фотометрически при длине волны 546(500-560) нм.

Линейность определения концентрации билирубина находится в диапазоне от 4,0 до 510 мкмоль/л, отклонение от “линейности” не превышает 7%. Чувствительность определения — не более 3,0 мкмоль/л.

Материалом для исследования служит негемолизированная сыворотка крови. Сыворотку крови следует отделить от форменных элементов крови не позднее, чем через 1 час после забора крови.

#### Процедура анализа

Компоненты реакционной смеси отбирать в количествах, указанных в таблице. Для приготовления рабочего реагента необходимо смешать дихлоранилиновый реагент с нитритом натрия в соотношении 1:1.

Отмерить (мл)	Опытная проба	Контрольная (холостая) проба	Калибровочная проба	Калибровочная (холостая) проба
Рабочий реагент	1,0	-	1,0	-
Дихлоранилиновый реагент	-	1,0	-	1,0

Сыворотка крови	0,1	0,1	-	-
Калибратор	-	-	0,1	0,1

Пробы перемешать и инкубировать при комнатной температуре (+18-25°C) в течение 10 мин. Измерить оптическую плотность опытной пробы против контрольной (холостой) пробы и оптическую плотность калибровочной пробы против калибровочной (холостой) пробы в кювете 10 мм при длине волны 546 нм. Окраска стабильна в течение 30 мин.

#### Расчет

$A_{оп.}$

$$C = \frac{A_{оп.}}{A_{кал.}} \times C_{кал.},$$

$A_{кал.}$

где:  $C$  — концентрация билирубина в анализируемой пробе, мкмоль/л;

$A_{оп.}$  — оптическая плотность анализируемой пробы;

$A_{кал.}$  — оптическая плотность калибратора;

$C_{кал.}$  — содержание билирубина в калибраторе, мкмоль/л.

### ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

1. Типы желтух: надпеченочные, печеночные, подпеченочные.
2. Гипербилирубинемия и билируинурия.
3. Образование билирубина и его фракций в крови, печени, кишечнике, почках.
4. Свободный (непрямой) и конъюгированный (прямой) билирубин, уробилиноген и стеркобилиноген, желчные пигменты.
5. Токсичность билирубина.
6. Желтуха новорождённых.
7. Референтные значения, дифференциальная диагностика заболеваний печени.
8. Фракции билирубина в крови, моче, кале.
9. Метод Йендрашека-Гроффа. Принцип реакции, аналитические характеристики.
10. Метод Уолтерса-Джерарда. Принцип реакции, аналитические характеристики.
11. Метод DPD. Принцип реакции, аналитические характеристики.
12. Метод с дихлоранилином. Принцип реакции, аналитические характеристики.

### ЗАДАЧА

В сыворотке пациента методом Йендрашека-Гроффа при определении концентрации билирубина были получены следующие цифры:  $A_{оп}=1030$ ,  $A_{кал}=1800$ ,  $C_{кал}=85,5$  мкмоль/л. Рассчитайте концентрацию общего билирубина сыворотки пациента. О какой патологии может идти речь? Какие исследования следует назначить пациенту для уточнения диагноза?

## **Тема занятия 9: Исследование белкового состава крови**

**Цель занятия:** Знать белковый состав плазмы крови, методы определения общего белка в биологических жидкостях, научиться интерпретировать протеинограммы при различных патологических процессах.

### **Перечень знаний и практических навыков:**

- Знать белки плазмы крови и их функцию.
- Иметь представление о синтезе белков в печени, РЭС, клетках иммунной системы.
- Охарактеризовать методы определения содержания общего белка в крови и моче.
- Изучить белковые фракции плазмы крови и их характеристики.
- Знать белки острой фазы воспаления, функции, критерии диагностики.
- Изучить протеинограмму в норме, а также при различных патологических состояниях (при остром и хроническом воспалении, нарушении функций почечного фильтра, злокачественных новообразованиях, гепатитах, циррозах печени, механической желтухе).
- Уметь интерпретировать полученные результаты протеинограмм при различных патологических состояниях организма человека.
- Овладеть навыком оценки результат лечения воспалительного процесса по данным показателей белков острой фазы.

Белки представляют собой высокомолекулярные полипептиды, состоящие из более 20 видов  $\alpha$ -аминокислот. Различают простые и сложные белки. Простые белки содержат только аминокислоты, а сложные – ещё и неаминокислотные компоненты: гемм, производные витаминов, липиды, или углеводы и др.

Поскольку при многих заболеваниях наблюдают изменения в содержании отдельных белков, исследование их концентрации в крови широко используют в диагностических целях. В биологических жидкостях определяют общий белок, фракции белков и индивидуальные белки.

Плазма крови человека в норме содержит более 100 видов белков. Примерно 90% всего белка крови составляют **альбумины, иммуноглобулины, липопротеины, фибриноген, трансферрин**; другие белки присутствуют в плазме в небольших количествах.

### **Функции белков плазмы крови:**

- поддерживают постоянство коллоидно-осмотического давления крови;
- определяют вязкость крови и сохраняют устойчивость эритроцитов и лейкоцитов в кровотоке, обеспечивают нормальный кровоток в капиллярах (реологические свойства крови);
- белковая буферная система участвует в регуляции кислотно-щелочного состояния;
- специализированные белки связывают и транспортируют углеводы, липиды, гормоны, лекарства, витамины, токсичные вещества;
- удерживают в связанном состоянии и транспортируют катионы кальция, магния, железа, меди и другие ионы, препятствуя их потере с мочой;
- специализированные белки участвуют в свертывании крови (фибриноген, протромбин, антигемофильный глобулин и др.);
- иммуноглобулины, факторы системы комплемента, трансферрин и пропердин (предупреждая инфекционный процесс и сохраняя резистентность организма) выполняют защитную функцию;

- являются резервом аминокислот.

#### **Синтез белков плазмы крови осуществляют:**

- печень – полностью синтезирует фибриноген и альбумины крови, большую часть  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобулинов;
- клетки ретикулоэндотелиальной системы (РЭС) костного мозга и лимфатических узлов – часть  $\beta$ -глобулинов и  $\gamma$ -глобулины (иммуноглобулины).

Состояние белкового обмена в организме оценивают, определяя содержание общего белка, белковых фракций и индивидуальных белков плазмы крови.

#### **Методы определения общего белка**

Среди методов определения концентрации общего белка можно выделить несколько основных групп, основанных на различных принципах:

- азотометрические;
- гравиметрические (весовые);
- «преципитационные»;
- спектрофотометрические;
- рефрактометрические;
- колориметрические;
- нефелометрические;
- поляриметрические.

#### ***Азотометрические методы***

Азотометрические методы определения общего белка сыворотки основаны на определении количества белкового азота, образующегося при разрушении аминокислот, входящих в состав белков. Впервые метод был предложен Кьельдалем в 1883 году. В методе Кьельдаля, в настоящее время представляющем в целом исторический интерес, азот, содержащийся в составе белков, окисляют до иона аммония и его количество определяют титрованием точным раствором соляной кислоты. Кроме того, ион аммония может быть определен реактивом Несслера, манометрическим методом после превращения иона аммония в молекулярный азот под действием гипобромита или с помощью оптического теста Варбурга при участии фермента глутаматдегидрогеназы. Исходя из того, что белки из биологических объектов содержат в среднем 16 % азота, полученное в результате анализа количество азота умножают на коэффициент 6,25. Для отдельных фракций белка в сыворотке или плазме величина фактора колеблется в диапазоне от 5,69 до 6,52.

Недостатком азотометрических методов является длительность и сложность процедуры, даже при том, что аммиак, образующийся в реакции, можно определять ферментативным методом. Автоматизация позволяет использовать этот метод в ряде случаев в качестве метода сравнения из-за его достаточной точности и воспроизводимости.

#### ***Гравиметрические методы***

Гравиметрические (весовые) методы определения общего белка сыворотки основаны на высушивании белков до постоянной массы и взвешивании на аналитических весах. Методы трудоемки и в настоящее время практически не используются для определения общего белка сыворотки. Гравиметрический метод продолжает использоваться в некоторых лабораториях для определения фибриногена в плазме крови.

### ***«Преципитационные» методы***

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

Результаты данной группы методов зависят от множества факторов: скорости смешивания реактивов, температуры реакционной смеси, значения рН среды, присутствия посторонних соединений, способов фотометрии. Тщательное соблюдение условий реакции способствует образованию стабильной суспензии с постоянным размером взвешенных частиц и получению воспроизводимых результатов. «Преципитационные» методы для определения белка в сыворотке крови не получили признания и нашли применение при определении белка в моче, спинномозговой жидкости и многих индивидуальных белков с использованием специфических антител.

### ***Спектрофотометрические методы***

Спектрофотометрические методы заключаются в измерении степени светопоглощения в ультрафиолетовой области при двух длинах волн с дальнейшим расчетом по специальным формулам (230 и 260 нм, 280 и 260 нм, 235 и 280 нм, 215 и 225 нм, 280 и 205 нм).

### ***Рефрактометрические методы***

Рефрактометрические методы определения общего белка сыворотки основаны на способности растворов белка к преломлению светового потока. При температуре 17,5 °С показатель преломления воды равен 1,3332, при той же температуре показатель преломления сыворотки колеблется в пределах 1,3480–1,3505. В связи с тем, что концентрация электролитов и небелковых органических соединений, влияющих на ее преломляющую способность, невелика и достаточно постоянна в сыворотке здорового человека, величина показателя преломления сыворотки крови зависит в первую очередь от содержания в ней белков. Калибровку прибора проводят сывороткой с известной концентрацией белка. Простота делает рефрактометрию удобным методом для определения содержания общего белка в сыворотке крови, хотя при ряде заболеваний, в частности, при сахарном диабете, хронической почечной недостаточности его использование может приводить к существенной ошибке.

### ***Колориметрические (фотометрические) методы***

Колориметрические методы определения общего белка основаны на цветных реакциях белков с хромоген-образующими реактивами или на неспецифическом связывании красителя.

Среди колориметрических методов определения концентрации общего белка сыворотки наиболее распространенным считается биуретовый метод, основанный на так называемой «цветной биуретовой реакции», в ходе которой белки реагируют в щелочной среде с сульфатом меди с образованием соединений, окрашенных в фиолетовый цвет, интенсивность окраски зависит от концентрации общего белка в сыворотке. Биуретовый метод определения общего белка в сыворотке крови был утвержден в качестве унифицированного в 1972 г.

Колориметрические методы определения общего белка сыворотки крови достаточно просты и относительно дешевы. К недостатку метода относится интерферирующее действие некоторых веществ (в том числе лекарств).

В настоящее время из множества методов определения общего белка сыворотки унифицированным признан биуретовый метод.

### ***Биуретовый метод***

#### ***История метода***

Разработан в 1949 году Горналлом, Бардавиллом и Дэвидом, ныне мало используется в биохимической лабораторной практике из-за низкой чувствительности.

#### ***Принцип метода***

Основан на образовании биуретового комплекса (имеет фиолетовый цвет) пептидных связей белков с двухвалентными ионами меди. В методе используют т. н. биуретовый реактив, состоящий из КОН, CuSO<sub>4</sub> и цитрата натрия (или тартрата натрия). В образовавшемся комплексе медь связана с 4 азотами координационными связями, а с 2 кислородами — электростатическими. Полноценный комплекс образуется лишь с пептидами, состоящими более чем из 4 остатков. Оптическую плотность раствора (прямо пропорциональную концентрации пептида) определяют при 540—560 нм.

К достоинствам метода стоит отнести его низкую чувствительность к посторонним веществам, невысокую погрешность.

Чувствительность метода — 2-10 мг/мл.

Материалом для исследования служит сыворотка крови пациента без выраженного гемолиза или липемии.

Метод линеен до концентрации белка в сыворотке 120 г/л, далее требуется разведение и повторный анализ.

#### ***Процедура анализа***

Приготовить и подписать три пробирки:

- Холостая проба
- Калибровочная проба
- Опытная проба

В пробирку с опытной пробой вносится сыворотка пациента, в калибровочную — раствор для калибровки с известной концентрацией белка, в холостую пробу вносят дистиллированную воду. Во все пробирки вносят биуретовый реагент в соотношении с сывороткой 50:1.

Пробы перемешивают и инкубируют в течение 30 минут при комнатной температуре. Затем измеряют оптическую плотность калибровочной и опытной проб против холостой пробы при 540 нм в кювете толщиной 1 см.

#### ***Расчеты***

Концентрацию общего белка рассчитывают по формуле:

$$C = (A_0 \times C_{\text{калибр}}) / A_{\text{калибр}},$$

где C — концентрация общего белка в опытной пробе, г/л;

A<sub>0</sub> — оптическая плотность опытной пробы;

A<sub>калибр</sub> — оптическая плотность калибровочной пробы;

C<sub>калибр</sub> — концентрация общего белка в калибровочном растворе, г/л.

Для диагностики гипопроотеинемии иногда полезным и информативным оказывается определение белка мочи. Для этого используют более чувствительный метод, применимый в области низких концентраций белка.

### *Альбумин*

Сывороточный альбумин синтезируется в печени и составляет большую часть среди всех сывороточных белков. Альбумин, содержащийся в крови человека, составляет около 55 % от всех белков, содержащихся в плазме крови.

Поскольку концентрация альбумина высока, а размеры его молекулы невелики, этот белок на 80 % определяет коллоидно-осмотическое давление плазмы.

Общая площадь поверхности множества мелких молекул сывороточного альбумина очень велика, поэтому они особенно хорошо подходят для выполнения функции переносчиков многих транспортируемых кровью и плохо растворимых в воде веществ. К веществам, связываемым сывороточным альбумином, относятся билирубин, уробилин, жирные кислоты, соли желчных кислот, некоторые экзогенные вещества — пенициллин, сульфамиды, ртуть, липидные гормоны, некоторые лекарства, такие как варфарин, фенбутазон, хлофибрат и фенитоин и т. д. Одна молекула альбумина может одновременно связать 25—50 молекул билирубина (молекулярная масса 500).

Нормальный уровень сывороточного альбумина у взрослых составляет от 35 до 50 г/л. Для детей в возрасте менее 3-х лет нормальный уровень — в пределах 25—55 г/л.

Низкий уровень альбумина (гипоальбуминемия) может возникать из-за болезни печени, нефритического синдрома, ожогов, энтеропатии с потерей белка, недоедания, на поздних сроках беременности, злокачественных новообразований. Приём ретинола (витамина А) в некоторых случаях может повысить уровень альбумина до высоких субнормальных значений (49 г/л).

Высокий уровень альбумина (гиперальбуминемия) почти всегда возникает в результате обезвоживания.

### *Определение концентрации альбумина в сыворотке*

#### Принцип метода

Измерение альбумина сыворотки основано на его количественном связывании с красителем 3,3,5,5-тетрабромом-м-крезолсульфонфталеином (бромкрезоловый зелёный) в присутствии детергента. Оптическая плотность комплекса альбумин-БКЗ имеет максимум поглощения при длине волны 578 нм и прямо пропорциональна концентрации альбумина в пробе.

Материалом для исследования служит сыворотка крови пациента.

Минимально выявляемая концентрация альбумина в пробе, определяемая с приемлемым уровнем воспроизводимости ( $CV \leq 10\%$ ) составляет 4,5 г/л

#### Процедура анализа

Приготовить и подписать три пробирки:

- Холостая проба
- Калибровочная проба
- Опытная проба

В пробирку с опытной пробой вносится сыворотка пациента, в калибровочную — раствор для калибровки с известной концентрацией альбумина, в холостую пробу вносят

дистиллированную воду. Во все пробирки вносят краситель в соотношении с сывороткой 100:1.

Пробы перемешивают и инкубируют в течение 1-5 минут при комнатной температуре. Затем измеряют оптическую плотность калибровочной и опытной проб против холостой пробы при 580-630 нм в кювете толщиной 1 см.

Расчеты:

Концентрацию альбумина рассчитывают по формуле:

$$C = \frac{A_{оп.}}{A_{кал.}} \times C_{кал.},$$

где:  $C$  — концентрация общего белка в анализируемой пробе, г/л;

$A_{оп.}$  — оптическая плотность анализируемой пробы;

$A_{кал.}$  — оптическая плотность калибратора;

$C_{кал.}$  — содержание общего белка в калибраторе, г/л.

*Нормальное количество общего белка в сыворотке крови колеблется от 60 до 80 г/л. Плазма содержит на 2-4 г/л больше за счет фибриногена, который отсутствует в сыворотке.*

Пониженная концентрация белков в крови называется **гипопротеинемия**, повышенная – **гиперпротеинемия**.

Причины гипопротеинемии:

- недостаточное введение белка (длительное голодание, безбелковая диета);
- повышенная потеря белка (при различных заболеваниях почек, кровопотерях, ожогах, новообразованиях, асцитах, сахарном диабете);
- нарушение образования белка в организме: при недостаточности функции печени (гепатиты, циррозы, токсические повреждения), длительном лечении кортикостероидами, нарушении всасывания (при энтеритах, энтероколитах, панкреатитах).

Гиперпротеинемия наблюдается при:

- дегидратации в результате потери части внутрисосудистой жидкости (при тяжелых травмах, обширных ожогах, холере);
- появлении в крови парапротеинов – патологических белков, вырабатываемых в большом количестве при миеломной болезни, при болезни Вальденстрема).

С помощью электрофореза на бумаге **выделяют 5 стандартных фракций**: альбумины и четыре фракции глобулинов ( $\alpha_1$ -глобулины,  $\alpha_2$ -глобулины,  $\beta$ -глобулины,  $\gamma$ -глобулины).

**Принцип электрофореза белков** заключается в следующем:

Ацетатцеллюлозная пленка, гель, специальная бумага (носитель) помещается на рамку, при этом противоположные края носителя свисают в кюветы с буферным раствором. На линию старта наносится сыворотка крови. Метод заключается в движении буферного раствора по поверхности носителя под влиянием электрического поля. Двигаясь, буферный раствор захватывает молекулы белков сыворотки. Молекулы с наибольшим отрицательным зарядом и наименьшим размером, т.е. **альбумины**,

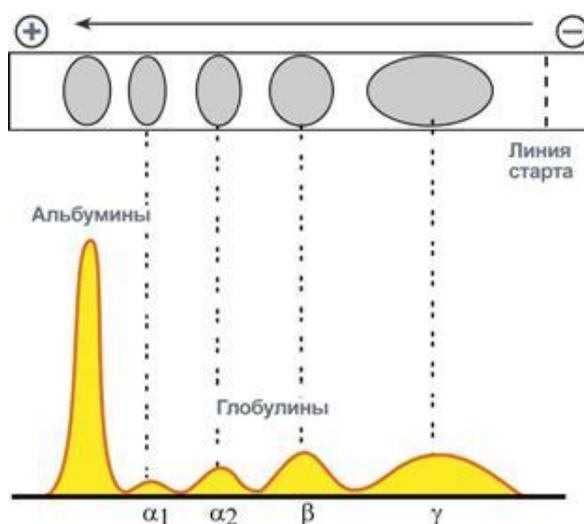
двигаются быстрее остальных. Наиболее крупные и нейтральные ( $\gamma$ -глобулины) оказываются последними.

На ход электрофореза влияет **подвижность** разделяемых веществ, находящаяся в зависимости от следующих факторов: **заряда** (обычно зависит от pH), **размера** и **формы** молекул веществ, **электрического поля**, **буфера** и **носителя** (учитывается его гидрофильность и адсорбционная способность).



Общий вид электрофореза

Количество выделяемых фракций определяется условиями проведения электрофореза. При электрофорезе на бумаге и пленках ацетата целлюлозы в клинико-диагностических лабораториях выделяют 5 стандартных фракций, в то время как в полиакриламидном геле – до 20 и более фракций. При использовании более совершенных методов (радиальная иммунодиффузия, иммуноэлектрофорез и других) в составе глобулиновых фракций выявляются многочисленные индивидуальные белки.



Электрофореграмма (вверху) и графический результат ее обработки (внизу)

На вид протеинограммы оказывают влияние только те белки, концентрация которых достаточно высока.

#### Нормальная протеинограмма

Альбумины	52-65 %	35-50 г/л
$\alpha_1$ -Глобулины	2,5-5 %	1-3 г/л
$\alpha_2$ -Глобулины	7-13 %	6-10 г/л
$\beta$ -Глобулины	8-14 %	7-11 г/л
$\gamma$ -Глобулины	12-22 %	8-16 г/л

**Альбуминовая фракция** включает в себя *альбумин* (основная часть) и *преальбумин* – ее доля составляет более 50% от всех белков плазмы.

**Глобулиновые фракции** более разнородны.

*Фракция альфа1-глобулина* включает в себя следующие белки:

- $\alpha$ 1-антитрипсин (основной компонент этой фракции) – ингибитор многих протеолитических ферментов – трипсина, химотрипсина, плазмина и т.д.;
- $\alpha$ 1-липопротеин (ЛПВП) – участвует в транспорте липидов;
- $\alpha$ 1-кислый гликопротеин (орозомукоид). Он повышается в ответ на различные острые и хронические воспалительные стимулы. Используется для индикации острофазового ответа.

*Фракция альфа2-глобулинов* включает:

- $\alpha$ 2-макроглобулин (основной компонент фракции) – является регулятором иммунной системы и участвует в развитии инфекционных и воспалительных реакций.
- Гаптоглобин – это гликопротеин, который образует комплекс с гемоглобином, высвобождающимся из эритроцитов при внутрисосудистом гемолизе, утилизирующийся затем клетками ретикулоэндотелиальной системы, что необходимо для предотвращения потерь железа и повреждения почек гемоглобином.
- Церулоплазмин – специфически связывает ионы меди, а также является оксидазой аскорбиновой кислоты, адреналина, диоксифенилаланина (ДОФА), способен инактивировать свободные радикалы. При низком содержании церулоплазмина (болезнь Вильсона-Коновалова) происходит накопление меди в печени (вызывая цирроз) и в базальных ганглиях мозга (причина хорее-акрохромии). Увеличение содержания церулоплазмина специфично для меланомы и шизофрении.
- Аполипопротеин В – участвуют в транспорте липидов.

*Фракция бета-глобулинов* включает:

- Трансферрин – белок, который осуществляет транспорт железа, тем самым, предотвращая накопление ионов железа в тканях и потерю его с мочой.
- Гемопексин – связывает гемм и предотвращает его выведение почками.
- Компоненты комплемента – участвуют в реакциях иммунитета.
- $\beta$ -липопротеин – участвует в транспорте холестерина и фосфолипидов.

*Фракция гамма-глобулинов* состоит из иммуноглобулинов, (IgG, IgA, IgM, IgE), функционально представляющих собой антитела, обеспечивающие гуморальную иммунную защиту организма от инфекций и чужеродных веществ.

**Диспротеинемия** – нарушение нормального соотношения фракций белков плазмы, встречается при многих заболеваниях, значительно чаще, чем изменение общего количества белка. Диспротеинемии обладают большой динамикой, связанной с фазой развития процесса, его длительностью и интенсивностью проводимых лечебных мероприятий.

**Типы протеинограмм**

В клинической практике для сыворотки выделяют 10 типов электрофореграмм (**протеинограмм**), соответствующих различным патологическим состояниям:

Тип протеинограммы	Альбумины	Фракции глобулинов				Примеры заболеваний
		$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\beta$	$\gamma$	
Острые воспаления	↓↓	↑	↑	–	↑	Начальные стадии пневмоний, острые полиартриты, экссудативный туберкулез легких, острые инфекционные заболевания, сепсис, инфаркт миокарда
Хронические воспаления	↓	–	↑↑	–	↑↑	Поздние стадии пневмоний, хронический туберкулез легких, хронический эндокардит, холецистит, цистит и пиелит
Нарушения почечного фильтра	↓↓	–	↑	↑	↓	Генуинный, липоидный или амилоидный нефроз, нефрит, нефросклероз, токсикоз беременности, терминальные стадии туберкулеза легких, кахексии
Злокачественные опухоли	↓↓	↑↑	↑↑	↑↑ ↑	↑↑	Метастатические новообразования с различной локализацией первичной опухоли
Гепатиты	↓	–	–	↑	↑↑	Последствия токсического повреждения печени, гепатиты, гемолитические процессы, лейкемии, злокачественные новообразования кроветворного и лимфатического аппарата, некоторые формы полиартрита, дерматозы
Некроз печени	↓↓	–	↓	↑	↑↑	Цирроз печени, тяжелые формы индуративного туберкулеза легких, некоторые формы хронического полиартрита и коллагенозов
Механические желтухи	↓	–	↑	↑	↑	Обтурационная желтуха, желтухи, вызванные развитием рака желчевыводящих путей и головки поджелудочной железы
$\alpha_2$ -глобулиновые плазмоцитомы	↓	↓	↑↑	↓	↓	$\alpha_2$ -Плазмоцитомы
$\beta$ -глобулиновые плазмоцитомы	↓	↓	↓	↑↑	↓	$\beta_1$ -Плазмоцитомы, $\beta_1$ -плазмноклеточная лейкемия и макроглобулинемия Вальденштрема
$\gamma$ -глобулиновые плазмоцитомы	↓	↓	↓	↓	↑↑	$\gamma$ -Плазмоцитомы, макроглобулинемия и некоторые ретикулезы

Для интегральной оценки протеинограмм используется А/Г коэффициент (альбумино-глобулиновое соотношение), составляющий в норме 1 – 2 отн. ед.

**Белки острой фазы (БОФ)** – большая группа белков сыворотки крови, синтезирующаяся в печени, концентрация которых возрастает при наличии воспаления, сдавления, ожога, бактериальной или вирусной инфекции.

**Классификация БОФ по степени увеличения их концентрации  
в сыворотке крови**

Группы БОФ	Степень увеличения концентрации БОФ	БОФ	Концентрация в сыворотке крови здорового человека (г/л)
1 группа	«Главные» БОФ, уровень которых возрастает при повреждении очень быстро (в первые 6-8 часов) и значительно (в 20-100 раз, в отдельных случаях - в 1000 раз).	С-реактивный белок (СРБ)	< 0,005
		Амилоидный белок А сыворотки	
2 группа	Белки, концентрация которых может умеренно увеличиваться (в 2-5 раз) в течении 24 ч	Орозомукоид (кислый α <sub>2</sub> -гликопротеид)	0,4 - 1,3
		α <sub>2</sub> - Антитрипсин	1,4 - 3,2
		Гаптоглобин	0,5 - 3,2
		Фибриноген	1,8 - 3,5 (плазма)
3 группа	Незначительное увеличение концентрации (на 20 - 60%) в течение 48ч	Церулоплазмин	0,2 - 0,5
		С3 - комплект	0,5 - 0,9
		С4 - комплект	0,1 - 0,4
4 группа	Нейтральные БОФ (белки, концентрация которых может оставаться в пределах нормальных значений, однако они принимают участие в реакциях острой фазы воспаления).	Иммуноглобулин G	8 - 20
		Иммуноглобулин А	0,9 - 4,5
		Иммуноглобулин М	0,6 - 2,5
		α <sub>2</sub> -Макроглобулин	1,2 - 3,2
5 группа	"Негативные" БОФ, уровень может снижаться на 30-60 % в течение 12 - 18 ч	Альбумин	37 - 53
		Трансферрин	2,3 - 4,3
		Преальбумин	0,25 - 0,45

Данные белки запускают каскад реакций для отграничения воспалительного очага, от неповрежденных тканей, восстановление нарушенной структуры и функции.

Синтез белков острой фазы активируется под действием провоспалительных цитокинов (интерлейкины – 1, 6, 11, факторы некроза опухолей, γ-интерферон).

Особенностью большинства БОФ является их неспецифичность и высокая корреляция концентраций в крови с активностью заболевания, стадией процесса и массивностью повреждения, что и определяет ценность этих тестов для мониторинга течения заболеваний и контроля эффективности лечения. Изменение концентрации различных белков в условиях повреждения и воспаления варьирует в широких пределах.

**Основные методы, используемые для определения БОФ, следующие:**

*1. Инструментальные: нефелометрия, иммунотурбидиметрия.*

Эти два метода примерно равноценны по чувствительности, специфичности, трудоемкости и стоимости исследования. Серийность и автоматизация исследований делает эти методы оптимальными для больших и средних лабораторий, выполняющих десятки и сотни анализов в день.

*2. Методы, не требующие оборудования: радиальная иммунодиффузия.*

Полностью готовые к употреблению иммунодиффузионные планшеты позволяют проводить количественный анализ С-реактивного белка и других белков ОФ без приборов и дополнительных реагентов. Они рекомендованы для небольших лабораторий, выполняющих ограниченное число исследований (от одного до 20 анализов) в день.

3. *Латекс-агглютинация* может использоваться как быстрый полуколичественный метод определения С-реактивного белка. Его назначение – скрининг повышенных концентраций, после чего следует перейти к мониторингу с использованием количественных методов.

### **Тесты на БОФ используемые в клинической практике.**

1. *При остром заболевании.* Во всех случаях следует определять С-реактивный белок, концентрация которого повышается уже спустя 6-8 часов после начала острого заболевания, при отсутствии лечения достигая максимума на 2-3 сутки. Наиболее высокие уровни СРБ наблюдаются при бактериальной инфекции (100 мг/л и выше). При эффективной терапии концентрация СРБ снижается уже на следующий день, если же этого не происходит, с учетом изменений уровней СРБ решается вопрос о выборе необходимого антибактериального лечения. При вирусной инфекции концентрация СРБ может повышаться лишь незначительно (меньше 20 мг/л), что используется для дифференцирования вирусной инфекции от бактериальной.

2. *При сопутствующей бактериальной инфекции.* При любых заболеваниях, либо после операции присоединение бактериальной инфекции, будь то местный процесс или сепсис, сопровождается повышением уровней белков ОФ.

3. *При некрозе тканей.* Некроз тканей вызывает острофазный ответ, аналогичный таковому при бактериальной инфекции. Это возможно при инфаркте миокарда, опухолевом некрозе тканей почки, легкого, толстого кишечника. Если обнаруживается повышение концентрации белков ОФ, но не удается выявить явных признаков воспаления, следует обследовать больного на наличие злокачественного заболевания.

4. *Для контроля эффективности лечения хронических заболеваний.* Существует корреляция между активностью воспаления, массивностью повреждения тканей и концентрацией белков ОФ. При этом следует измерять в динамике концентрацию нескольких белков ОФ, что позволит быстро улавливать ответ на лечение. Например, при системном васкулите контроль за уровнями СРБ используется как объективный тест, позволяющий минимизировать дозы стероидов. При отторжении почечного трансплантата острофазный ответ является одним из ранних индикаторов отторжения.

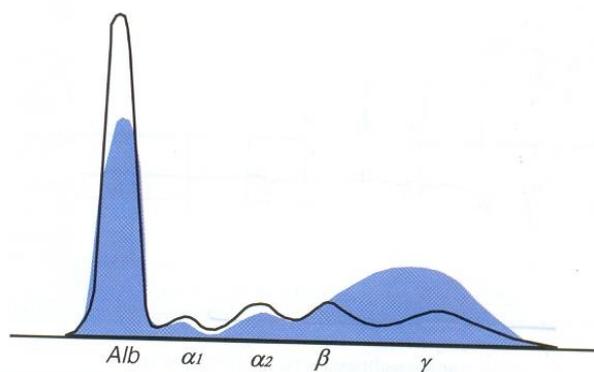
### **ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ**

1. Белковый состав плазмы крови.
2. Функции белков крови.
3. Синтез белков в печени, РЭС, клетках иммунной системы.
4. Общий белок в сыворотке крови, гипо- и гиперпротеинемия.
5. Методы определения содержания общего белка в крови.
6. Общая характеристика белковых фракции.
7. Альбумины, гипер- и гипоальбунемия.
8.  $\alpha$ 1-Глобулины:  $\alpha$ 1- протеиназный ингибитор,  $\alpha$ 1-кислый гликопротеин.
9.  $\alpha$ 2-Глобулины:  $\alpha$ 2-макроглобулин, гаптоглобин, церулоплазмин.

10.  $\beta$ -Глобулины: трансферрин, гемопексин.
11.  $\gamma$ -Глобулины: иммуноглобулины, гипер-гаммаглобулинемия.
12. Белки острой фазы воспаления, классификация, характеристика.
13. Тесты на белки острой фазы используемые в клинической практике.
14. Типы протеинограмм.
15. Протеинограмма при остром и хроническом воспалении.
16. Протеинограмма при нарушении функций почечного фильтра и злокачественных новообразованиях.
17. Протеинограмма при гепатитах, циррозах печени, механической желтухе.

### ЗАДАЧИ

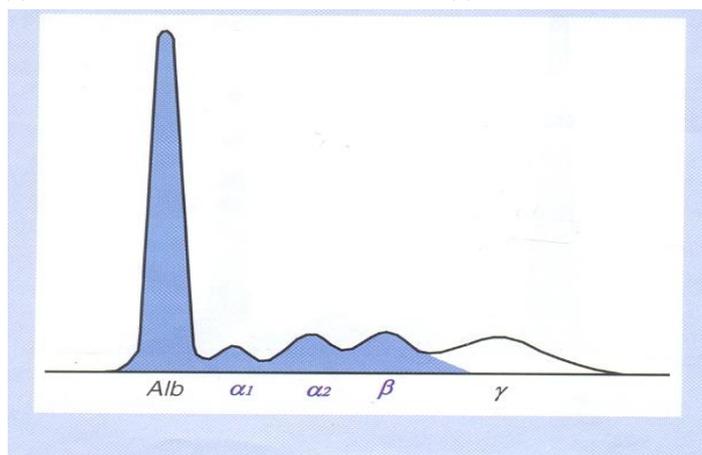
1. При определении белка биуретовым методом были получены следующие результаты: оптическая плотность образца – 930, оптическая плотность калибратора – 992, концентрация белка в калибраторе – 60 г/л. Определите уровень белка в сыворотке пациента. О какой патологии может идти речь? Какие клинические рекомендации можно дать пациенту?
2. При определении белка мочи методом с пирогаллоловым красным были получены следующие результаты: оптическая плотность образца – 650, оптическая плотность калибратора – 304, концентрация белка в калибраторе – 1 г/л. Определите уровень белка в моче пациента. Корректно ли полученное значение? О какой патологии может идти речь? Какие рекомендации можно дать пациенту и лечащему врачу?
3. Учитывая результаты протеинограммы и клиническую картину заболевания, какое заболевание можно заподозрить и какие дополнительные исследования провести для постановки окончательного диагноза?



	Res, %	Ref., %	Res, g/l	Ref, g/l
Albumins	32	52-65%	21,44	35-50 g / l
$\alpha$ 1-Globulins	2	2,5-5%	1,34	1-3 g / l
$\alpha$ 2-Globulins	5	7-13%	3,35	6-10 g / l
$\beta$ -Globulins	10	1,8-4%	6,7	1,2-2,7 g / l
$\gamma$ -Globulins	23	12-22%	16,4	8-15 g / l

Симптомы: субфебрильная температура, границы печени расширены, желтушность кожных покровов, потеря веса. В анамнезе алкоголизм.

4. Учитывая результаты протеинограммы и клиническую картину заболевания, какое заболевание можно заподозрить и какие дополнительные исследования провести для постановки окончательного диагноза?



	Res, %	Ref., %	Res, g/l	Ref, g/l
Albumins	55	52-65%	43	35- 0 g / l
α 1-Globulins	4	2,5-5%	2,7	1-3 g / l
α 2-Globulins	8	7-13%	7	6-10 g / l
β-Globulins	3	1,8-4%	2,3	1,2-2,7 g / l
γ-Globulins	2	12-22%	1,2	8-15 g / l

Симптомы: высокая частота инфекционных заболеваний, гипотрофия лимфатических узлов.

## **Тема занятия 10: Лабораторная диагностика заболеваний поджелудочной железы.**

**Цель занятия:** знать биохимическую диагностику заболеваний поджелудочной железы, диагностическое значение определения активности ферментов в крови и моче.

### **Перечень знаний и практических навыков:**

- Знать ферменты поджелудочной железы.
- Охарактеризовать диагностическое значение определения активности  $\alpha$ -амилазы в крови и моче.
- Уметь интерпретировать данные относительно содержания ферментов поджелудочной железы в крови и моче.

Поджелудочная железа – орган продолговатой формы, расположенный в брюшной полости. Играет важную роль в преобразовании поглощаемой пищи в “топливо” для клеток. Поджелудочная железа выполняет две основные функции: экзокринную, которая отвечает за переваривание и эндокринной функции, которая регулирует уровень сахара в крови.

Анатомия: поджелудочная железа расположена позади брюшины и окружена другими органами, включая тонкую кишку, печень и селезенку. Длина органа – около 15 см и он имеет форму плоской груши. Поджелудочная железа имеет головку, которая обращена к центру брюшной полости, шею, тело и хвост.

### **Функции поджелудочной железы:**

1. *Экзокринная функция.* Поджелудочная железа содержит экзокринные железы, выделяющие пищеварительные ферменты. Когда пища попадает в желудок, эти панкреатические соки попадают в систему протоков, которые собираются в основной поджелудочный проток. Поджелудочный проток впадает в общий желчный проток, формируя Фатеров проток, который расположен в двенадцатиперстной кишке. Общий желчный проток берет начало в печени и желчном пузыре и продуцирует желчь. Панкреатические соки и желчь, которые попадают в двенадцатиперстную кишку, переваривают жиры, углеводы и белки.

2. *Эндокринная функция.* Эндокринный компонент поджелудочной железы состоит из островков клеток, которые продуцируют и выделяют важные гормоны, непосредственно в кровоток. Основные гормоны поджелудочной железы – инсулин, который понижает уровень сахара в крови, и глюкагон, который увеличивает уровень сахара в крови. Поддержание нормального уровня сахара в крови необходимо для функционирования ключевых органов, включая мозг, печень, и почки.

Воспаление поджелудочной железы называется **панкреатитом**. Эта болезнь имеет две формы: острую и хроническую. Каждая форма может привести к осложнениям. В тяжелых случаях, могут быть кровотечение, инфекция, и перманентное повреждение ткани. Обе формы панкреатита встречаются чаще у мужчин, чем у женщин.

**Острый панкреатит** – воспаление поджелудочной железы, которое происходит внезапно и обычно лечится за несколько дней. Острый панкреатит может быть опасной болезнью с серьезными осложнениями. Основная причина острого панкреатита – желчекаменная болезнь. Хроническое злоупотребление алкоголем – также частая причина. Острый панкреатит может возникнуть в течение от нескольких часов до 2 дней после употребления алкоголя. Другие причины острого панкреатита включают травмы

брюшной полости, инфекции, опухоли и генетические отклонения поджелудочной железы.

**Хронический панкреатит** – воспаление поджелудочной железы. Данная форма панкреатита не вылечивается и не идет на поправку. Наоборот, со временем приводит к перманентному поражению железы. Хронический панкреатит, как и острый панкреатит, происходит, когда пищеварительные ферменты “атакуют” поджелудочную железу и соседние ткани, вызывая при этом приступы боли. Хронический панкреатит чаще развивается у людей в возрасте 30–40 лет.

Самая частая причина хронического панкреатита – злоупотребление алкоголем в течение продолжительного времени. Хроническая форма панкреатита может быть вызвана одной острой атакой, которая приводит к повреждению поджелудочного протока. Поврежденный поджелудочный проток приводит к воспалению железы.

#### **Лабораторные тесты:**

1) *Сывороточная амилаза.* Увеличение уровня амилазы обычно свидетельствует о панкреатите.

2) *Сывороточная липаза.* При остром панкреатите почти всегда увеличивается уровень липазы в сыворотке крови.

3) *Подсчет лейкоцитарной формулы.* Количество лейкоцитов увеличивается в период обострения панкреатита. Иногда происходит значительное увеличение.

4) *Печеночные пробы.* Увеличивается уровень печеночных ферментов, в частности, аланинаминотрансфераза и щелочная фосфатаза могут быть признаком острого панкреатита, вызванного желчекаменной болезнью.

5) *Билирубин.* Уровень билирубина в сыворотке крови может увеличиваться при закупорке общего желчного протока.

6) *Трипсин.* Это панкреатический фермент, который, наряду с печеночной желчью, переваривает жиры. Измерение концентрации трипсина в сыворотке – один из самых чувствительных тестов при панкреатите, в том числе, хроническом.

Другие тесты, которые могут быть использованы для оценки осложнений при остром панкреатите, включают:

- определение уровня глюкозы,
- определение уровня кальция,
- определения уровня магния,
- определение концентрации С-реактивного белка (маркер воспаления).

Другие тесты, которые могут быть использованы при постановке диагноза и оценке хронического панкреатита, включают:

- фекальный жир,
- фекальная панкреатическая эластаза,
- молекулярно-диагностические тесты для определения генетических мутаций, ассоциированных с фиброзом мочевого пузыря.

**Альфа-амилаза** – основной фермент, участвующий в гидролизе углеводов, а именно разложении крахмала и гликогена до декстринов, мальтозы и глюкозы. Места образования фермента – слюнные железы и поджелудочная железа. В сыворотке крови выделяют, таким образом, панкреатический (Р-тип) и слюнной (S-тип) α-амилазы. Определение активности α-амилазы в сыворотке и моче используется преимущественно в диагностике заболеваний поджелудочной железы. При остром панкреатите через 2–12

часов от начала приступа наблюдается преходящее увеличение активности  $\alpha$ -амилазы сыворотки; уровень фермента возвращается к норме на 3-й или 4-й день. Обычно происходит 4–6-кратное увеличение уровня с максимумом в период 12–72 часа от начала приступа. Альфа-амилаза экскретируется почками, поэтому увеличение активности фермента в сыворотке крови приводит к повышению активности  $\alpha$ -амилазы мочи.

#### **Диагностическое значение анализа**

Основная ценность определения Р-типа  $\alpha$ -амилазы заключается в том, что увеличение ее активности высокоспецифично для заболеваний поджелудочной железы. Панкреатическая  $\alpha$ -амилаза повышается при остром панкреатите. Активность общей амилазы в этом случае повышена за счет панкреатической фракции. Диагностическая чувствительность панкреатической фракции амилазы в сыворотке крови для острого панкреатита составляет 92%, специфичность – 85%.

#### **Альфа-амилаза при панкреатите**

Определение активности панкреатической фракции амилазы особенно важно при хроническом панкреатите у больных с нормальным уровнем общей амилазы. У больных с хроническим панкреатитом панкреатическая амилаза составляет 75–80% общей амилазы крови. Повышение панкреатической амилазы указывает на атаку *хронического панкреатита*, а снижение – на *экзокринную недостаточность* поджелудочной железы при атрофии ацинарной ткани и фиброзе органа у больных, длительно страдающих данным заболеванием.

Панкреатическая  $\alpha$ -амилаза в моче повышается при остром панкреатите, причем составляет основную часть общей амилазы, так как выводится с мочой лучше, чем слюнная фракция.

Активность панкреатической фракции амилазы в отличие от общей не повышается при паротите, диабетическом кетоацидозе, раке легкого, острых гинекологических заболеваниях. Вместе с тем тест может быть ложноположительным при других панкреатических заболеваниях.

Повышение уровня  $\alpha$ -амилазы сыворотки крови также встречается при:

- Острый панкреатит.
- Хронический вновь выпадающий панкреатит.
- Панкреатическая карцинома – главным образом головки поджелудочной железы.
- Обтурация поджелудочного протока.
- Диабетический кетоацидоз.
- Холецистит.
- Пептическая язва.
- Резекция желудка.
- Брыжеечный тромбоз.
- Перитонит.
- Хирургическое вмешательство на брюшной полости.
- Внематочная беременность.
- Лечение морфином, кодеином.
- Почечная недостаточность.
- Кишечная обструкция.
- Посттравматическое состояние.

Существует несколько методик определения альфа-амилазы сыворотки.

### ***Метод по Каравею***

#### Принцип метода:

Под действием альфа-амилазы крахмал гидролизуеться с образованием продуктов, не дающих цветной реакции с йодом. При взаимодействии крахмала с йодом образуется окрашенный комплекс, оптическая плотность которого при 640 нм пропорциональна концентрации негидролизованного крахмала.

Активности  $\alpha$ -амилазы оценивают по уменьшению интенсивности окраски.

Материалом для исследования служит сыворотка крови пациентов без следов гемолиза и липемии, а также разовая порция мочи пациентов.

Линейность метода находится в интервале от 3,0 до 36,0 мг/(с×л).

Нормальные величины:

- в сыворотке (плазме) крови 3,3–8,9 мг/(с×л);
- в моче до 44 мг/(с×л);
- в дуоденальном содержимом 1,7–4,4 г/(с×л).

Диапазон нормальных величин рекомендуется уточнять в каждой лаборатории.

#### Процедура анализа:

	Опытная проба (мл)	Контрольная проба (мл)
Субстрат	0,50	0,50
Водяная баня (37°C) 5 минут		
Образец	0,01	-
Перемешать и инкубировать при 37°C в течение 5 минут		
Соляная кислота	4,0	4,0
Образец	-	0,01
Рабочий раствор йода	0,30	0,30

Определяют оптическую плотность холостой и опытной проб при 640 нм (600–700 нм, красный светофильтр) относительно дистиллированной воды в кювете с толщиной слоя 10 мм. Окраска стабильна в течение 10 мин.

Активность  $\alpha$ -амилазы выражают в миллиграммах или граммах крахмала, гидролизованного 1 л исследуемого образца за 1 с инкубации при 37° С.

#### Расчеты:

Расчет активности  $\alpha$ -амилазы производят по формуле:

$$\text{Активность} = (A_{\text{контр}} - A_{\text{оп}}) / A_{\text{контр}} \times C \times t \times K,$$

где:

$A_{\text{контр}}$  – оптическая плотность контрольной пробы,

$A_{\text{оп}}$  – оптическая плотность опытной пробы,

$C$  - коэффициент пересчета на 1 мг крахмала,

$t$  - коэффициент пересчета на 1 секунду инкубации,

К - коэффициент пересчета на 1 л жидкости.

### ***Энзиматический кинетический метод***

#### ***Принцип метода:***

Под действием  $\alpha$ -амилазы синтетический субстрат EPS [4,6-этилиден(G7)-*p*-нитрофенил- (G1)- $\alpha$ -D-мальтогептаозид] гидролизуется с образованием бесцветных нитрофенилмальтоозидов. Под действием  $\alpha$ -глюкозидазы нитрофенилмальтоозиды гидролизуются до глюкозы и окрашенного *p*-нитрофенола. Скорость нарастания концентрации *p*-нитрофенола пропорциональна активности фермента. Оптическую плотность измеряют при длине волны 405 нм.

Метод линеен до 1640 Ед/л. Материалом для исследования служит сыворотка крови или моча пациента.

#### ***Процедура анализа:***

Смешать рабочий реагент и анализируемый образец в соотношении:

Сыворотка(плазма) = 25 : 1;

Моча = 50 : 1.

Тщательно перемешать и инкубировать в течение 3 минут при 37°C. Измерить экстинкцию и определить изменения экстинкции ( $\Delta A$ /мин) в течение последующих трех минут.

#### ***Расчеты:***

Расчет ферментативной активности  $\alpha$ -амилазы проводить по формуле:

Активность [МЕ/л] =  $K \times \Delta A$  /мин,

Где  $\Delta A$ /мин – изменение оптической плотности пробы за 1 минуту, рассчитываемое как разность  $A_2 - A_1$ , измеренных с интервалом в 1 минуту.

К – коэффициент, индивидуальный для каждого набора реагентов, условий инкубации и вида биологического материала.

### ***Определение панкреатической амилазы с использованием моноклональных антител.***

#### ***Принцип метода:***

Слюнной изофермент альфа-амилазы полностью ингибируется комбинацией двух моноклональных антител. Активность панкреатической амилазы измеряется фотометрически. Субстратом для определения активности панкреатической амилазы служит 4,6-Этилиден-4-нитрофенил- $\alpha$ -D-мальтогептаозид (EPS). Под действием альфа-амилазы внутренняя часть цепи субстрата расщепляется с образованием нитрофенилмальтогептаозидов, которые под действием  $\alpha$ -глюкозидазы гидролизуются до глюкозы и окрашенного в желтый цвет *p*-нитрофенола, имеющего максимум поглощения при 405 нм. Возрастание поглощения прямо пропорционально активности панкреатической амилазы в образце.

Линейность: до 1800 Е/л ( 30 мккат/л )

Чувствительность: 3 Е/л (0,05 мккат/л)

Нижний предел определения: 9,6 Е/л (0,16 мккат/л)

Диапазон измерений: 9,6 – 1800 Е/л (0,16 – 30 мккат/л)

Процедура анализа:

Двухреагентный метод – старт субстратом

	Бланк по реагенту	Калибратор	Образец
Реагент с моноклональными антителами, мл	1	1	1
Образец, мкл	-	-	20
Калибратор	-	20	-
Дистиллированная вода, мкл	20	-	-
Смешать, инкубировать 1 минуту. Добавить			
Реагент с EPS, мкл	250	250	250

После добавления реагента 2 смешать, через 2 мин. измерить поглощение при (37 °С) или через 4 мин. при (25 °С, 30 °С). Измерить поглощение точно через 1, 2 и 3 минуты. После измерения рассчитать среднее изменение поглощения в минуту ( $\Delta A$ ).

Расчеты:

Рассчитывают активность панкреатической амилазы в пробе, используя

Панкреатическая амилаза (Е/л; мккат/л) =  $C_{\text{кал}} \times \Delta A_{\text{обр}} / \Delta A_{\text{кал}}$

$C_{\text{кал}}$  – значение активности панкреатической амилазы в калибраторе

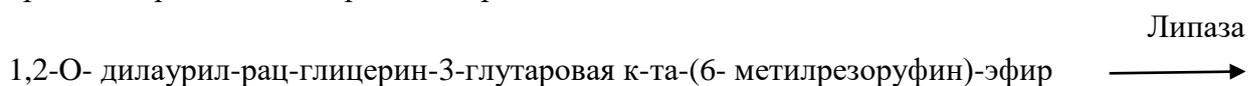
***Липаза***

Липаза - фермент, катализирующий гидролиз триглицеридов в тонком кишечнике с высвобождением жирных кислот – основного источника энергии у человека. Она вырабатывается рядом органов и тканей, поэтому различают липазу поджелудочной железы (панкреатическая липаза), липазу кишечного сока, желудочную, липазу лейкоцитов и так далее. В практике наибольшее значение имеет липаза, вырабатываемая клетками поджелудочной железы, так как именно ее активность является важнейшим фактором в процессе переваривания жиров. Уровни липазы в сыворотке у мужчин и женщин имеют одинаковые значения. Нормальные значения в сыворотке в среднем  $\leq 38$  Ед/л =  $\leq 0,633$  мккат/л.

***Кинетический метод определения липазы***

Принцип метода:

Липаза катализирует гидролиз хроматического субстрата 1,2-О- дилаурил-рац-глицеро-3-глутаровая кислота -(6-метилрезорурфин)-эфир и получается 1,2-дилаурил-рац-глицерин и глутаровая кислота-(6-метилрезорурфин)-эфир, промежуточный неустойчивый продукт. В щелочном растворе он самопроизвольно разлагается на глутаровую кислоту и метилрезорурфин. Каталитическая концентрация определяется по скорости формирования красного красителя замеряемого при 580 нм.



глутаровая к-та -(6- метилрезорурфин)- эфир → глутаровая к-та + метилрезорурфин

Предел обнаружения метода – 5,0 Ед/л липазы = 0,083 мккат/л липазы.

Предел линейности: 250 Ед/л = 4,17 мккат/л липазы. Для более высоких значений развести образец в пропорции 1:2 дистиллированной водой и повторить измерение. Результат умножить на 2.

Процедура анализа

Подготовить опытную и калибровочную пробирки. Предварительно нагреть реактивы до 37°C. Внести реагенты по схеме:

	Опытная	Калибровочная
Буферный раствор, мл	1	1
Образец, мкл	10	-
Калибратор, мкл	-	10
Субстрат, мкл	200	200

Перемешать содержимое пробирок. Через 1 минуту инкубации измерить изначальную оптическую плотность раствора и снимать новые показания каждую минуту в течение 3 минут.

Посчитать среднее увеличение оптической плотности в минуту ( $\Delta A/\text{мин}$ ).

Расчеты:

Концентрация липазы в пробе рассчитывается по формуле:

$$C = C_{\text{калибр}} \times \Delta A_{\text{пробы}} / \Delta A_{\text{калибр}}$$

где  $C_{\text{калибр}}$  – концентрация липазы в калибраторе,

$\Delta A_{\text{пробы}}$  – среднее изменение оптической плотности опытной пробы,

$\Delta A_{\text{калибр}}$  – среднее изменение оптической плотности калибровочной пробы.

**Альфа-1-антитрипсин** – белок (гликопротеин), синтезируемый в печени, моноцитах, макрофагах, клетках слизистой оболочки кишечника. Он служит ингибитором большинства протеолитических ферментов, имеющих в составе своего активного участка аминокислоту серин (трипсина, хемотрипсина, эластазы, калликреина, катепсинов и других ферментов тканевых протеаз). Важнейшая физиологическая роль  $\alpha$ -1-антитрипсина по-видимому состоит в торможении протеаз, особенно эластаз, выделяющихся из лейкоцитов при фагоцитозе. Имея небольшой размер молекулы, он легко диффундирует из плазмы в другие жидкости тела, включая бронхиальный секрет.

Относится к белкам острой фазы. Повышение активности может свидетельствовать о воспалительных процессах: острых и хронических инфекционных заболеваниях, острых гепатитах и циррозе печени в активной форме, остром и хроническом панкреатите. Содержание  $\alpha$ -1-антитрипсина в сыворотке крови повышается при злокачественных новообразованиях: раке (особенно шейки матки) и метастазах, лимфоме (особенно лимфогранулематозе), заболеваниях легких (эмфиземе).

Поскольку  $\alpha$ -1-антитрипсин является ингибитором протеолитических ферментов (разрушающих белки), то его недостаточность приводит к повышению активности этих ферментов. Это сопровождается усилением разрушения клеток и образованию фиброзной ткани. Дефицит  $\alpha$ -1-антитрипсина обусловлен его дефектом или мутациями в гене. Тяжелый врожденный дефицит сочетается с заболеваниями печени, особенно в детском возрасте (синдром неонатального гепатита, инфантильный цирроз), и с хроническими заболеваниями легких у взрослых (эмфизема и хронический бронхит). Частота

обнаружения гепатомы также повышена в популяциях с дефицитом  $\alpha$ -1-антитрипсина. Приобретенный дефицит  $\alpha$ -1-антитрипсина встречается при нефротическом синдроме, гастроэнтеропатии с потерей белка, острой фазе термических ожогов. Всем пациентам с хроническими заболеваниями печени показано плановое определение уровня  $\alpha$ -1-антитрипсина, это обусловлено невозможностью постановки правильного диагноза только на основании клинических данных.

**Альфа-2-макроглобулин** - высокомолекулярный белок крови, обнаруживаемый в сыворотке и других внесосудистых жидкостях в концентрации 2–4 мг/мл в зависимости от пола и возраста. Альфа-2-макроглобулин один из двух основных (наряду с  $\alpha$ 1-антитрипсином) ингибиторов протеаз плазмы позвоночных животных, обладает очень широким спектром активности, ингибирующей бактериальные и эукариотические эндопептидазы. Альфа-2-макроглобулин является уникальным эндогенным ингибитором протеиназ, который, взаимодействуя с энзимами, лишает их протеиназной активности, но сохраняет их способность гидролизовать пептиды. У человека является крупным тетрамером (гликопротеин с молекулярным весом 725 кД), вовлечен в патогенез ряда заболеваний легких и некоторых других патологий (маркер гломерулонефropатии). Взаимодействие между  $\alpha$ -2-макроглобулин и протеиназами приводит к конформационным изменениям молекулы ингибитора, которые проявляются в увеличении его электрофоретической подвижности и экспозиции особого гидрофобного рецептор - связывающего участка. Это приводит к быстрому удалению  $\alpha$ -2-макроглобулина из сосудистого русла за счет поглощения гепатоцитами, макрофагами и фибробластами. Было показано, что различные формы  $\alpha$ -2-макроглобулина связывают такие цитокины как ИЛ-1, 2, 6, 8, ФНО- $\alpha$  и др. Молекулярная масса: 725 килодальтонов. Молекула - tetramer с четырьмя идентичными подъединицами с молекулярными массами 179 килоДальтон.

### ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

1. Функции поджелудочной железы.
2. Понятие и формы панкреатита.
3. Лабораторные тесты при остром и хроническом панкреатите.
4. Диагностическое значение определения  $\alpha$ -амилазы при заболеваниях поджелудочной железы.
5. Диагностическое значение определения  $\alpha$ -1-антитрипсина при заболеваниях поджелудочной железы.
6. Диагностическое значение определения  $\alpha$ -2-макроглобулина при заболеваниях поджелудочной железы.
7. Строение и функции поджелудочной железы.
8. Лабораторные тесты при заболеваниях поджелудочной железы.
9. Альфа-амилаза и ее диагностическое значение.
10. Методики определения активности альфа-амилазы в крови.
11. Панкреатическая липаза, ее функция и диагностическое значение.
12. Методика определения активности липазы в крови.

### ЗАДАЧА.

Энзиматическим кинетическим методом был определен уровень активности альфа-амилазы, равный 1740 Ед./л. О какой патологии может идти речь? Может ли быть точным данный результат исследования? Как избежать погрешности?

## **Тема занятия 11: Лабораторная диагностика сахарного диабета.**

**Цель занятия:** Изучить основные формы сахарного диабета, уметь правильно оценивать результаты гликемического профиля, глюкозотолерантного теста. Изучить основные методы определения содержания глюкозы в сыворотке крови.

### **Перечень знаний и практических навыков:**

- Изучить классификацию сахарного диабета и его формы.
- Знать основные симптомы и клинические проявления.
- Охарактеризовать отличие абсолютной и относительной инсулиновой недостаточности.
- Знать разницу в содержании глюкозы в цельной крови и плазме.
- Изучить принцип глюкозотолерантного теста.
- Уметь интерпретировать полученные результаты глюкозотолерантного теста.
- Владеть навыком оценки результатов гликемического профиля.
- Знать методы определения содержания глюкозы.

**Сахарный диабет (СД)** – хронический метаболический синдром, характеризующийся гипергликемией, глюкозурией и связанными с ними нарушениями обмена веществ. Развивается вследствие абсолютной или относительной (нарушение взаимодействия с клетками-мишенями) недостаточности гормона инсулина и приводит к нарушению углеводного, жирового и белкового обмена.

Основным симптомом, определяющим патогенез и клинику СД, является гипергликемия. В норме содержание глюкозы натощак колеблется в пределах 3,3–5,5 у детей до 14 лет, 3,8–5,8 ммоль/л у взрослых. В цельной крови концентрация глюкозы ниже по сравнению с плазмой. Причина этого несоответствия – меньшее содержание воды в цельной крови. Глюкоза крови подвергается полной ультрафильтрации в клубочках почек, а затем полностью реабсорбируется в почечных канальцах. Однако способность канальцевого эпителия к обратному всасыванию глюкозы имеет количественный предел (почечный порог глюкозы 8,9–10 ммоль/л). Поэтому, как только гликемия и содержание глюкозы в первичной моче превысит этот предел, появляется глюкозурия.

### **Классификация сахарного диабета:**

В настоящее время предложена классификация сахарного диабета, использующая этиологический принцип.

#### **Этиологическая классификация сахарного диабета (ВОЗ, 1999).**

**I. Сахарный диабет 1-го типа (деструкция бета-клеток, абсолютная инсулиновая недостаточность):**

- А. Аутоиммунный.
- Б. Идиопатический.

**II. Сахарный диабет 2-го типа (претерпевает развитие от преимущественной резистентности к инсулину с относительной инсулиновой недостаточностью до преимущественно секреторного дефекта инсулина в сочетании с периферической инсулинорезистентностью).**

**III. Другие специфические типы сахарного диабета.**

- А. Генетические дефекты бета-клеточной функции
- В. Генетические дефекты в действии инсулина.
- С. Болезни экзокринной части поджелудочной железы.

- D. Эндокринопатии.
- E. Сахарный диабет, индуцированный химикатами и лекарствами.
- F. Инфекции (врожденная краснуха, цитомегаловирус, вирусы Коксаки).
- G. Необычные формы иммуноопосредованного диабета.
- H. Другие генетические синдромы, иногда сочетающиеся с сахарным диабетом (синдром Дауна, синдром Кляйнфельтера, синдром Тернера и т.д.).

#### **IV. Диабет беременных.**

Сахарный диабет бывает двух типов.

В клинической картине сахарного диабета принято выделять 2 группы симптомов – основные, а также второстепенные.

#### **Основные симптомы сахарного диабета следующие:**

**Полиурия**, то есть усиленное выделение мочи, которое вызывается повышением ее осмотического давления из-за наличия в моче растворенной глюкозы (в норме глюкоза в моче человека присутствовать не должна). Проявляется обильным учащенным мочеиспусканием в дневное, а также в ночное время.

**Полидипсия**, то есть неутолимая постоянная жажда, обусловленная существенными потерями с мочой воды, а также увеличением осмотического давления крови. Больные выпивают за сутки 3–5 л и более жидкости.

**Полифагия**, то есть неутолимый постоянный голод. Данный симптом вызывается сопровождающим диабет нарушением обмена веществ, а точнее неспособностью клеток поглощать, а также перерабатывать глюкозу без инсулина.

Признаками диабета первого типа являются: жажда, частое мочеиспускание, большая потеря веса, сухость во рту, раздражительность, быстрая утомляемость, тошнота, иногда рвота. Второстепенными признаками диабета такого типа служат: боли в сердце, боли в икроножных мышцах и судороги в них, фурункулез, кожный зуд, головные боли, раздражительность и нарушения сна. Говоря о второстепенных признаках диабета 1-го типа у детей, следует отметить появление не наблюдавшегося ранее ночного недержания мочи и быстрое ухудшение состояния здоровья.

Для диабета второго типа характерно онемение и судороги ног, болевые ощущения в ногах, а также в руках, чувство постоянной жажды, зуд, помутнение в глазах, плохое заживление ран, наличие кожных инфекций, утомляемость, а также сонливость, снижение болевой чувствительности, частые инфекционные заболевания, постепенное увеличение веса, снижение у мужчин потенции и пр. Кроме этого, при диабете второго типа наблюдается выпадение растущих на ногах волос на фоне усиленного роста волос на лице, появление на теле небольших желтых наростов, именуемых ксантомами. Также к первым признакам диабета 2-го типа относится воспаление крайней плоти, связанное с частым мочеиспусканием.

#### **Влияние инсулина на метаболизм**

Практически во всех тканях организма инсулин влияет на обмен углеводов, жиров, белков и электролитов, увеличивая транспорт глюкозы, белка и других веществ через мембрану клетки.

Основное действие инсулина заключается в усилении транспорта глюкозы через мембрану клетки. Содержание глюкозы в сыворотке крови является отражением состояния двух постоянно меняющихся процессов, находящихся под постоянным контролем инсулина: утилизация глюкозы тканями и поступления глюкозы в кровоток.

Свое биологическое действие на уровне клетки инсулин осуществляет через соответствующий рецептор в тканях. Стимуляция инсулином приводит к увеличению скорости поступления глюкозы внутрь клетки в 20–40 раз. Транспорт глюкозы через мембрану клетки осуществляется белками-транспортёрами. При стимуляции инсулином наблюдается увеличение в 5–10 раз содержания транспортных белков глюкозы в плазматических мембранах при одновременном уменьшении на 50–60% их содержания во внутриклеточном пуле. Стимуляция транспорта глюкозы увеличивает потребление энергии в 20–30 раз.

Большая часть инсулина метаболизируется в печени, за один пассаж в ней задерживается 40–60% гормона, поступающего из систем портальной вены. Инсулин после связывания с рецепторами гепатоцитов подвергается протеолизу, сопровождающегося инактивацией гормона. Около 40% инсулина инактивируется почками. Следует отметить, что при почечной недостаточности поглощение и инактивация инсулина почками уменьшаются до 9–10%, поэтому у больных сахарным диабетом при почечной недостаточности потребность в инсулине снижается (синдром Зуброды-Дана).

### **Абсолютная и относительная недостаточность инсулина**

В основе болезни лежит *абсолютная* и *относительная* инсулиновая недостаточность.

*Абсолютная недостаточность* обусловлена уменьшением выработки инсулина В-клетками островков Лангерганса поджелудочной железы в результате их дистрофических изменений или некроза под влиянием повреждающих факторов или нарушением синтеза инсулина, приводящим к инкреции гормона со сниженной биологической активностью.

Абсолютной инсулиновой недостаточности способствуют аутоиммунные процессы (нарушение системы иммуногенеза, приводящее к развитию процессов аутоиммуноагрессии с избирательным поражением В-клеток), вирусная инфекция, воспалительные заболевания, фиброз или кальциноз поджелудочной железы, циркуляторные изменения (атеросклероз), опухолевые процессы.

Абсолютная инсулиновая недостаточность является причиной развития сахарного диабета лишь у 10% больных. В большинстве случаев возникновение заболевания происходит при нормальной и даже повышенной концентрации эндогенного инсулина в крови. Причиной развития обменных нарушений в этих случаях является *относительная инсулиновая недостаточность*, в основе которой лежит снижение чувствительности инсулинозависимых тканей к действию эндогенного инсулина – тканевая инсулинорезистентность.

### **Гипергликемия и глюкозурия**

**Гипергликемия** – клинический симптом, обозначающий повышенное содержание сахара (глюкозы) в сыворотке крови. Гипергликемия появляется преимущественно при сахарном диабете или других заболеваниях эндокринной системы.

Существует несколько условных степеней выраженности симптома:

- легкая гипергликемия (уровень сахара составляет 6 – 10 ммоль/л);
- гипергликемия средней тяжести (10 – 16 ммоль/л);
- тяжелая гипергликемия (более 16 ммоль/л).

У людей, болеющих сахарным диабетом, встречаются две разновидности *гипергликемии*:

- гипергликемия натощак (если человек не принимал пищи около 8 часов, уровень сахара в крови возрастает свыше 7,2 ммоль/л);
- гипергликемия постпрандиальная (после приема пищи уровень сахара в крови превышает 10 ммоль/л).

### Критерии диагностики СД и других категорий гипергликемии (ВОЗ,1999)

Тесты, ммоль/л	Концентрация глюкозы в ммоль/л			
	цельная кровь		плазма	
	<b>Сахарный диабет</b>			
Натощак	> 6,1	> 6,1	> 7,0	> 7,0
Через 2 ч после нагрузки глюкозой или оба показателя	> 10,0	> 11,1	> 11,1	> 12,2
	<b>Нарушенная толерантность к глюкозе</b>			
Натощак (если определяется)	< 6,1	< 6,1	< 7,0	< 7,0
Через 2 ч после нагрузки глюкозой	> 6,7 и < 10,0	> 7,8 и < 11,1	> 7,8 и < 11,1	> 8,9 и < 12,2
	<b>Нарушенная гликемия натощак</b>			
Натощак	>5,6 и < 6,1	>5,6 и < 6,1	>6,1 и < 7,0	> 6,1 и 7,0
Через 2 ч	< 6,7	< 7,8	< 7,8	< 8,9

**Глюкозурия** – это выявление глюкозы в моче. В моче здорового человека глюкоза содержится в очень низкой концентрации (0,06–0,083 ммоль/л). Поэтому, а также из-за низкой чувствительности методов, она не выявляется при исследовании мочи в клинико-диагностических лабораториях.

Обнаружение глюкозы в моче свидетельствует о патологии.

Глюкозурия зависит от трех факторов:

- концентрации глюкозы в крови,
- количества фильтрата клубочков почки за 1 минуту,
- количества реабсорбированной в канальцах глюкозы в 1мл.

Глюкозурии чаще предшествует гипергликемия. Профильтрованная в почечных клубочках глюкоза реабсорбируется в проксимальном отделе почечных канальцев.

При нормально функционирующих почках глюкозурия появляется только в том случае, когда уровень глюкозы в крови превышает 8,8–9,9 ммоль/л, так называемый «почечный порог» или гломерулярный клиренс глюкозы. Понятие это относительное, так как «почечный порог» определяется ферментной системой почечного эпителия и, следовательно, в значительной степени индивидуален. У ребенка «почечный порог» выше (10,45–12,65 ммоль/л).

Объем клубочковой фильтрации также влияет на уровень глюкозурии. Его снижение даже при высоком уровне глюкозы крови может не вызвать глюкозурии. Поэтому при некоторых хронических заболеваниях почек порог глюкозы повышается. В случае нефропатии, сопровождающейся нарушением резорбции глюкозы (ренальный диабет), возможна глюкозурия и при нормальном или пониженном уровне глюкозы в крови.

### Толерантности к глюкозе

Нарушение толерантности к глюкозе – это состояние, которое предшествует диабету. При этом состоянии уровень глюкозы крови пациента уже выше нормального, но ниже того, при котором ставится диагноз диабета.

#### **Диагностические критерии оценки глюкозотолерантного теста (Комитет экспертов ВОЗ по сахарному диабету, 1999)**

Результаты оценки	Глюкоза капиллярной крови, ммоль/л (мг%)	
	Натощак	Через 2 ч
Здоровые	<5,5(100мг%)(<100)	< 7,8 (140 мг %) (<140)
Нарушенная толерантность к глюкозе	< 6,1 (<110 мг%) >6,1	>7,8<11,1 (>140<200 мг%)
Сахарный диабет	(>110 мг%)	>11,1 (>200 мг%)

Диагностическая важность этого состояния в том, что на этой стадии уже можно выявить угрозу развития диабета 2 типа и вовремя предотвратить ее. Было установлено, что через 10 лет после обнаружения нарушенной толерантности к глюкозе у 1/3 больных нарушенная толерантность переходит в сахарный диабет, а 1/3 больных нормализует метаболизм!

Поэтому проведение глюкозотолерантного теста позволяет выявить группы риска больных, которые в перспективе могут страдать серьезными заболеваниями, заранее дать рекомендации в целях предупреждения и тем самым сохранить им здоровье и продлить годы жизни. Именно поэтому сейчас не используется термин «преддиабет», которым ранее именовали нарушение толерантности к глюкозе.

#### ***Как определить, есть ли нарушение толерантности к глюкозе?***

Наличие нарушения толерантности к глюкозе определяется с помощью таких же анализов на содержание глюкозы в крови. Существует так называемый глюкозотолерантный тест, который помогает достоверно подтвердить или исключить наличие нарушения толерантности к глюкозе. Для этого, после определения уровня глюкозы крови натощак, пациенту дают выпить 75 г глюкозы, разведенной в 250–500 мл воды в течение 5 мин (для детей – 1,75 г на 1 кг массы тела). При проведении пробы у очень полных пациентов лиц глюкозу добавляют из расчета 1 г на 1 кг массы тела, но не более 100 г. После приема глюкозы производят забор капиллярной крови через 1 и 2 ч.

У здорового человека после приема глюкозы наблюдается быстрый рост уровня сахара в крови в течение 20–60 мин (немного разными темпами в венозной и капиллярной крови) за счет всасывания глюкозы в кишечнике. После этого наступает его снижение за счет реакции регулирующей системы (выделение инсулина), с понижением до исходного уровня между 1,5–2 ч после приема глюкозы. Между 2 и 2,5 ч наблюдается падение ниже исходной величины уровня глюкозы натощак, тем больше, чем выше был первоначальный уровень. Между 2,5 и 3 ч уровень сахара возвращается к норме. У пациента с нарушенной толерантностью к глюкозе уровень сахара натощак уже несколько выше, и через два часа не падает до исходной величины.

Интерпретация результатов этого теста имеет большое клиническое значение, поэтому пациенту важно знать следующее:

- В течение нескольких дней накануне нужно соблюдать обычный режим питания с содержанием углеводов не менее 125–150 г в сутки. Важно знать, что если накануне

больной не получал достаточного количества углеводов, то рост уровня глюкозы в крови будет больше, а падение его наступит позднее, что значительно искажает интерпретацию результатов.

- В течение нескольких дней накануне следует придерживаться привычных физических нагрузок. Значительная физическая нагрузка перед пробой может вызвать повышенный рост уровня глюкозы в крови, а физическое напряжение после приема глюкозы может дать сильнее выраженную и более длительную волну гипогликемии.

- Тест проводят утром натощак после ночного голодания в течение 10–14 ч.

- Накануне теста, с вечера следует воздержаться от курения и употребления алкоголя.

- В течение проведения теста (2 ч после введения глюкозы) пациент должен лежать или спокойно сидеть, не подвергаясь перепадам температуры (например, при выходе из помещения) и физическим нагрузкам. **Прием пищи, алкоголя, курения во время проведения теста не допускаются!**

- Тест не рекомендуется проводить после и во время стрессовых воздействий, истощающих заболеваний, после операций и родов, при воспалительных процессах, продолжительной им мобилизации, алкогольном циррозе печени, гепатитах, во время менструаций, при заболеваниях желудочно–кишечного тракта с нарушением всасывания глюкозы, злокачественных заболеваниях.

- Перед проведением теста необходимо исключить лечебные процедуры и прием лекарств (адреналина, глюкокортикоидов, контрацептивов, кофеина, ингибиторов карбоангидразы (ацетазоламида, диамокса), фенитоина (дифенина), диуретина, морфина, мочегонных тиазидинового ряда, психотропных препаратов. Ложноположительные результаты наблюдаются при гипокалиемии и некоторых эндокринных заболеваниях (акромегалия, синдром Кушинга, тиреотоксикоз).

- При нарушении функции желудочно-кишечного тракта (операции на желудке, пептическая язва) необходимо проводить тест с внутривенным введением глюкозы.

- Глюкозотолерантный тест может оказаться ложноотрицательным (гликемия в пределах нормы) при любых формах нарушения всасывания, предварительной редуцированной диете, интенсивной физической нагрузке накануне проведения

### **Постпрандиальная гипергликемия**

Как известно, хроническая гипергликемия является причиной развития и прогрессирования осложнений заболевания, а макроангиопатические осложнения - основной причиной смерти пациентов с СД.

Результаты недавнего анализа, проведенного учеными, подтвердили, что улучшение гликемического контроля значительно снижает частоту встречаемости макроангиопатических осложнений у пациентов с СД 1 или 2 типа. До недавнего времени доминирующий фокус терапии заключался в снижении уровней HbA1c с особым акцентом на показатели гликемии натощак. Однако, несмотря на то, что контроль гликемии натощак необходим, обычно его недостаточно для достижения оптимального гликемического контроля. В настоящее время получено достаточное количество данных, которые показывают, что снижение показателей **постпрандиальной** (после еды) глюкозы плазмы имеет ведущую роль и не менее важное значение для достижения целевых показателей гликированного гемоглобина (HbA1c).

В итоге достоверно признано, что *постпрандиальная гипергликемия* является независимым фактором риска развития макроангиопатических осложнений.

Таким образом, постпрандиальная гликемия вызывает серьезные осложнения, и ее необходимо контролировать.

Многочисленные исследования доказали, что применение препаратов, снижающих постпрандиальный уровень глюкозы плазмы, способствует и снижению частоты развития сосудистых осложнений. Таким образом, терапия, направленная на снижение показателей как гликемии натощак (ГКН), так и постпрандиальной гликемии, является стратегически важной для достижения оптимального гликемического контроля через призму профилактики диабетических осложнений.

Определение концентрации глюкозы в крови – одно из наиболее часто выполняемых биохимических исследований в клиничко-диагностической лаборатории. Причина исключительной популярности теста связана с высокой заболеваемостью сахарным диабетом. Данный тест выполняется как в условиях стационара, так и в поликлиниках. Больные сахарным диабетом вынуждены исследовать уровень глюкозы в крови в домашних условиях, поскольку без этой информации им трудно скорректировать свою диету, физические нагрузки, применение инсулина и других сахароснижающих препаратов. Исключительная важность теста и большие объемы выполняемых исследований стимулировали разработчиков к созданию различных типов приборов и методов определения концентрации глюкозы в крови.

В настоящее время существует достаточно много методов определения глюкозы.

Их можно классифицировать следующим образом:

1. *Редуктометрические*. Почти не используются.

2. *Колориметрические*. Почти не используются.

3. *Ферментативные*:

а) *Глюкозооксидазный*.

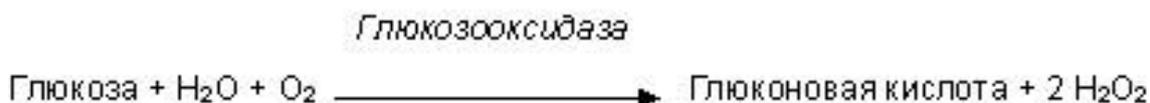
- фотометрический по конечной точке,
- фотометрический кинетический,
- отражательная фотометрия – сухая химия,
- электрохимический,

б) *Гексокиназный*.

### ***Определение концентрации глюкозы в сыворотке глюкозооксидазным методом***

#### **Принцип метода:**

В основе метода лежит следующая реакция:



Глюкозооксидаза катализирует перенос двух водородных атомов с первого углеродного атома глюкозы на кислород, растворенный в жидком реагенте. При этом в ходе реакции образуется в эквимольных количествах перекись водорода. Т.е. концентрация образовавшейся перекиси водорода точно равна определяемой концентрации глюкозы. Следовательно, использование глюкозооксидазной реакции,

трансформировало задачу определения концентрации глюкозы в задачу определения концентрации перекиси водорода, которая, как будет показано ниже, значительно проще первой. И здесь есть несколько способов, широко используемых сегодня в лабораторной практике.



Среди вышеперечисленных способов регистрации наибольшее распространение получил **фотометрический биохимический метод**, в котором молекулы перекиси водорода под действием фермента пероксидазы расщепляются с образованием активной формы кислорода – супероксид анион-радикала –  $O_2^-$ , который в свою очередь окисляет хромоген, что приводит к значительному изменению спектра поглощения хромогена.



Большая популярность данного метода определения глюкозы объясняется его высокой специфичностью и простотой выполнения. Метод можно реализовать как с применением обычного фотометра, так и с помощью автоматических биохимических автоанализаторов.

Глюкозооксидазный метод признан сегодня одним из самых точных количественных методов определения глюкозы.

В качестве биологического материала используется как сыворотка крови, так и цельная кровь. При работе с последней следует учитывать тот факт, что при взятии капиллярной крови доля сыворотки (плазмы) зависит от величины гематокрита, что может негативно отразиться на точности результата. Поэтому при определении глюкозы вышеописанным методом предпочтительно использовать сыворотку крови пациента.

Наряду с методом фотометрирования по конечной точке, несколько лет назад появились наборы, в которых реализован **кинетический метод фотометрирования**. Суть метода состоит в том, что при определенном соотношении активностей глюкозооксидазы и пероксидазы, скорость образования окрашенного соединения некоторое время после

внесения пробы в рабочий раствор будет пропорциональна концентрации глюкозы в пробе. Преимущество такого метода состоит в том, что результат не зависит от наличия в пробе других соединений, поскольку поглощение последних стабильно во времени. Этот метод требует применения кинетического фотометра, полуавтоматических анализаторов или автоматических биохимических анализаторов. Измерение концентрации глюкозы из цельной крови удобно выполнять с помощью приборов, работа которых основана на амперометрическом принципе измерения, при помощи специальных ферментных датчиков. Перекись водорода является крайне нестабильным химическим соединением, и она может служить источником заряженных частиц. Именно это и используется в ферментных датчиках мембранного типа или электрохимических элементах портативных глюкометров.

Однако образующаяся перекись водорода и супероксид анион-радикал могут окислять не только хромоген, но и другие вещества, присутствующие в биологической жидкости: аскорбиновую кислоту, мочевую кислоту, билирубин. При этом, соответственно, доля перекиси, принимающая участие в окислении хромогена, снижается, что приводит к занижению результата по глюкозе.

Итак, глюкозооксидаза катализирует окисление  $\beta$ -D-глюкозы кислородом воздуха с образованием эквимольных количеств глюколактона и перекиси водорода. Пероксидаза катализирует окисление хромогенных субстратов перекисью водорода в присутствии фенола с образованием окрашенного соединения, интенсивность окраски которого прямо пропорциональна концентрации глюкозы в пробе и измеряется фотометрически при длине волны 500 (480-520) нм

Этот метод линеен, как правило, до 20-30 ммоль/л глюкозы. Чувствительность метода - не более 0,5 ммоль/л. Нормальные значения глюкозы сыворотки находятся в пределах 3,3-5,5 ммоль/л, однако для каждого диагностического набора существуют свои референсные пределы.

Процедура анализа:

Реагент – это буферно-ферментный раствор, содержащий калий фосфорнокислый, фенол, 4-аминоантипирин, глюкозооксидазу, пероксидазу.

Приготовить три пробирки – для опытной, калибровочной и контрольной пробы соответственно.

Отмерить, мкл	Опытная проба	Калибровочная проба	Контрольная проба
Сыворотка или плазма крови	10	—	—
Вода дистиллированная	—	—	10
Калибратор	—	10	—
Реагент	1000	1000	1000

Соотношение сыворотки или плазмы крови к реагенту 1 составляет 1:100.

Пробы перемешать и инкубировать при температуре + 37<sup>0</sup> С в течение 10 мин или при комнатной температуре (+ 18 – 25<sup>0</sup> С) в течение 20 мин. Измерить оптическую плотность опытной и калибровочной проб против контрольной (холостой) пробы при длине волны 500 (480-520) нм в кювете с длиной оптического пути 10 мм.

Окраска растворов стабильна в течение 60 мин.

Расчеты:

Содержание глюкозы в сыворотке и плазме крови определить по формуле:

$$C = \frac{E_o}{E_k} \times C_{\text{кал}}$$

где: С — концентрация глюкозы в анализируемой пробе, ммоль/л;

$E_o$  — оптическая плотность анализируемой пробы;

$E_k$  — оптическая плотность калибратора;

$C_{\text{кал}}$  — содержание глюкозы в калибраторе, ммоль/л.

**Определение концентрации глюкозы в сыворотке гексокиназным методом.**

Гексокиназный метод состоит из двух последовательных реакций, но совершенно других:



Регистрация осуществляется при длине волны 340 нм по светопоглощению НАДН. Этот метод является высокоспецифичным и не дает реакции с другими компонентами сыворотки крови. Гексокиназный метод считается референтным для определения глюкозы. Как правило, он линеен до 50 ммоль/л, что позволило его широко рекомендовать для клиник с эндокринологическими отделениями.

Процедура анализа:

Рабочий реагент содержит ферменты гексокиназу, глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназу, а также АТФ.

Приготовить три пробирки для опытной, калибровочной и контрольной проб соответственно.

Компоненты реакционной среды	Опытная проба	Калибровочная проба	Контрольная (холостая) проба
Рабочий реагент, мл	1,0	1,0	1,0
Сыворотка крови, мкл	10	—	—
Калибратор, мкл	—	10	—
Дистиллированная вода, мкл	—	—	10

Пробы тщательно перемешать и выдержать в течение 5 минут при  $t\ 37^\circ\text{C}$  или 10 минут при комнатной температуре (18-25 $^\circ\text{C}$ ). Измерить оптическую плотность опытной и калибровочной проб против контрольной (холостой) пробы при длине волны 340 нм в кювете с длиной оптического пути 1,0 см. Величина оптической плотности раствора стабильна не менее 30 минут после окончания инкубации.

Расчет концентрации глюкозы проводится аналогично глюкозооксидазному методу.

## ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

1. Сахарный диабет, определение.
2. Классификация сахарного диабета.
3. Основные формы сахарного диабета.
4. Диагностические критерии сахарного диабета I и II типов.
5. Основные симптомы и клинические проявления.
6. Инсулин, влияние на метаболизм.
7. Гипергликемия и глюкозурия.
8. Содержание глюкозы в цельной крови и плазме, отличие.
9. Нарушенная толерантность к глюкозе.
10. Диагностические критерии оценки глюкозотолерентного теста.
11. Нарушенная гликемия натощак.
12. Абсолютная и относительная недостаточность инсулина.
13. Постпрандиальная гипергликемия
14. Методы определения глюкозы в сыворотке крови. Референсные пределы.
15. Определение глюкозы глюкозооксидазным методом. Преимущества и недостатки.
16. Определение глюкозы гексокиназным методом. Преимущества и недостатки метода.

### ЗАДАЧА

При измерении глюкозы сыворотки глюкозооксидазным методом были получены следующие значения:  $E_o=327$ ,  $E_{\text{кал}}=291$ . Концентрация глюкозы в калибраторе – 5,55 ммоль/л. Вычислите концентрацию глюкозы в пробе. Попадает ли полученный результат в референсный интервал? Является ли он признаком патологии? Как следует поступить в подобной ситуации? Какие рекомендации по поводу дальнейшего обследования вы можете дать данному пациенту?

## **Тема занятия 12: Лабораторная оценка степени риска осложнений при сахарном диабете.**

**Цель занятия:** изучить маркеры ранней диагностики сахарного диабета, уметь выявлять маркеры сосудистого риска.

### **Перечень знаний и практических навыков:**

- Знать основные маркеры ранней диагностики сахарного диабета;
- Охарактеризовать гликозилированный гемоглобин и фруктозамин, как эффективный контроль гипергликемии;
- Уметь проводить оценку сосудистого риска при сахарном диабете;
- Усвоить понятие о гипогликемической коме.
- Уметь интерпретировать полученные результаты содержания гликозилированного гемоглобина;
- Овладеть оценкой показателей липидного спектра.

В настоящее время во всем мире накоплены доказательства того, что эффективный контроль сахарного диабета может свести к минимуму многие осложнения, связанные с ним. Так, улучшение контроля уровня глюкозы в крови может значительно уменьшить риск развития как микроангиопатии, так и макроангиопатии. На каждый процент снижения гликозилированного гемоглобина риск развития микрососудистых осложнений (ретинопатии, нефропатии) снижается на 35%.

Существуют ранние лабораторные маркеры сахарного диабета, позволяющие выявить заболевание на ранней стадии до появления клинических симптомов и метаболических расстройств.

### **Ранняя диагностика сахарного диабета**

*Антитела к бета-клеткам поджелудочной железы (антитела к клеткам островков Лангерганса, ICA)* – маркер аутоиммунного поражения бета-клеток поджелудочной железы, продуцирующих инсулин. Основные показания к применению: диагностика сахарного диабета первого типа, оценка риска развития сахарного диабета первого типа у лиц с отягощенной наследственностью по сахарному диабету.

Данный вид аутоантител (антител, образующихся в организме к собственным антигенам, белкам и другим веществам организма) вырабатывается к антигенам островковых клеток поджелудочной железы, секретирующих инсулин. Тест, фактически, указывает на процесс поражения (разрушения) островковых клеток. Характерной особенностью данной группы антител является их раннее появление в сыворотке крови, за несколько лет, до развития клинической формы сахарного диабета. Эти антитела появляются у больных до клинического развития сахарного диабета после перенесенных инфекционных заболеваний, вызванных вирусом Коксаки, эпидемическим паротитом и другими вирусами. Определение содержания данных аутоантител можно использовать для выявления степени риска развития инсулинозависимого сахарного диабета.

Маркером аутоиммунной деструкции бета-клеток поджелудочной железы представляют аутоантитела к островковым клеткам – ICA. Они представляют собой антитела к антигенам, которые находятся в цитоплазме клеток островков Лангерганса. Они могут определяться в сыворотке крови здоровых лиц (0,5%), у лиц без диабета, но являющихся родственниками больных сахарным диабетом первого типа (2–6%) и обнаруживаются у пациентов с сахарным диабетом в 70–80% случаев. Обнаружена закономерность: чем моложе пациент с выявленными антителами ICA и выше их титр,

тем выше вероятность развития сахарного диабета первого типа. Антитела обнаруживаются не только у пациентов с диабетом, но и у родственников больных, чаще у тех, кто имеет идентичные гены системы HLA.

Следует учитывать, что антитела к антигенам островков поджелудочной железы не являются специфичными только к антигенам бета-клеток, хотя и имеется небольшая перекрестная реакция между ними. Особенностью антител к антигенам островков является уменьшение их содержания по мере увеличения срока от начала развития диабета первого типа. В первые месяцы от манифестации заболевания они обнаруживаются у 70–90% лиц, через 1–2 года только у 20%. Через 15–20 лет цитоплазматические антитела (ICA) можно обнаружить лишь у 5% больных.

C-peptide – показатель синтеза инсулина и обмена углеводов. Основные показания к применению: диагностика диабета I и II типов, инсулинома, оценка секреции инсулина при заболеваниях печени, оценка инсулинотерапии.

C-пептид представляет собой белковую часть молекулы проинсулина, образующегося в процессе синтеза инсулина. В ответ на увеличение содержания глюкозы проинсулин расщепляется на инсулин и C-пептид, секретируясь в кровь в эквимоллярных количествах. Образование C-пептида происходит следующим образом. Проинсулин представлен одной большой полипептидной цепью, содержащей 84 аминокислотных остатка, он лишен биологической (гормональной) активности. Местом синтеза проинсулина считается фракция микросом бета-клеток панкреатических островков, превращение неактивного проинсулина в активный инсулин происходит при перемещении проинсулина от рибосом к секреторным гранулам путем частичного протеолиза (отщепление с C-конца полипептидной цепи пептида, содержащего 33 аминокислотных остатка и получившего наименование соединяющего, или C-пептида). Длина и первичная структура C-пептида подвержена большим изменениям у разных видов животных, чем последовательность цепей А и В инсулина. Хотя C-пептид не обладает биологической активностью, но он отражает скорость образования инсулина. Однако периоды полужизни инсулина и C-пептида в крови различны, тем не менее, наблюдается выраженная корреляция между их наличием в крови при не совпадении концентраций в сыворотке. Соотношение C-пептид к инсулину обычно составляет 5:1. Определение содержания C-пептида позволяет определять содержание собственного инсулина при инсулинотерапии, поскольку препараты инсулина, применяющиеся при лечении, не содержат C-пептид.

Проинсулин – предшественник инсулина, синтезирующийся бета-клетками островков Лангерганса поджелудочной железы. Основные показания к применению: клинические признаки инсулиномы, выяснение причин гиперинсулинизма.

3–10% проинсулина поступает в кровоток, остальная часть превращается в инсулин путем отщепления C-пептида. Инсулин и C-пептид поступают в кровь в эквимоллярных количествах. Проинсулин практически не обладает метаболической активностью инсулина (сахароснижающей активностью). Его активность более чем в 10 раз меньше активности инсулина, но значительное повышение его концентрации может привести к гипогликемии.

Проинсулин является основным маркером для диагностики опухолей бета-клеток поджелудочной железы (инсулином). Его определение может иметь важное значение в дифференциальной диагностике состояний, связанных с гиперинсулинемией.

### **Критерии компенсации сахарного диабета**

Полное излечение сахарного диабета на сегодняшний день недостижимо, поэтому терапия направлена на компенсацию метаболических нарушений (поддержание физиологической нормы уровня глюкозы за счет лекарственных препаратов).

Критериями компенсации сахарного диабета в настоящее время считаются:

- хорошее состояние больного
- стабильное течение болезни (суточная нормогликемия и аглюкозурия)
- нормальное содержание гликированного гемоглобина и фруктозамина.

Хорошей компенсацией инсулинзависимого сахарного диабета считается: аглюкозурия, уровень гликемии натощак 4,4–6,7 ммоль/л, после еды – не более 8,9 ммоль/л, в 3 ч ночи – более 3,1 ммоль/л, гликогемоглобин – менее 8,5%, отсутствие как явных, так и скрытых гипогликемий.

Уровень гликемии натощак более 7,8 ммоль/л, после еды – более 10 ммоль/л, стойкая глюкозурия более 0,5%, повышенное содержание гликированного гемоглобина должно расцениваться как неудовлетворительная компенсация углеводного обмена. У больных с подобными показателями быстрее развиваются осложнения сахарного диабета, которые находятся в прямой зависимости от степени его компенсации.

В результате десятилетнего наблюдения за развитием осложнений у больных инсулинзависимым сахарным диабетом, проведенного в США, установлено, что, если в течение длительного времени с помощью интенсифицированной инсулинотерапии поддерживать нормогликемию или близкое к ней состояние, то риск поражений сосудов глаз снижается на 76%, почек – на 35–36%, нервов – на 60%.

### **Критерии компенсации углеводного обмена при сахарном диабете 2 типа**

Показатели	Типы гликемий	Критерии компенсации углеводного обмена при СДII		
		Компенсация	Субкомпенсация	Декомпенсация
НbA1c (%)		6,0-6,5	6,6-7,0	>7,0
Самоконтроль глюкозы в капиллярной крови ммоль/л	Гликемия натощак	5,0-5,5	5,6-6,5	>6,5
	Постпрандиальная гликемия (2 часа после еды)	<7,5	7,5-9,0	>9,0
	Гликемия перед сном	6,0-7,0	7,1-7,5	>7,5

Объективным долгосрочным показателем степени компенсации сахарного диабета является гликозилированный (гликированный) гемоглобин (или гликогемоглобин, или НbA1c-тест, где Нb – гемоглобин, A1c – присоединенная глюкоза). Гемоглобин и другие белки соединяются с глюкозой в ходе медленной неферментативной реакции, зависящей от концентрации глюкозы. Чем больше глюкозы содержится в крови, тем больше гликозилированного гемоглобина накапливается в эритроцитах. Тест определения гликозилированного гемоглобина отражает средний уровень содержания глюкозы в крови за период жизни эритроцитов за последние 2–3 мес., в течение которых происходит взаимодействие гемоглобина и глюкозы.

**Зависимость уровня гликозилированного гемоглобина  
от среднего показателя глюкозы крови**

Гликемия, ммоль/л	4,5	6	8	10	12	14	17	19
HbA1c, %	5	6	7	8	9	10	11	12

В норме содержание HbA1c в крови составляет 5–7% от общего уровня гемоглобина. У 6% лиц, не болеющих сахарным диабетом, выявляется повышение уровня гликозилированного гемоглобина.

Гемоглобин HbA1c является самой важной подгруппой фракции гемоглобина HbA1, состоящей из 3 компонентов (HbA1a; HbA1b; HbA1c). Количественно преобладает HbA1c. Уровни гликозилированного гемоглобина HbA1 в крови на 1,5–2% выше, чем HbA1c. У больных с хорошей компенсацией сахарного диабета он находится в пределах 8,5–11%. На показатель гликозилированного гемоглобина могут влиять такие патологические состояния, как анемия, полицитемия, гемоглобинопатии.

О состоянии гликемического контроля в течение длительного времени можно судить по адекватности роста и развития ребенка и по выраженности поражений сосудов и нервов у больных сахарным диабетом.

**Критерии степени нарушений углеводного обмена и риска развития  
сосудистых осложнений (макро- и микроангиопатий) при сахарном диабете 2-го типа**

Показатели	Риска развития сосудистых осложнений		
	Низкий риск	Риск макроангиопатии	Риск микроангиопатии
<b>HbA1c, %</b>	6,5 и менее	более 6,5	более 7,5
<b>Глюкоза плазмы венозной крови натощак:</b>			
ммоль/л	6,1 и менее	более 6,1	7,0 и более
мг/дл	110 и менее	более 110	126 и более
<b>Глюкоза капиллярной крови (самоконтроль) натощак:</b>			
ммоль/л	5,5 и менее	более 5,5	6,1 и более
мг/дл	100 и менее	более 100	135 и более
<b>после еды:</b>			
ммоль/л	менее 7,5	7,5 и более	более 9,0
мг/дл	менее 135	135 и более	более 160

**Определение уровня гликозилированного гемоглобина  
иммунотурбодиметрическим методом**

Поскольку количество HbA1c зависит также от общего количества гемоглобина, измеренное значение HbA1c указывается в процентах от концентрации общего гемоглобина.

Ошибочно низкие значения (низкий HbA1c при высоком уровне глюкозы в крови) могут наблюдаться при сниженном сроке жизни эритроцитов (гемолитические заболевания) или при значительной недавней потере крови (увеличение доли молодых эритроцитов). Ошибочно высокие значения (высокий HbA1c при нормальном уровне глюкозы в крови) обнаруживались при железодефицитной анемии (повышенный процент старых эритроцитов). При клинической интерпретации значений HbA1c следует принимать во внимание эти обстоятельства.

Принцип метода:

Определение гликированного гемоглобина представляет иммунотурбидиметрический тест по конечной точке с сенсбилизацией частицами и непосредственным определением HbA1c без измерения общего гемоглобина.

Общий гемоглобин и HbA1c гемолизированной крови соединяются с латексными частицами, обладая одинаковым сродством к ним. Для каждого из этих веществ связанное количество пропорционально концентрации в крови.

К связанному латексными частицами HbA1c присоединяются мышинные моноклональные антитела к человеческому HbA1c. Содержащиеся в другом реагенте козы поликлональные антитела к мышинному IgG взаимодействуют с мышинными антителами, что приводит к агглютинации. Измеряемое поглощение света пропорционально количеству HbA1c, связанному с латексными частицами, которое, в свою очередь, пропорционально проценту HbA1c в пробе.

Чувствительность метода – не более 1%.

Процедура анализа:

Перемешать пробу с гемолизирующим раствором в соотношении 1:50 и выждать 5 минут или до полного гемолиза.

	<b>Холостая проба</b>	<b>Образец/ калибратор</b>
<b>Образец/калибратор, мкл</b>	–	20
<b>Дист. вода, мкл</b>	20	–
<b>Реагент с латексными частицами, мкл</b>	750	750
Перемешать, инкубировать 2 мин при 37°C, затем добавить:		
<b>Мышинные моноклональные антитела к HbA1c, мкл</b>	250	250
Перемешать, инкубировать 3 мин при 37°C, затем добавить:		
<b>Козьи антитела к мышинному IgG, мкл</b>	125	125
Запустить секундомер сразу после внесения <b>козьих антител</b> , перемешать, инкубировать <b>точно 2 мин</b> и измерить оптическую плотность (A) против воздуха при 660 нм в кювете с длиной оптического пути 10мм.		

Расчет:

Концентрация HbA1c в тестируемых пробах определяется по калибровочной кривой с использованием соответствующей математической модели, такой как сплайн-аппроксимация. Калибровочная кривая строится по поглощениям 4 калибраторов различных концентраций и изотонического раствора NaCl (0,9%), используемого для построения нулевой точки.

**Фруктозамин** – продукт гликозилирования белков плазмы крови (соединение глюкозы с белками). Более 60% всех белков, реагирующих с глюкозой, представлено альбумином. Степень гликозилирования белков плазмы зависит от концентрации глюкозы в крови и длительности периода полураспада белков. Количество фруктозамина в крови является хорошим показателем для ретроспективного контроля за содержанием глюкозы в крови у больных сахарным диабетом и позволяет оценивать эффективность проводимого лечения без отягощающего больного ежедневного контроля за уровнем гликемии в крови.

Период полувыведения сывороточных белков меньше, чем срок жизни эритроцитов. Поэтому, в отличие от гликозилированного гемоглобина, уровень фруктозамина отражает степень постоянного или транзиторного повышения уровня глюкозы не за 2–3 месяца, а за 1–3 недели, предшествующие исследованию.

#### ***Определение фруктозамина в сыворотке кинетическим методом***

##### ***Принцип метода:***

В щелочной среде фруктозамин или гликозилированные белки сыворотки разлагают хлорид нитросинего тетразолия (НСТ) до формазана. Изменение окраски, измеренное при 550 нм, прямо пропорционально концентрации фруктозамина в сыворотке.

Материалом для исследования служит сыворотка крови без следов гемолиза.

Чувствительность метода – 1 мкмоль/л, предел линейности – 1000 мкмоль/л. Нормальные значения находятся в пределах 187-287 мкмоль/л.

##### ***Процедура анализа:***

Приготовить три пробирки для опытной, калибровочной и холостой проб соответственно.

	Опытная проба	Калибровочная проба	Холостая проба
Калибратор, мкл	–	100	–
Проба, мкл	100	–	–
НСТ (реагент), мл	1,0	1,0	1,0

Перемешать, инкубировать при 37°C и начать отсчет времени.

Измерить оптическую плотность (A1) пробы и стандарта точно через 10 мин и через 15 мин (A2) после добавления пробы против бланка по дистиллированной воде при 520 нм.

##### ***Расчет:***

$$\Delta A = A_2 - A_1$$

$$C = (\Delta A_{\text{пробы}} \times C_{\text{кал}}) / \Delta A_{\text{кал}}$$

Как известно, хроническая гипергликемия является причиной развития и прогрессирования осложнений заболевания, а макроангиопатические осложнения – основной причиной смерти пациентов с СД.

Результаты недавнего мета-анализа, проведенного Stettler и коллегами, подтвердили, что улучшение гликемического контроля значительно снижает частоту встречаемости макроангиопатических осложнений у пациентов с СД 1 или 2 типа. До недавнего времени доминирующий фокус терапии заключался в снижении уровней HbA1c с особым акцентом на показатели гликемии натощак. Однако, несмотря на то, что контроль гликемии натощак необходим, обычно его недостаточно для достижения

оптимального гликемического контроля. В настоящее время получено достаточное количество данных, которые показывают, что снижение показателей *постпрандиальной* (после еды) глюкозы плазмы имеет ведущую роль и не менее важное значение для достижения целевых показателей гликированного гемоглобина (HbA1c). Важность *постпрандиальной* регуляции стала одной из основных тем дискуссий во время 43-го ежегодного собрания Европейской Ассоциации по изучению диабета в сентябре 2007 года в Амстердаме. Широкой медицинской общественности было представлено «Руководство по ведению постпрандиальной гликемии», разработанное Международной федерацией диабета в 2007 г. при участии ученых с большим опытом в подобной деятельности и практических врачей, а также лиц с жизненным опытом СД. Важно отметить, что руководство создавалось с использованием основных принципов доказательной медицины, с опорой на обзоры, сделанные ранее, мета-анализы, клинические, когортные исследования, а также эпидемиологические исследования, исследования на животных и фундаментальные работы, основные положения и руководства. В итоге достоверно признано, что *постпрандиальная гипергликемия* является независимым фактором риска развития макроангиопатических осложнений. Также с высокой степенью доказательности можно утверждать, что *постпрандиальная гликемия* (ППГ) ассоциируется:

- с повышенным риском ретинопатии;
- с увеличением толщины intima-media сонных артерий;
- со снижением миокардиального объема крови и миокардиального кровотока;
- с увеличением риска развития рака;
- с нарушением когнитивной функции у лиц старшего возраста с СД 2 типа;
- приводит к развитию оксидативного стресса, воспаления и эндотелиальной дисфункции.

Таким образом, постпрандиальная гликемия вызывает серьезные осложнения, и ее необходимо контролировать.

Многочисленные исследования доказали, что применение препаратов, снижающих постпрандиальный уровень глюкозы плазмы, способствует и снижению частоты развития сосудистых осложнений. Таким образом, терапия, направленная на снижение показателей как гликемии натощак (ГКН), так и постпрандиальной гликемии, является стратегически важной для достижения оптимального гликемического контроля через призму профилактики диабетических осложнений. Становится ясно, что внедрение в практику стратегии, направленной на нормализацию показателей постпрандиальной гликемии, абсолютно необходимо.

#### ***К каким же целевым показателям постпрандиальной гликемии следует стремиться?***

Известно, что уровень глюкозы в плазме крови после еды редко повышается выше 7,8 ммоль/л у лиц с нормальной толерантностью к глюкозе и обычно возвращается к исходным показателям через два часа после приема пищи. Таким образом, Международная диабетическая федерация и другие компетентные организации определяют нормальную глюкозотолерантность как уровень гликемии менее 7,8 ммоль/л через два часа после нагрузки с 75 г глюкозы. С учетом того, что отсутствуют данные о существовании определенного гликемического порога для снижения частоты осложнений, целью терапии СД должно быть достижение как можно более близкого к практически нормальным показателям гликемического статуса по всем трем критериям гликемического контроля: уровню HbA1c, уровню глюкозы плазмы натощак и после приема пищи. С учетом этих целей и повышения

доступности различных вариантов сахароснижающей терапии, а также технологий для коррекции и мониторинга показателей постпрандиальной гликемии достижение целевого показателя глюкозы в плазме крови через 2 часа после приема пищи менее 7,8 ммоль/л можно считать резонным и достижимым.

### **Гипогликемическая кома**

*Очень опасно повышение сахара в крови, однако не меньшие последствия вызывает его резкое понижение. Ведь, одним из самых частых острых осложнений сахарного диабета является гипогликемическая кома.*

В основе этого состояния лежит гипогликемия, то есть понижение сахара в крови. Болезнь возникает при содержании глюкозы в крови от 3 до 3,5 ммоль/л и ниже, хотя в некоторых ситуациях, например при активной физической работе, ряд признаков может наблюдаться и при 4 ммоль/л.

***Гипогликемия чаще всего является следствием нарушения приема таблетированных сахаропонижающих средств или инсулинотерапии.***

В зависимости от степени выраженности можно выделить легкую, средней тяжести и тяжелую гипогликемию. Чаще это состояние может возникнуть при сахарном диабете 1-го типа, являясь как раз результатом нарушений дозировки инсулина, однако нередко может встретиться у пожилых людей при сахарном диабете 2-го типа.

Гипогликемическая кома - это тяжелейшее проявление гипогликемии.

***Легкая гипогликемия*** – (вне зависимости от степени выраженности симптомов) когда больному самостоятельно удается купировать ее приемом углеводов.

***Тяжелая гипогликемия*** – (с различной степенью нарушения сознания) для выведения из которой требуется помощь другого лица, в виде парентерального введения глюкозы или пероральной дачи углеводов пациенту

### **Основная причина гипогликемии**

Избыток инсулина в организме по отношению к поступлению углеводов извне (с пищей) или из эндогенных источников (продукция глюкозы печенью), а также при ускоренной утилизации углеводов (мышечная работа).

### **Провоцирующие факторы:**

- Непосредственно связанные с медикаментозной сахароснижающей терапией:
  - Передозировка инсулина, ПСМ или глинидов (новонорм, старлекс): ошибка больного, неисправность инсулиновой шприц-ручки или глюкометра, намеренная передозировка, ошибка врача (слишком низкий целевой уровень гликемии, слишком высокие дозы).
  - Изменение фармакокинетики инсулина или пероральных препаратов: смена препарата, почечная и печеночная недостаточность, неправильная техника инъекций.
  - Повышение чувствительности к инсулину: длительная физическая нагрузка, ранний послеродовой период, надпочечниковая или гипофизарная недостаточность.
- Связанные с питанием:
  - пропуск приема пищи или недостаточное количество углеводов,
  - прием алкоголя,
  - ограничение питания для снижения массы тела,
  - замедление опорожнения желудка (при автономной нейропатии),
  - рвота,
- Беременность (первый триместр) и кормление грудью.

## Клиническая картина

• **Вегетативные симптомы:** сердцебиение, дрожь, бледность кожи, потливость, мидриаз, тошнота, сильный голод, беспокойство, тревога, агрессивность

• **Нейрогликопенические симптомы:** слабость, нарушение концентрации, головная боль, головокружение, сонливость, парастезии, нарушения зрения, растерянность, дезориентация, дизартрия, нарушение координации движений, спутанность сознания, кома, возможны судороги и другие неврологические симптомы.

*Чем быстрее снижается уровень глюкозы в крови, тем обычно ярче проявляются симптомы.*

## Показатели липидного спектра при сахарном диабете

Особенности **липидного** спектра при СД-2 характеризуется «липидной триадой», которая включает:

- увеличение концентрации триглицеридов,
- снижение уровня холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) и
- преобладание в крови мелких плотных частиц липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) фенотипа В при пограничных значениях ХС ЛПНП.

Такое состояние является следствием следующих событий: в результате инсулинорезистентности и недостаточной секреции инсулина нарушается постпрандиальная регуляция липидов, повышается уровень свободных жирных кислот (СЖК) в крови, увеличивается выработка ЛПОНП печенью и снижается их гидролиз липопротеинлипазой, что приводит к росту количества богатых триглицеридами циркулирующих липопротеидных частиц. Вторично снижается концентрация ХС ЛПВП из-за повышенного переноса эфиров ХС из ЛПВП в ЛПОНП и хиломикроны в обмен на триглицериды.

## ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

1. Способы ранней диагностики сахарного диабета.
2. Определение антител к  $\beta$ -клеткам поджелудочной железы, роль в диагностике СД.
3. Определение проинсулина и С-пептида, роль в диагностике СД.
4. Критерии компенсации сахарного диабета.
5. Гликозилированный гемоглобин, понятие.
6. Ранняя диагностика сахарного диабета: гликозилированный гемоглобин и фруктозамин.
7. Показатели липидного спектра при сахарном диабете.
8. Постпрандиальная гипергликемия, понятие.
9. Гипокликемическая кома, причины возникновения
10. Методика определения гликированного гемоглобина.
11. Методика определения фруктозамина сыворотки.

## ЗАДАЧА

При измерении глюкозы сыворотки глюкозооксидазным методом были получены следующие значения:  $E_o=327$ ,  $E_{\text{кал}}=291$ . Концентрация глюкозы в калибраторе – 5,55 ммоль/л. Вычислите концентрацию глюкозы в пробе. Попадает ли полученный результат в референсный интервал? Является ли он признаком патологии? Как следует поступить в подобной ситуации? Какие рекомендации по поводу дальнейшего обследования вы можете дать данному пациенту?

### **Тема занятия 13: Лабораторная диагностика заболеваний сердечно-сосудистой системы.**

**Цель занятия:** научиться оценивать показатели липидного обмена и высчитывать риск развития сердечнососудистых заболеваний (ССЗ). Научиться использовать лабораторные данные в диагностике ССЗ.

#### **Перечень знаний и практических навыков:**

- Знать структуру и функции разных классов липидов.
- Охарактеризовать особенности исследования липидного спектра.
- Изучить алгоритмы диагностики дислипидемий.
- Знать правила взятия крови для исследований липидного обмена.
- Ознакомиться с механизмом развития атеросклероза и основными его осложнениями.
- Уметь интерпретировать полученные результаты исследования липидного спектра при различных патологических состояниях организма человека.
- Знать биохимические маркеры инфаркта миокарда, сроки изменения их активности в крови.
- Охарактеризовать основные метаболические нарушения при остром инфаркте миокарда.
- Знать основные и дополнительные исследования, проводимые при дифференциальной диагностике ССЗ.
- Уметь интерпретировать полученные результаты лабораторных исследований маркеров ССЗ.

Сердечно-сосудистые заболевания зачастую являются следствием нарушения липидного обмена. Поэтому важно уметь диагностировать дислипидемии.

**Липиды** – органические соединения, нерастворимые в воде, но растворимые в органических растворителях (эфире, бензине, хлороформе).

#### **Классификация липидов.**

Существует несколько классификаций липидов. Наибольшее распространение получила классификация, основанная на структурных особенностях липидов. По этой классификации различают следующие основные классы липидов.

**А. Простые липиды:** сложные эфиры жирных кислот с различными спиртами.

1. Глицериды (ацилглицерины, или ацилглицеролы – по международной номенклатуре) представляют собой сложные эфиры трехатомного спирта глицерина и высших жирных кислот.

2. Воска: сложные эфиры высших жирных кислот и одноатомных или двухатомных спиртов.

**Б. Сложные липиды:** сложные эфиры жирных кислот со спиртами, дополнительно содержащие и другие группы.

1. Фосфолипиды: липиды, содержащие, помимо жирных кислот и спирта, остаток фосфорной кислоты. В их состав часто входят азотистые основания и другие компоненты:

а) глицерофосфолипиды (в роли спирта выступает глицерол);

б) сфинголипиды (в роли спирта – сфингозин).

2. Гликолипиды (гликосфинголипиды).

3. Стероиды (холестерин).

4. Другие сложные липиды: сульфолипиды, аминолипиды, липопротеины.

**В. Предшественники и производные липидов:** жирные кислоты, глицерол, стеролы и прочие спирты (помимо глицерола и стеролов), альдегиды жирных кислот, углеводороды, жирорастворимые витамины и гормоны.

#### **Функции липидов**

1. Структурная: фосфолипиды, гликолипиды, холестерол – в составе мембран.
2. Энергетическая: при расщеплении 1г жира выделяется 38,9 кДж энергии.
3. Запасающая: накапливаясь, – резервный источник энергии (капля жира в клетке, жировое тело насекомых, подкожная жировая клетчатка).
4. Защитная:
  - физическая защита от механических повреждений;
  - водоотталкивающие свойства: воска: кутикула, перья, шерсть;
  - электрическая изоляция: гликолипиды (миелин);
  - простагландины (повышают t, стимулируют сокращение мышц внутренних органов).
5. Терморегуляторная:
  - тепловая изоляция (подкожный жир);
  - «бурый жир» – биологический обогреватель.
6. Источник эндогенной воды: окисление 100 г жира дает 107 мл воды.
7. Регуляторная: липиды – предшественники синтеза стероидных гормонов, жирорастворимых витаминов А, Д, Е, К, растительных пигментов.

#### **Холестерин**

Суточное потребление холестерина находится в диапазоне от 0,2 до 0,5 г. В организме ежедневно синтезируется более 1 г. Все клетки организма содержат его в составе своих мембран и теоретически способны его синтезировать. Общее количество холестерина в теле человека огромно – более 300 г.

Холестерин в связанной с жирными кислотами форме содержится в надпочечниках, гонадах (83%), в плазме крови (70%). В остальных тканях – в основном в свободном виде.

#### **Функции холестерина**

- понижает жидкость и проницаемость биологических мембран;
- участвует в обеспечении барьерной функции мембран;
- влияет на активность мембранных ферментов;
- избыток холестерина в цитоплазматической мембране затрудняет работу кальциевых насосов;
- является предшественником стероидных гормонов надпочечников и половых гормонов, витамина Д;
- окисляясь, превращается в желчные кислоты и выводится из организма;
- недостаток холестерина в организме способствует повышенному риску развития опухолевых и вирусных заболеваний.

#### ***Определение концентрации общего холестерина в сыворотке и плазме крови энзиматическим колориметрическим методом (реакция Триндера)***

##### Принцип метода

Холестерин из состава эфиров высвобождается под действием фермента холестеринэстеразы (ХЭ). При участии фермента холестериноксидазы (ХО) холестерин окисляется до 4-холестен-3-она. Образующаяся перекись водорода, при участии фермента

пероксидазы, способствует окислительному азосочетанию 4-амино-антипирина (4-ААП) и фенола с образованием окрашенного соединения (хинониминный краситель).

Интенсивность окраски реакционной среды пропорциональна содержанию холестерина в исследуемом материале и определяется фотометрически при длине волны 500 (490-520) нм.



В качестве исследуемого материала используют сыворотку, гепаринизированную или ЭДТА-плазму крови без следов гемолиза. Проба стабильна 7 дней при температуре 2-8°C.

Линейность метода – 0,5-25,8 ммоль/л.

Чувствительность метода – 0,008 ммоль/л.

#### Процедура анализа

Рабочий реагент содержит PIPES буфер, хлорат натрия, фенол, холестеролэстеразу, холестеролоксидазу, пероксидазу, 4-Аминоантипирин.

Подготовить и подписать пробирки для опытной, калибровочной и холостой проб. Реагент прогреть до комнатной температуры. Добавить реагент и образец по схеме:

	Опытная проба	Калибровочная проба	Холостая проба
Реагент, мл	1,0	1,0	1,0
Сыворотка, мкл	10	-	-
Калибратор, мкл	-	10	-
Дист. вода, мкл	-	-	10

Соотношение пробы и реагента составляет 1: 100.

Реакционную смесь тщательно перемешать и инкубировать не менее 15 минут при комнатной температуре (18-25°C) или 10 минут при температуре 37°C. После окончания инкубации измерить оптическую плотность опытной и калибровочной проб против контрольной (холостой) пробы при длине волны 500 нм (490 – 540 нм). Окраска растворов стабильна не менее 1 часа после окончания инкубации при хранении проб в защищенном от света месте при комнатной температуре.

#### Расчет:

Расчет концентрации холестерина проведите по формуле:

$$C = \frac{E \text{ пробы}}{E \text{ калибр.}} \times C_{\text{кал}} \text{ (ммоль/л)}$$

где: E пробы – оптическая плотность исследуемой пробы,

E калибр. – оптическая плотность калибровочной пробы,

C<sub>кал</sub> – концентрация холестерина в калибраторе.

Нормальные значения содержания общего холестерина зависят от возраста, пола, характера питания.

Желательный уровень холестерина < 5.17 ммоль/л.

Предельно-высокий уровень холестерина - 5.17 - 6.19 ммоль/л.

Высокий уровень холестерина  $\geq$  6.20 ммоль/л.

### Лipoproteины (ЛП)

Частицы ЛП имеют сферическую форму и состоят из гидрофильной оболочки и гидрофобного ядра. Гидрофобное ядро представлено неполярными триацилглицеридами и эфирами холестерина. Гидрофильная оболочка – это верхний мозаичный монослой, состоящий из фосфолипидов, свободного холестерина и апопротеинов. Гидрофильная оболочка обеспечивает растворимость ЛП и определяет пути метаболизма и судьбу каждого ЛП (благодаря апопротеинам).

При проведении электрофореза липопротеины подразделяют на фракции, одна из которых остается на старте (хиломикроны), другие мигрируют к зонам глобулинов –  $\beta$ -ЛП, пре- $\beta$ -ЛП,  $\alpha$ -ЛП, флотирующие  $\beta$ .

По величине гидратированной плотности ЛП принято разделять на 5 классов:

- хиломикроны (ХМ),
- ЛП очень низкой плотности (ЛПОНП),
- ЛП промежуточной плотности (ЛППП),
- ЛП низкой плотности (ЛПНП),
- ЛП высокой плотности (ЛПВП), которые делятся на 2 подкласса ЛПВП<sub>2</sub>, ЛПВП<sub>3</sub>.

При этом по электрофоретической подвижности

ЛПОНП соответствует пре- $\beta$ -ЛП,

ЛППП - флотирующим  $\beta$

ЛПНП -  $\beta$ -ЛП,

ЛПВП -  $\alpha$ -ЛП,

ХМ – остается на старте.

### Характеристика липопротеинов

Класс ЛП	Плотность	Размер, нм	Состав ЛП, %				Апо	Место образования	Основная функция
			Бе-лок	ТГ	ХС	ФЛ			
ХМ	Менее 0,960	500-700	4	90	1	5	А-IV, В-48, С, Е	тонкая кишка	транспорт экзогенных ТГ
ЛПОНП	0,960-1,006	30-70	10	65	15	10	В-100, С, Е	печень	транспорт эндогенных ТГ
ЛППП	1,007-1,019	15-25	10	35	40	15	В-100 С, Е	катаболизм ЛПОНП	предшественник ЛПНП
ЛПНП	1,020-1,063	15-30	20	5	50	25	В-100	катаболизм ЛПОНП через ЛППП	транспорт ХС
ЛПВП	1,064-	7,0-13	45	5	25	25	А-I,	печень,	обратный

	1,210						А-П, С, Е	тонкая кишка, катаболизм ХМ и ЛПОНП	транспорт ХС
--	-------	--	--	--	--	--	--------------	---	-----------------

Апо – апопротеины,  
ТГ – триглицериды,  
ХС – холестерин,  
ФЛ – фосфолипиды.

Чем меньше размер частиц **ХС ЛПНП**, тем выше их **атерогенность** (критерий, характеризующий риск развития атеросклероза).



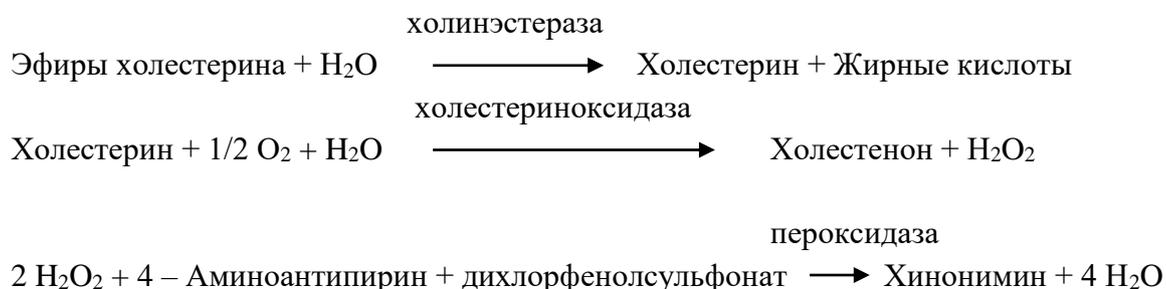
- ЛПНП – предиктор острых коронарных событий и развития ССЗ. Размер
- связь с ССЗ, обусловленными атеросклерозом, и их осложнениями. Доказана
- уровень ЛПНП на 10% сопровождается увеличением риска ИБС на 20%. Повышение
- риск ИБС возрастает при сочетании с другими факторами риска: Суммарный
  - уровень ЛПВП, низкий
  - курение,
  - я гипертония, артериальна
  - диабет. сахарный

**ХС ЛПВП** удаляет избыточный холестерин из тканей и из кровотока и способствует его транспортировке в печень.

- ХС ЛПВП являются антиатерогенными, т.к. сопряжены со снижением риска атеросклероза и связанных с ним заболеваний.
- Чем ниже уровень ХС ЛПВП, тем выше риск этих заболеваний (низкий уровень ХС ЛПВП < 35 мг/дл, или 0.9 ммоль/л).
- Уровень ХС ЛПВП снижен при высоких ТГ.
- Уровень ХС ЛПВП снижен при курении, ожирении, гиподинамии.

### **Определение концентрации холестерина ЛПВП преципитационным методом.**

Липопротеиды очень низкой плотности (VLDL) и липопротеиды низкой плотности (LDL) образца осаждают фосфовольфраматом и ионами магния. После центрифугирования в супернатанте остаются липопротеиды высокой плотности (HDL). Концентрацию HDL-Холестерина определяют так же, как концентрацию общего холестерина – спектрофотометрически, ферментативным методом с участием сопряженных реакций.



В качестве исследуемого материала используют сыворотку, гепаринизированную или ЭДТА-плазму крови без следов гемолиза. Проба стабильна 7 дней при температуре 2-8°C.

Линейность метода – 3,5 ммоль/л.

Чувствительность – 0,078 ммоль/л.

#### Процедура анализа:

Реагент 1 (осаждающий реагент) содержит фосфовольфрамат, хлорид магния.

Реагент 2 содержит фосфат, холестеролэстеразу, холестеролоксидазу, пероксидазу, 4-Аминоантипирин, холат натрия, дихлорофенолсульфонат.

#### 1. Преципитация

Подготовить и подписать пробирки для опытной, калибровочной и холостой проб. Реагенты прогреть до комнатной температуры. Добавить реагенты и образцы в пробирки по схеме:

	Опытная проба	Калибровочная проба	Холостая проба
Реагент 1, мкл	300	300	300
Сыворотка, мкл	150	-	-
Калибратор, мкл	-	150	-
Дист. вода, мкл	-	-	150

Пробы перемешать и инкубировать в течение 10 мин. при температуре 20-25°C. По окончании инкубации центрифугировать пробы в течение 10 мин. при 4000g или 1-2 мин при 10000g. Прозрачный супернатант использовать для определения концентрации холестерина ЛПВП. Определить холестерин во всех пробах необходимо в течение часа.

#### 2. Определение концентрации холестерина ЛПВП:

Смешать рабочий реагент для определения холестерина и супернатант опытной пробы в соотношении 10:1 и инкубировать не менее 15 минут при t 20-25°C или 10 минут при 37°C. Аналогично обработать супернатанты калибровочной и холостой проб. Измерить оптическую плотность опытной и калибровочной проб против контрольной пробы при длине волны 500 нм (490 – 520 нм).

Окраска растворов стабильна в течение 1 часа после окончания инкубации при хранении проб в защищенном от света месте при комнатной температуре.

Расчет:

Расчет концентрации (С) холестерина ЛПВП в исследуемом материале проводят по формуле:

$$C = \frac{E \text{ пробы}}{E \text{ калибр.}} \times C_{\text{кал}} \text{ (ммоль/л)}$$

где: E пробы – оптическая плотность опытной пробы,  
E калибр. – оптическая плотность калибровочной пробы,  
C<sub>кал</sub>, ммоль/л – концентрация холестерина в калибраторе.

Концентрации HDL-холестерина широко варьируются в зависимости от пола и возраста. Следующие пограничные величины были рекомендованы для идентификации индивидуумов с высоким риском заболеваний коронарных артерий:

Высокий риск – до 0,91 ммоль/л,

Низкий риск – свыше 1,56 ммоль/л.

***Определение холестерина ЛПНП возможно несколькими методами.***

1. Расчетный метод,
2. Прямой метод без осаждения,
3. Метод с осаждением ЛПНП.

***Расчет концентрации холестерина ЛПНП***

Исходя из уровня общего холестерина, триглицеридов и ЛПВП можно рассчитать ЛПНП по формуле:

$$\text{ЛПНП} = \text{Холестерин} - \text{ЛПВП} - \text{ТГ}/2,2.$$

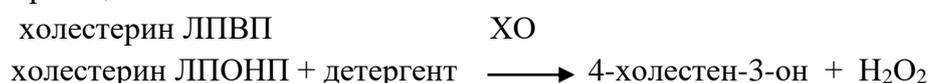
***Определение концентрации холестерина ЛПНП прямым методом без осаждения.***

Принцип метода:

Специфические детергенты реагента 1 приводят к высвобождению холестерина липопroteидов высокой плотности (ЛПВП), липопroteидов очень низкой плотности (ЛПОНП) и хиломикронов (ХМ). Доступный холестерин окисляется холестеролоксидазой (ХО) с образованием перекиси водорода и последующим её расщеплением каталазой.

Добавление реагента 2 приводит к инактивации каталазы и выходу холестерина ЛПНП в реакционную смесь. Дальнейший ряд сопряжённых ферментативных реакций способствует окислительному азосочетанию 4-аминоантипирина (4-ААП) и TOOS (N-Этил-N-(2-гидрокси-3-сульфопропил)-3-метиланилин) с образованием окрашенного соединения (хинониминовый краситель). Интенсивность окраски реакционной среды пропорциональна содержанию холестерина ЛПНП в исследуемом материале и определяется фотометрически при длине волны 600 нм.

I реакция:



холестерин ХМ



II реакция:



В качестве исследуемого материала используют сыворотку, гепаринизированную или ЭДТА-плазму крови без следов гемолиза. Проба стабильна 7 дней при  $t$  2-8°C

Линейность метода – до 15,6 ммоль/л, чувствительность – 0,07 ммоль/л.

Процедура анализа:

Реагент 1 содержит MES буфер, холестеролэстеразу, холестеролоксидазу, 4-аминоантипирин, аскорбат оксидазу, пероксидазу, детергент.

Реагент 2 содержит MES буфер, N’N’-би(4-сульфобутил)-m-толуидин (DSBmT), детергент.

Исследование проводят непосредственно в термостатируемой при 37°C кювете при длине волны 600 нм. Перед проведением анализа необходимо прогреть реагент 1 при температуре 37°C.

Подготовить и подписать пробирки для опытной и калибровочной проб.

Добавить реагенты и образцы в пробирки по схеме:

	Опытная проба	Калибровочная проба
Реагент 1, мл	1,5	1,5
Сыворотка, мкл	20	-
Калибратор, мкл	-	20
Пробы тщательно перемешать и инкубировать точно 5 минут, измерить оптическую плотность $E_1$ опытной и калибровочной проб против дистиллированной воды и добавить:		
Реагент 2, мл	0,5	0,5
Пробы тщательно перемешать и инкубировать 5 минут, измерьте оптическую плотность $E_2$ опытной и калибровочной пробы против дистиллированной воды.		

Расчет:

Концентрацию (С) холестерина ЛПНП определить по формуле:

$$C = \frac{E_2 \text{ пробы} - E_1 \text{ пробы}}{E_2 \text{ калибр} - E_1 \text{ калибр}} \times C \text{ калибр.}$$

где:  $E$  пробы – оптическая плотность опытной пробы,

$E$  калибр. – оптическая плотность калибровочной пробы,

$C_{\text{кал}}$ , ммоль/л – концентрация холестерина ЛПНП в калибраторе.

Рекомендованные значения < 3,37 ммоль/л,

Группа риска 3,37 - 4,12 ммоль/л,

	Опытная проба	Калибровочная проба	Холостая проба
Рабочий реагент, мл	1,0	1,0	1,0
Супернатант опытной пробы, мл	0,1	-	-
Супернатант калибровочной пробы, мл	-	0,1	-
Супернатант холостой пробы., мл	-	-	0,1

Патология  $\geq 4,14$  ммоль/л.

***Определение концентрации холестерина ЛПНП прямым методом с осаждеием.***

***Принцип метода:***

При добавлении к исследуемому образцу гепарина липопротеиды низкой плотности (ЛПНП) преципитируют в своей изоэлектрической точке при pH 5,10. После центрифугирования в супернатанте остается холестерин хиломикронов, липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП) и липопротеидов высокой плотности (ЛПВП). Концентрация холестерина ЛПНП определяется разницей общего холестерина и холестерина супернатанта.

В качестве исследуемого материала используют сыворотку, гепаринизированную или ЭДТА-плазму крови без следов гемолиза. Проба стабильна 7 дней при t 2-8°C

***Процедура анализа:***

1) Осаждение ЛПНП.

Приготовить и подписать пробирки для опытной, калибровочной и холостой проб.

Внести реагенты согласно таблице.

Пробы тщательно перемешать и инкубировать в течение 10 мин при температуре 18-25°C. По окончании инкубации центрифугировать пробы 10 мин при 4000g или 1-2 мин при 10000g. Прозрачный супернатант использовать для определения концентрации холестерина. Его определение необходимо провести в течение часа.

2) Определение концентрации холестерина в супернатанте.

Приготовить рабочий реагент для определения холестерина в пробе.

Внести реагенты согласно таблице.

	Опытная проба	Калибровочная проба	Холостая проба
Осаждающий реагент, мл	1,0	1,0	1,0
Исследуемый образец, мл	0,1	-	-
Калибратор, мл	-	0,1	-
Вода дистилл., мл	-	-	0,1

Реакционную смесь тщательно перемешать и инкубировать не менее 15 минут при комнатной температуре (18-25°C) или 10 минут при температуре 37°C. После окончания инкубации измерить оптическую плотность опытной и калибровочной проб против контрольной (холостой) пробы при длине волны 500 нм (490–540 нм).

Окраска растворов стабильна в течение 1 часа после окончания инкубации при хранении проб в защищенном от света месте при комнатной температуре.

***Расчет:***

Расчет концентрации (С) холестерина ЛПНП в исследуемом образце провести по формуле:

$$C = C \text{ общего холестерина} - \frac{E \text{ пробы}}{E \text{ калибр}} \times C_{\text{калибр}}, \text{ ммоль/л}$$

где: E пробы – оптическая плотность опытной пробы,

E калибр. – оптическая плотность калибровочной пробы,

C<sub>калибр</sub>, ммоль/л – концентрация холестерина в калибраторе.

Интерпретация результатов:

Холестерин ЛПНП	Мужчины	Женщины
Норма	до 3,37 ммоль/л	до 2,85 ммоль/л
Группа риска	3.38-4.12 ммоль/л	2.86-3.34 ммоль/л
Патология	более 4.14 ммоль/л	более 3.37 ммоль/л

**Общий ХС = ХС ЛПНП + ХС ЛПОНП + ХС ЛПВП**

**Расчет ХС ЛПОНП**

$$V \text{ моль/л ХС ЛПОНП} = TG / 2,2$$

**Триглицериды (ТГ)**

- Обнаружена связь гипертриглицеринемии с повышенным риском осложнений ИБС.
- Эта связь может быть обусловлена:
  1. низким уровнем ХС ЛПВП,
  2. наличием высокоатерогенных форм ЛПНП (мелкие плотные частицы).

***Определение концентрации триглицеридов в сыворотке крови энзиматическим колориметрическим методом***

Принцип метода:

Липаза катализирует гидролиз липидов до глицерина и жирных кислот. Глицерин запускает ряд сопряженных ферментативных реакций с участием ферментов глицерокиназы в присутствии АТФ и глицеролфосфатоксидазы. Образующаяся в ходе данных реакций перекись водорода при участии фермента пероксидазы способствует окислительному азосочетанию 4-аминоантипирина и фенола с образованием окрашенного соединения (хинониминный краситель). Интенсивность окраски реакционной среды пропорциональна содержанию триглицеридов в исследуемом материале и определяется фотометрически.



В качестве исследуемого материала используется свежая сыворотка крови, гепаринизированная или ЭДТА-плазма крови без следов гемолиза. Забор крови желательно производить после 12-ти часового голодания. Исследуемый материал может храниться 3 дня при температуре 2 - 8°С.

Линейность метода – 0,25-11,4 ммоль/л, чувствительность – 0,018 ммоль/л.

Процедура анализа:

Подготовить и подписать пробирки для опытной, калибровочной и холостой проб. Внести реагенты согласно таблице.

	Опытная проба	Калибровочная проба	Холостая проба
Рабочий реагент, мл	1,0	1,0	1,0
Сыворотка, мкл	10	-	-
Калибратор, мкл	-	10	-
Вода дистилл., мкл	-	-	10

Реакционную смесь тщательно перемешать и инкубировать не менее 15 минут при комнатной температуре (18-25°C) или 10 минут при температуре 37°C. После окончания инкубации измерить оптическую плотность опытной и калибровочной проб против контрольной (холостой) пробы при длине волны 500 нм (490 – 540 нм).

Окраска растворов стабильна не менее 1 часа после окончания инкубации при хранении проб в защищенном от света месте при комнатной температуре.

Расчет:

Расчет концентрации триглицеридов провести по формуле:

Е пробы

$$C = \frac{E_{\text{пробы}}}{E_{\text{калибр.}}} \times C_{\text{кал}}, \text{ ммоль/л}$$

Е калибр.

где: Е пробы – оптическая плотность исследуемой пробы,

Е калибр. – оптической плотность калибровочной пробы,

С<sub>кал</sub>, ммоль/л – концентрац. триглицеридов в калибраторе.

Нормальные показатели: 0,15 - 1,71 ммоль/л.

Группа риска: 1,71 - 2,29 ммоль/л.

Патологические показатели: >2,29 ммоль/л.

***Апопротеины.***

Апопротеины - это белки оболочки липопротеида, нековалентно связанные с фосфолипидами ихолестерином. Апопротеины поддерживают структурную целостность липопротеидов, участвуют в процессах обмена между липопротеидами и отвечают за взаимодействие липопротеидов с их рецепторами.

Клонированы гены апопротеина AI, апопротеина AII, апопротеина AIV, апопротеина V48, апопротеина V100, апопротеина CI, апопротеина CII, апопротеина CIII, апопротеина D, апопротеина E и апопротеина(a) и выяснены основные функции этих апопротеинов.

Семейство апопротеинов	Индивидуальный апопротеин	Липопротеиды, содержащие данный апопротеин	Функция апопротеина
Апо А	А-I	ХМ, ЛПВП	Активация энзима, эстерифицирующего холестерин (ЛХАТ)
	А-II	ХМ, ЛПВП	Активация печеночной липазы

	A-IV	ХМ, ЛПОВП	Не известна
Апо В	В	ХМ, ЛПОНП, ЛППП, ЛПНП	Образование связи со специфическими рецепторами клетки
Апо С	С-I	ХМ, ЛПОНП, ЛПВП	Активация энзима, эстерифицирующего холестерин (ЛХАТ)
	С-II	ХМ, ЛПОНП, ЛПВП	Активация энзима липопротеидлипазы
	С-III	ХМ, ЛПОНП, ЛПВП	Не известна
Апо D	D	ЛПВП	Участие в переносе эфиров холестерина
Апо E	E-I	ХМ, ЛПОНП, ЛППП	Образование связи со специфическими рецепторами клетки
	E-II	ЛПВП	
	E-III		

Определение апопротеинов в сыворотке крови производится иммуноферментным методом.

### Исследование липидного обмена

#### Правила взятия крови для исследования липидного обмена

1. Кровь для исследования следует брать утром натощак (для определения ТГ и ХС ЛПНП) через 12–14 ч после приема пищи.
2. Перед взятием крови пациент в течение 2 недель должен придерживаться своей обычной диеты.
3. Вечером накануне взятия крови должен быть исключен прием алкоголя: присутствие алкоголя в крови является распространенной причиной выявления гипертриглицеридемии, даже у голодавших пациентов.
4. Если исследования липидов проводятся у больного, перенесшего инфаркт миокарда, то кровь следует брать либо в течение 24 ч после инфаркта, либо по истечении 3 месяцев, поскольку в период выздоровления метаболизм липидов нарушен.
5. Не допускать стаз крови, т.е. не пережимать сосуды дольше 1 мин.
6. Поза пациента при взятии крови должна быть стандартизована.
7. Использовать один тип пробы крови: капиллярную кровь, сыворотку или плазму крови: уровень липидов в плазме примерно на 4% ниже, чем в сыворотке.
8. Отделение сыворотки (плазмы) от форменных элементов крови проводить в первые 3 ч от момента взятия крови.
9. Пробу хранить при температуре 0-4 °С не более 3 суток.
10. В процессе хранения пробы концентрация триглицеридов меняется под действием эндогенных липаз. Концентрация ТГ падает, а содержание свободного глицерина растет; степень этих изменений индивидуальна и не связана с исходным уровнем ТГ.
11. Измерению липидов и ЛПП мешают гемолиз и иктеричность.

Определение липидного профиля проводить не менее 2 раз в разное время (с интервалом 2 недели), учитывать результаты не менее 2-х измерений.

### Интерпретация результатов анализа

Уровень липидов и ЛП	Концентрация липидов и ЛП, ммоль/л				Индекс атерогенности
	ХС	ХС ЛПНП	Х ЛПВП	ТГ	
Желаемый	<5,2	<3,36	>1,0	<2,0	<3,0
Погранично-высокий	5,2-6,5	3,36-4,14	0,9-1,0	2,0-2,5	3,0-4,0
Высокий	>6,5	>4,14	<0,9	>2,5	>4,0

### Целевые уровни содержания липидов в крови согласно Европейским рекомендациям по профилактике ССЗ в клинической практике, 2003 г.

Показатель	Пациенты без ИБС и СД:	Пациенты с ИБС или СД
ХС	< 5 ммоль/л	< 4.5 ммоль/л
ХС ЛПНП	< 3 ммоль/л	< 2.5 ммоль/л

Маркёрами увеличения риска смерти от ССЗ являются также:

- ХС ЛПВП < 1,0 ммоль/л у мужчин и < 1,2 ммоль/л у женщин,
- ТГ > 1.7 ммоль/л

Низкий ХС встречается при анемии, онкологических заболеваниях, гипертиреозе, некрозе клеток печени.

Уровень липидов в сыворотке крови изменяется также при беременности, физической активности, инфекционных заболеваниях, хирургических вмешательствах, инфаркте миокарда, гормональной терапии.

Под **дислипотеинемиями** понимают такие изменения в липидном обмене, которые характеризуются повышением, снижением или полным отсутствием одного или двух классов ЛП.

- Абетапопротеинемия.
- Гипобетапопротеинемия.
- Гиперальфапопротеинемия.
- Анальфапопротеинемия.
- Семейная наследственная недостаточность ЛХАТ (лецитин-холестерин-ацетилтрансфераза).

### Гиперлипотеинемии (ГЛП)

**Гиперлипотеинемия** – основной фактор риска ИБС, характеризующийся повышенным содержанием липидов и ЛП в сыворотке крови.

### Характеристики гиперлипотеинемий

Тип ГЛП	Повышено содержание	Содержание ХС	Содержание ТГ	Атерогенность	Распространенность
I	ХМ	Норма	↑↑↑↑	Не доказана	<1%

IIA	ЛПНП	↑↑	Норма	+++	10%
II	ЛПНП и ЛПОНП	↑↑	↑↑	+++	40%
III	ЛПВП	↑↑	↑↑	+++	<1%
IV	ЛПОНП	Норма или ↑	↑↑	+	45%
V	ЛПОНП и ХМ	↑↑	↑↑↑↑	+	5%

Развитие ГЛП может быть обусловлено наследственной предрасположенностью и факторами среды (первичный ГЛП), а также такими заболеваниями, как сахарный диабет, патология печени, почек, гормональными нарушениями (вторичные ГЛП).

#### Клиническая классификация гиперлиппротеинемий

Первичные гиперлиппротеинемии	Вторичные гиперлиппротеинемии
Полигенные гиперлиппротеинемии	Сахарный диабет
Моногенные гиперлиппротеинемии	Хронический алкоголизм
Семейная гиперхолестеринемия	Гипотиреоз
Семейная комбинированная гиперлипидемия	Обструктивные заболевания печени
Дисбеталипопротеинемия	Нефротический синдром
Семейная эндогенная гиперглициридемия	Применение бета-блокаторов, диуретиков
Семейная хиломикронемия	

#### Диагностика нарушений липидного обмена

Основная цель исследования липидного обмена – выявление нарушений метаболизма липидов как фактора риска сердечно-сосудистых заболеваний. В этой связи исследование липидного спектра необходимо проводить у пациентов, имеющих:

- ИБС с нарушениями мозгового кровообращения и кровотока в крупных артериях;
- семейную предрасположенность к раннему развитию ИБС (у лиц моложе 60 лет);
- другие факторы риска: сахарный диабет, артериальную гипертензию и др.; локальные липидные отложения (ксантомы, ксантелазы, липидные стрии, липидная дуга роговицы) в возрасте до 50 лет;
- в случае липидимической сыворотки крови.

Диагностику нарушений липидного обмена целесообразно проводить в три этапа:

1. Первый этап – определение содержания общего холестерина и триглицеридов. В случае обнаружения гиперхолестеринемии или гипертриглицеридемии следует провести второй этап исследования.

2. Второй этап – определение липидного спектра: ОХС, ТГ, ХС ЛПВП, ХС ЛПНП; электрофорез ЛП; расчет индекса атерогенности (ИА) и уровня ХС ЛПНП, если он не был измерен.

Индекс атерогенности для оценки соотношения атерогенных и антиатерогенных ЛП рассчитывается по формуле:

$$IA = (OXC - XС ЛПВП) / XС ЛПВП$$

Индекс атерогенности является идеальным у новорожденных (не более 1), достигает 2,2–2,5 у здоровых мужчин и женщин в возрасте 25–30 лет и увеличивается на 4–6 единиц у лиц с ИБС.

3. Третий этап – дифференцирование первичной и вторичной ГЛП, которое проводят методом исключения всех заболеваний, для которых характерны вторичные

ГЛП: сахарный диабет, нефротический синдром и иные поражения паренхимы почек, патология печени с явлением холестаза, снижение в крови альбумина, наличие острой или хронической фазы воспалительного процесса и др.

Типирование ГЛП в настоящее время проводят при уровне ХС и ТГ, превышающем 6,2 и 2,3 ммоль/л, соответственно. Комплексное лабораторное исследование позволяет поставить диагноз первичной ГЛП и далее заниматься выяснением конкретных механизмов нарушения метаболизма липопротеинов с целью их коррекции.

*Следствием нарушения липидного обмена являются сердечно-сосудистые заболевания.*

**Атеросклероз** – хроническое прогрессирующее заболевание артерий, характеризующееся пролиферативно-синтетическим ответом ряда клеток сосудистой стенки и крови на патологические липопротеины, с формированием в интиме атером (фиброзно-липидных бляшек). Прогрессирование атером приводит к вовлечению меди и к осложнениям (изъязвление, кальциноз, тромбоз и эмболия, аневризмы, кровотечения).

#### **Главные факторы риска развития атеросклероза:**

- Дислипидемии (как наследственные, так и приобретенные).
- Гипертензия (особенно у лиц старше 50 лет).
- Курение.
- Сахарный диабет (особенно инсулиннезависимый тип).
- Принадлежность к мужскому полу (кроме возрастных групп после 75 лет).

#### **«Мягкие» факторы риска развития атеросклероза:**

- Ожирение (особенно абдоминального типа).
- Гиподинамия.
- Хронический стресс.
- Соревновательно-стрессорный тип жизнедеятельности.
- Гиперурикемия.
- Гипергомоцистеинемия и фолатиновый гиповитаминоз.
- Гипервитаминоз Д.
- Использование пероральных противозачаточных средств.

#### **Основные теории атеросклероза**

- Тромбогенная (Рокитанский, 1852; Дьюгид Ж.Б., 1949).
- Паренхиматозного воспаления (Вирхов, 1856).
- Артериомаляции (Тома, 1883).
- Инфильтрационно-комбинационная (Аничков Н.Н., Халатов С.С., 1946).
- Протеиновая (Игнатовский, 1908).
- Повреждения эндотелия (Росс, 1976).
- Опухолевая (Бендигт, 1973, 1988).
- Инфекционная (Фабрикант К.Г., 1985).
- Нарушения активного транспорта и дефицита в клетках полинасыщенных жирных кислот (ПНЖК) (Титов В.Н., 1995).

При дефиците полиеновых жирных кислот, главным образом  $\Omega$ -3 жирных кислот доминируют 2 процесса:

- изменение структуры и свойств мембран клеток и химической структуры биологически активных эйкозаноидов;

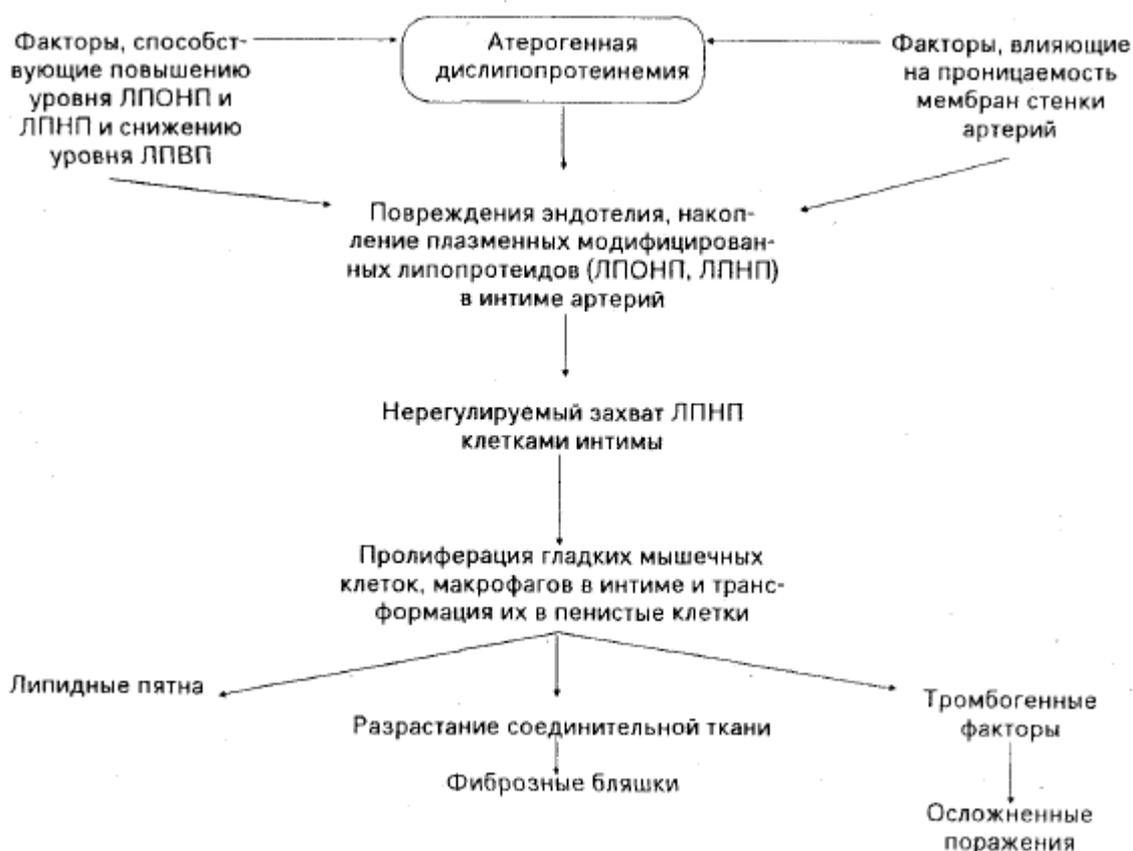
- патологическая компенсация, направленная на создание афизиологического активного транспорта в клетки полиеновых жирных кислот.

Некроз мезенхимальных клеток запускает синдром воспаления.

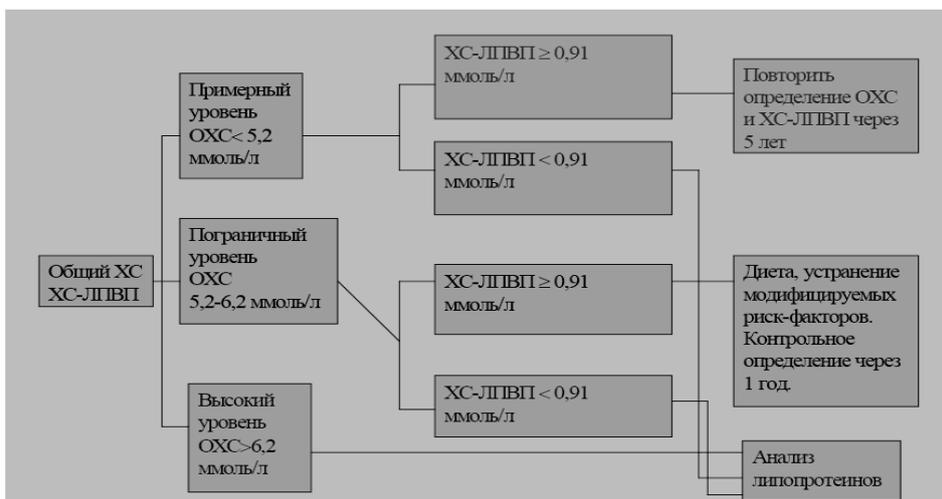
Этапы формирования синдрома патологической компенсации:

1. Образование неоантигена (формирование модифицированных ЛПНП).
2. Активация клеточной и гуморальной звеньев иммунной системы.
3. Синдром воспаления.

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются основной причиной смертности во всем мире. Диагностика возникновения и мониторинг лечения ССЗ занимает важное место в клинической лабораторной диагностике. Особое внимание уделяется экспресс-диагностике таких заболеваний как инфаркт миокарда.



### Алгоритм оценки риска ИБС



**Ишемическая болезнь сердца (ИБС)** – это поражение миокарда, вызванное нарушением кровотока в коронарных артериях, ведущее к коронарной недостаточности и проявляющееся в виде стенокардии, дистрофии, некрозов (инфарктов), склероза миокарда, а также их последствий и осложнений, в том числе внезапной смерти..

### **Факторы риска ИБС:**

#### Биологические детерминанты или факторы:

- пожилой возраст;
- мужской пол;
- генетические факторы, способствующие возникновению дислипидемии, гипертензии, толерантности к глюкозе, сахарному диабету и ожирению.

#### Анатомические, физиологические и метаболические (биохимические) особенности:

- дислипидемия;
- артериальная гипертензия;
- ожирение и характер распределения жира в организме;
- сахарный диабет.

#### Поведенческие (бихевиоральные) факторы, которые могут привести к обострению ИБС:

- пищевые привычки;
- ожирение, как фактор развития ИБС;
- курение;
- недостаточная двигательная активность, или физические нагрузки, превышающие адаптационные возможности организма;
- потребление алкоголя.

Нарушение баланса между реальным кровоснабжением миокарда и потребностями его в кровоснабжении может произойти из-за следующих обстоятельств:

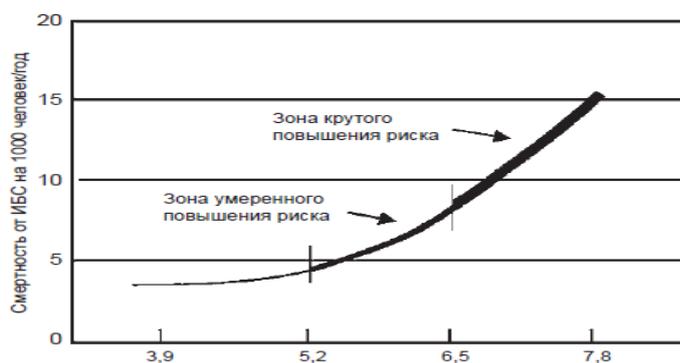
#### Внутрисосудистые причины:

- атеросклеротическое сужения просвета венечных артерий;
- тромбоз и тромбоэмболия венечных артерий;
- спазм венечных артерий.

#### Внесосудистые причины:

- тахикардия;

- гипертрофия миокарда;
- артериальная гипертензия.



Смертность от ИБС в зависимости от уровня ХС сыворотки крови по данным эпидемиологических исследований с использованием мультифакторного анализа.

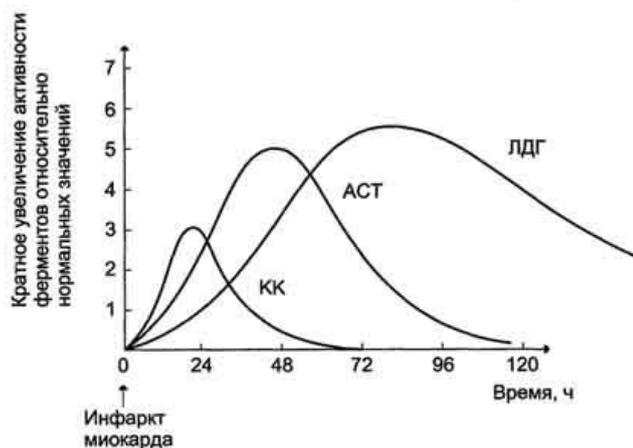
Диагноз острого инфаркта миокарда (ОИМ), согласно рекомендациям ВОЗ, основывается на трех базисных постулатах:

- 1) клинической картине,
- 2) данных ЭКГ-исследований,
- 3) выявлении гиперферментемии (повышенной концентрации миокардиальных маркеров).

Диагноз ОИМ считается достоверным в случае, если два из трех названных диагностических критериев являются бесспорными и однозначно трактуемыми.

Развитие ишемии миокарда приводит к угнетению процессов окислительного фосфорилирования, активации гликолиза и гликогенолиза и ухудшению усвоения глюкозы неповрежденными отделами сердца.

В результате дефектов, возникающих в цитоплазматических мембранах миокардиоцитов, белки и ферменты, локализующиеся в цитоплазме, поступают в кровь больного ИМ со скоростью, зависящей в первую очередь от размера молекул. Изменение концентрации белков миокарда в сыворотке крови зависит также от скорости их элиминации из кровотока. Небольшие молекулы, например миоглобин, выводятся очень быстро, а большие, такие как лактатдегидрогеназа (ЛДГ), медленно. Поэтому содержание каждого белка при ОИМ имеет свою кинетику. Практическое применение методов определения общей креатинкиназы (КК), ЛДГ (включая изоформы), аспаратаминотрансферазы (АСТ) в качестве маркеров ИМ в настоящее время не рекомендуется вследствие их низкой специфичности.

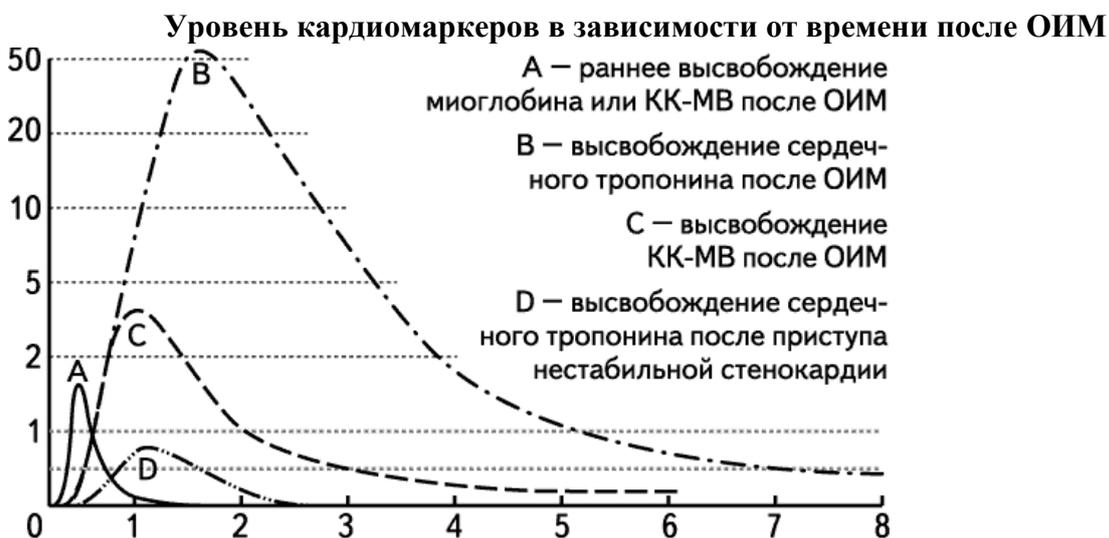


Аналогична ситуация с диагностикой нестабильной стенокардии. В последние годы в клинике все более широко используется определение в сыворотке (плазме) компонентов тропонинового комплекса миокардиоцитов – тропонинов I и T, отвечающих критериям абсолютной миокардиальной специфичности при высокой диагностической чувствительности.

### Чувствительность и специфичность маркеров ОИМ

Маркер	Чувствительность			Специфичность
	3 ч	6 ч	12 ч	
Миоглобин	69 (48-86)	100 (87-100)	100 (87-100)	46 (33-60)
Тропонин I	54 (33-73)	81 (61-93)	100 (87-100)	90 (80-96)
Тропонин T	51 (26-70)	78 (58-89)	100 (82-96)	89 (78-95)
КК-МВ	46 (27-67)	88 (70-97)	100 (87-100)	78 (66-88)

Представлены средние показатели с указанием диапазонов отклонений от средних значений в пределах 95% доверительных интервалов (Eur. J. Cardiol. 1998; 19)



### Современные требования к маркеру некроза миокарда

Идеальный биохимический маркер должен обладать наивысшей специфичностью и чувствительностью в отношении некроза миокарда, в течение короткого времени после начала симптомов ИМ достигать в крови диагностически значимого уровня, этот уровень должен сохраняться в течение многих дней. В настоящее время маркера, полностью отвечающего всем этим требованиям, не существует, поэтому для диагностики ИМ рекомендуется параллельно использовать два маркера – "ранний" и "поздний". Содержание "раннего" маркера при ОИМ диагностически значимо повышается в крови в первые часы заболевания, "поздний" – достигает диагностически значимого уровня только через 6-9 ч, но обладает высокой специфичностью в отношении некроза миокарда.

### Маркеры ОИМ

#### *Креатинкиназа*

Общая КК состоит из 3 изоферментов: ММ (мышечная), ВВ (мозговая), МВ. КК-МВ – димер, состоящий из двух субъединиц: М (мышечная) и В (мозговая).

Повышение уровня КК-МВ в крови может свидетельствовать о таких патологиях, как:

- Инфаркт миокарда.
- Операции, диагностические нехирургические манипуляции на сердце.
- Радиотерапия грудной области.
- Миокардиты и миокардиодистрофии различного генеза.
- Повреждение скелетной мускулатуры.
- Физический стресс и травмы мышц, дегенеративные и воспалительные повреждения, токсические поражения мышц.

Принцип метода:

Креатинкиназа катализирует реакцию образования АТФ в присутствии креатинфосфата и АДФ. Гексокиназа при наличии АТФ катализирует реакцию фосфорилирования глюкозы с образованием глюкозо-6-фосфата. При наличии глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы реакция дегидрирования глюкозо-6-фосфата сопровождается образованием НАДФН. Скорость синтеза НАДФН, сопровождающаяся повышением оптической плотности образца, прямо пропорциональна активности креатинкиназы и измеряется фотометрически при длине волны 340 нм.



Материалом для исследования служит негемолизованная сыворотка крови. Креатинкиназа стабильна в сыворотке 24 часа при температуре +25°C или 7 дней при температуре +4°C.

Набор обеспечивает линейную область определения активности креатинкиназы в диапазоне от 20 Е/л до 1000 Е/л. Чувствительность – не более 15 Е/л.

Нормальные величины активности креатинкиназы в сыворотке крови у женщин составляют 24 - 170 Е/л, у мужчин – 24-195 Е/л. Рекомендуется в каждой лаборатории уточнить диапазон значений нормальных величин для обследуемого контингента людей.

Процедура анализа:

Рабочий реагент содержит содержащий имидазол, креатинфосфат, глюкозу, N-ацетилцистеин, ацетат магния, АДФ, НАДФ, АМФ, пентофосфат диаденозина, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, гексокиназу, азид натрия.

Перед проведением анализа рабочий реагент следует нагреть до температуры +37°C в течение 10 минут.

Подготовить и подписать пробирку для проведения анализа. Внести реагенты, согласно таблице.

Отмерить, мкл	Опытная проба
Сыворотка крови	40
Рабочий реагент	1000

Пробу перемешать и инкубировать в кювете с длиной оптического пути 10 мм при температуре +37°C в течение 1 минуты. Измерить оптическую плотность пробы (E<sub>1</sub>) при

температуре +37°C при длине волны 340 нм против воздуха, включить секундомер и через 1 минуту (точно!) аналогично измерить оптическую плотность пробы ( $E_2$ ). Рассчитать изменение оптической плотности пробы в минуту:  $\Delta E/\text{мин} = E_2 - E_1$ .

Расчет:

Активность креатинкиназы в сыворотке крови (в Е/л) определить по формуле:

$$A = \Delta E/\text{мин} \times 4127,$$

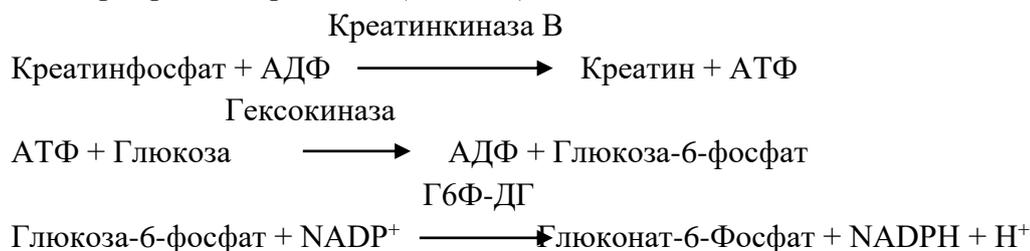
где: А — активность креатинкиназы, Е/л;

$\Delta E/\text{мин}$  — изменение оптической плотности пробы за одну минуту;

4127 — фактор пересчета для выражения активности креатинкиназы в Е/л.

**Креатинкиназа МВ**

Специфические антитела подавляют две М субъединицы СК-ММ (СК-3) и одиночную М субъединицу СК-МВ (СК-2) и таким образом, позволяют определить В субъединицу СК-МВ (в отсутствие СК-ВВ или СК-1). Активность В-СК соответствует половине активности СК-МВ, и определяется по скорости образования NADPH, оптическая плотность которого измеряется при 340 нм. В реакции участвуют гексокиназа и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г6Ф-ДГ).



Рабочий реагент содержит все те же компоненты, что и в методике определения общей креатинкиназы, а также моноклональные антитела к М-субъединицам креатинкиназы. Процедура анализа аналогична общей креатинкиназе.

**Миоглобин.**

Миоглобин это кислородосвязывающий гем-содержащий белок, который присутствует в сердечной и скелетных мышцах. В случае повреждения этих мышц, а также в случае острого инфаркта миокарда или мышечной травмы, миоглобин высвобождается в циркулирующую кровь. При инфаркте миокарда миоглобин может быть обнаружен в крови уже через 2–3 часа после появления боли в грудной клетке, достигая патологических значений раньше других сердечных маркеров, таких как креатинкиназа (КФК) или её МВ изофермент (КФК-МВ). Пиковых значений миоглобин достигает через 7–10 часов, возвращаясь к нормальным значениям примерно после 24 часов.

Определение миоглобина представляет собой быстрый и чувствительный лабораторный тест, дополняющий ЭКГ на ранней фазе инфаркта миокарда. Если через 8 ч после появления боли в грудной клетке миоглобин остается в пределах нормальных значений, инфаркт миокарда можно исключить с высокой вероятностью.

При тромболитической терапии, резкое увеличение миоглобина ( $\geq 150$  мг/л/час или относительное увеличение в 4 и более раза в течение 90 мин после начала обработки) является признаком успешной реперфузии.

Увеличенные концентрации миоглобина в крови могут также быть вызваны причинами, не связанными с инфарктом миокарда, такими как мышечная травма, миопатия, тяжелые физические упражнения, почечная недостаточность или рабдомиолиз.

Принцип метода:

Определение концентрации миоглобина методом фиксированного времени путем фотометрического (иммунотурбодиметрического) измерения реакции антиген–антитело между антителами против человеческого миоглобина, иммобилизованными на латексных частицах, и присутствующим в образце миоглобином. Условия реакции: длина волны 580 нм, длина оптического пути 1 см, температура 37°C.

В качестве материала для исследования используется сыворотка крови или плазма с ЭДТА.

Диапазон измерения от 5 до 600 мкг/л. Если значение превосходит верхнюю границу диапазона, необходимо развести образец изотоническим раствором NaCl (0,9%) в соотношении 1 + 2 и полученный результат умножить на 3.

Свободный и связанный билирубин до 60 мг/дл, гемоглобин до 1000 мг/дл и липемия до 1000 мг/дл триглицеридов и ревматоидный фактор до 500 МЕ/мл не влияют на точность анализа.

Нижний предел определения миоглобина (чувствительность теста) - 5 мкг/л.

Процедура анализа:

Реагент содержит глициновый буфер и латексные частицы, покрытые антителами к миоглобину.

Подготовить и подписать пробирки для опытной, калибровочной и холостой проб. Внести реагенты согласно таблице.

	Опытная проба	Калибровочная проба	Холостая проба
Реагент, мкл	800	800	800
Сыворотка, мкл	20	-	-
Калибратор, мкл	-	20	-
Дист. вода, мкл	-	-	20

Перемешать, измерить оптическую плотность (A1) в течение 30 с. Инкубировать еще 5 мин и опять измерить оптическую плотность (A2).  $\square A = [(A2 - A1)образца/калибратора] - [(A2 - A1)холостой пробы]$ .

Расчет:

Концентрация миоглобина в исследуемом образце определяется по калибровочной кривой с использованием подходящей математической модели, такой как logit/log. Калибровочная кривая строится по четырем калибраторам различных уровней и изотоническому раствору NaCl (0,9%) для определения нулевого значения.

В норме концентрация миоглобина в сыворотке не должна превышать 70 мкг/л.

***Тропонин.***

Тропоновый комплекс состоит из трех субъединиц: тропонин Т (TnT), тропонин С (TnC) и тропонин I (TnI). Каждая из трех субъединиц имеет свою определенную функцию: тропонин С связывает ионы кальция Ca<sup>2+</sup>, тропонин Т связывает тропомиозин, а тропонин I выступает в роли субъединицы-ингибитора. Тропоновый комплекс вместе с тропомиозином участвуют в регулировании Ca<sup>2+</sup>-чувствительной АТФ-азной активности актомиозина в поперечно-полосатой мышечной ткани (скелетной и

сердечной). Тропонин С сердечной мышцы идентичен тропонину С скелетной мышцы, а сердечные изоформы тропонинов Т и I отличаются от скелетных изоформ, что делает возможным продукцию кардиоспецифических антител. Последние исследования показали целесообразность определения сывороточных уровней различных изоформ тропонина I. Определение сTnI в сыворотке предназначено для выявления повреждения мышечной ткани миокарда у пациентов с острым инфарктом миокарда (ОИМ). В ряде клинических исследованиях продемонстрирована диагностическая значимость определения сывороточной концентрации сTnI при выявлении пациентов с ОИМ. Было исследовано временное соотношение выброса в кровотоки сTnI по сравнению с установленными кардиомаркерами, такими как креатинкиназа-МВ, миоглобин и тропонин Т. В совокупных данных нескольких отчетов отражено, что у пациентов с ОИМ, выброс сTnI в кровотоки в количествах, превышающих верхний предел нормальных значений, происходит через 4-6 часов после первых симптомов и достигает пика через 12-24 часа. Ранний выброс сTnI схож с выбросом креатинкиназы-МВ, однако, уровень СК-МВ возвращается к нормальным значениям через 72 часа, в то время как сTnI остается повышенным в течение 5-7 дней. Выброс сTnI в кровотоки подтвержден при клинических состояниях с повреждением миокарда, отличных от ОИМ, таких как нестабильная стенокардия, острая сердечная недостаточность или ишемическое повреждение после аорто-коронарного шунтирования.

### ***Качественное определение тропонина I.***

#### ***Принцип метода***

Тестовое устройство включает мембранный стрип, на который нанесены 2 полосы: поликлональные антитела козы к тропонину I (тестовая полоса "Т") и антитела козы к иммуноглобулинам G мыши (контрольная полоса "С"). До внесения образца обе линии в окне результатов не видны. Контрольная линия "С" используется в качестве контроля правильности проведения анализа. Она должна проявляться всегда, если процедура выполнена правильно и если реагенты контрольной линии находятся в рабочем состоянии и пригодны для анализа. При добавлении образца в окно для образцов, тропонин I реагирует с конъюгатом моноклональных антител мыши к тропонину I и коллоидного золота, образуя комплекс «антиген-антитело». Этот комплекс в процессе реакции мигрирует вдоль стрипа до тестовой зоны (окно кассеты Т), где связывается с поликлональными антителами козы к тропонину I, сорбированными на тестовой полосе, и формирует видимую глазом окрашенную полосу. Если в образце содержится достаточное количество тропонина I, то тестовая линия "Т" приобретает видимое глазом фиолетовое окрашивание, в противном случае тестовая линия остается неокрашенной.

Методика включает одностадийный иммунохроматографический тест для качественного определения сердечного тропонина I (сTnI) в сыворотке, плазме или цельной крови человека в пунктах неотложной помощи, отделениях интенсивной терапии, у постели больного или в других больничных условиях. Это качественный аналитический тест, и результаты однократного тестирования не могут отслеживать дальнейшие повышения и понижения тропонина I у пациента. Однократное тестирование не рекомендуется для мониторинга состояния пациентов с ОИМ. Результат теста должен интерпретироваться врачом совместно с другими лабораторными и клиническими находками.

#### ***Процедура анализа:***

- 1) Соберите образцы сыворотки, плазмы или цельной крови пациентов.
- 2) Доведите образцы и все компоненты набора до комнатной температуры. Не вскрывайте и не извлекайте тестовое устройство из фольгированной упаковки, если не собираетесь использовать его немедленно.
- 3) Извлеките тестовое устройство из упаковки непосредственно перед анализом. Нанесите на корпус устройства идентификационную метку (имя, номер).
- 4) Наберите 80 мкл образца, а затем внесите его с окно для образца (s) тестового устройства.
- 5) Через 15 минут после начала реакции проведите оценку результата теста. Нельзя учитывать результаты анализа позднее, чем через 15 минут.

Интерпретация результатов:

- 1) В левой части окна результатов должна появиться окрашенная полоса, свидетельствующая о правильности проведения теста. Эта полоса является контрольной (ее расположение обозначено на кассете буквой С).
- 2) В правой части окна результатов может появиться окрашенная полоса, представляющая собой тестовую полосу (обозначена на кассете буквой Т).

Отрицательный результат:

Присутствие только одной контрольной полосы (С) указывает на отрицательный результат.



Положительный результат:

Присутствие двух окрашенных полос: контрольной полосы (С) и тестовой полосы (Т) в окне результатов указывает на положительный результат.



Неправильный результат:

Отсутствие в окне результатов контрольной полосы (С) указывает на неправильный результат. Причиной может быть неправильное выполнение процедуры анализа или непригодность тестового устройства для анализа. Рекомендуется протестировать образец пациента повторно.



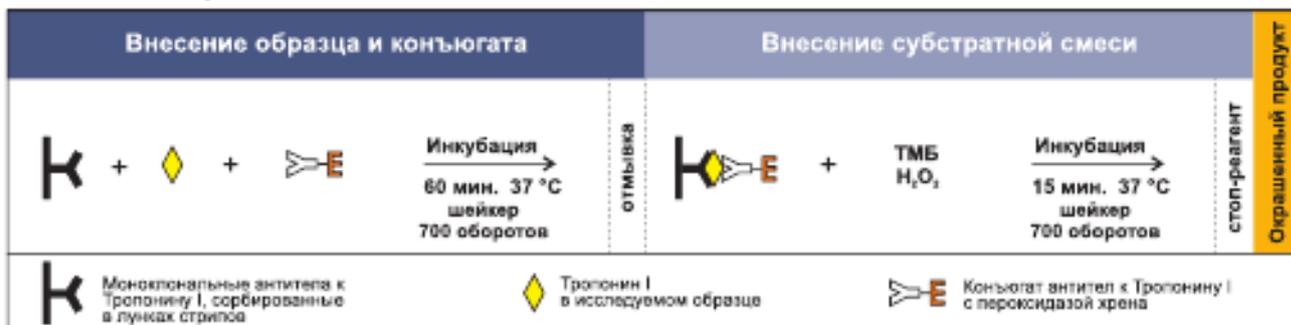
**Количественное определение тропонина I**

Принцип метода:

Твердофазный одностадийный «sandwich»-вариант иммуноферментного анализа на планшетах.

Чувствительность — 0,02 нг / мл. Диапазон измерения — 0–6 нг / мл. Исследуемый образец — 100 мкл сыворотки крови. Общее время инкубации — 1 час 15 минут на шейкере. Учет результатов — спектрофотометрия на длине волны 450 нм или 450+620 нм.

Схема проведения анализа:



**Лактатдегидрогеназа.**

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) – цинксодержащий внутриклеточный фермент, который катализирует окисление молочной кислоты в пируват и содержится практически во всех клетках организма. ЛДГ наиболее активна в скелетной мускулатуре, сердечной мышце, почках, печени и эритроцитах.

Существует пять разных форм (изоферментов) ЛДГ, которые отличаются молекулярной структурой и расположением в организме. От того, какая из пяти преобладает, зависит основной способ окисления глюкозы – аэробный (до CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>O) или анаэробный (до молочной кислоты). Подобное различие обусловлено разной степенью родства того или иного изофермента и пировиноградной кислоты. Для миокарда и мозговой ткани основной является ЛДГ-1, для эритроцитов, тромбоцитов, почечной ткани — ЛДГ-1 и ЛДГ-2. В лёгких, селезёнке, щитовидной и поджелудочной железах, надпочечниках, лимфоцитах преобладает ЛДГ-3. ЛДГ-4 находится во всех тканях с ЛДГ-3, а также в гранулоцитах, плаценте и мужских половых клетках, в которых содержится и ЛДГ-5. Изоферментная активность в скелетных мышцах (в порядке убывания): ЛДГ-5, ЛДГ-4, ЛДГ-3. Для печени наиболее характерен изофермент ЛДГ-5, в меньшей концентрации выявляется ЛДГ-4. В норме в сыворотке крови все фракции фермента определяются в небольшом количестве в составе суммарного показателя – общей ЛДГ. Их активность в крови распределяется следующим образом: ЛДГ-2 > ЛДГ-1 > ЛДГ-3 > ЛДГ-4 > ЛДГ-5.

При заболеваниях, сопровождающихся повреждением тканей и разрушением клеток, концентрация ЛДГ в крови повышается. В связи с этим она является важным маркером тканевой деструкции. Несмотря на то что увеличение количества фермента не указывает на какую-то определённую болезнь, его определение в комплексе с другими лабораторными анализами помогает в диагностике инфаркта лёгкого, мышечной дистрофии и гемолитической анемии. Повышенный уровень ЛДГ может выявляться у новорождённых, беременных и после интенсивных физических нагрузок.

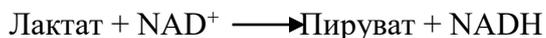
Ранее совместные анализы на ЛДГ, аспаратаминотрансферазу и креатинкиназу широко использовались в диагностике инфаркта миокарда. Сейчас для этой цели определяют уровень тропонина, как более специфического маркера повреждения сердечной мышцы. Но исследование активности ЛДГ остается вспомогательным анализом при дифференциальной диагностике болевого синдрома в грудной клетке. У больных стенокардией уровень фермента не изменяется, но при инфаркте миокарда начинает возрастать через 8-10 часов с максимальной концентрацией

в первые 24-48 часов после сердечного приступа и возвращается к норме через 10-12 дней. Повышение ЛДГ при нормальном уровне АСТ через 1-2 дня после боли в грудной клетке указывает на инфаркт лёгкого.

Принцип метода:

Лактатдегидрогеназа катализирует окисление лактата  $\text{NAD}^+$  с образованием пирувата и  $\text{NADH}$ . Активность ЛДГ определяется по скорости образования  $\text{NADH}$ , измеряемой при 340 нм.

ЛДГ



Исследуемый материал – свежая сыворотка или плазма крови без следов гемолиза.

Активность фермента в сыворотке снижается после 3 дней хранения при  $4^\circ\text{C}$  - на 8%, при  $18 - 25^\circ\text{C}$  - на 2%.

Чувствительность теста: 6.2 Е/л. Предел линейности: 1000 Е/л. Для более высоких значений следует развести образец дистиллированной водой в 2 раза и повторить измерение. Результат умножить на 2.

Процедура анализа:

Рабочий реагент содержит глюкозамин, лактат и  $\text{NAD}^+$ .

Непосредственно в термостатируемой  $37^\circ\text{C}$  кювете фотометра с длиной оптического пути 1 см смешайте рабочий реагент и исследуемый материал в соотношении 100:1. Через 1 минуту измерьте исходную величину экстинкции при длине волны 340 нм против воздуха/воды. Повторите измерения точно через 1, 2 и 3 мин. Вычислите среднее изменение экстинкции за 1 минуту ( $\Delta\text{E}/\text{мин}$ ).

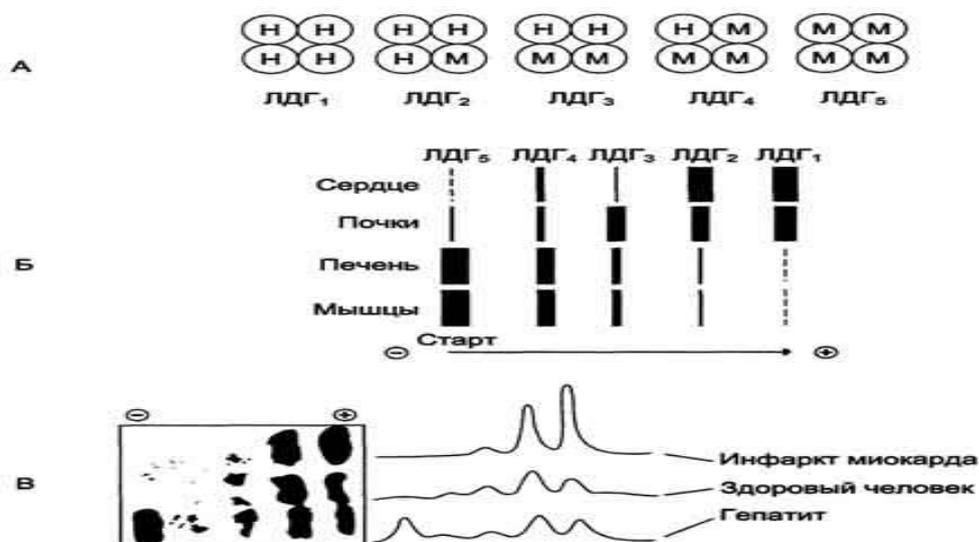
Расчет:

Расчет активности фермента (Е/л) проведите по формуле:

Активность =  $\Phi \times \Delta\text{E} / \text{мин}$

Где  $\Phi$  – фактор пересчета, указанный в инструкции к набору реагентов.

В норме активность ЛДГ не должна превышать 247 Е/л.



Повышение уровня ЛДГ в крови может свидетельствовать о патологиях:

- Сердечно-сосудистые заболевания.

- Заболевания печени.
- Анемии.
- Онкологические заболевания.

*Диагностическая значимость при ИМ:*

При ОИМ уровень возрастает быстро на 2-4 сутки, и нормализуется только на 2 –3 неделе.

**Аланинаминотрансфераза (АлАТ), аспартатаминотрансфераза (АсАТ).**

Аминотрансферазы печени (АлАТ в большей степени), мышц, миокарда.

Уровень аминотрансфераз в крови повышается при повреждении печени и миокарда.

В норме соотношение активностей АСТ/АЛТ (коэффициент де Ритиса) равно  $1,33 \pm 0,42$ . При остром ИМ это соотношение резко повышается.

Повышение АСТ в сыворотке крови наблюдается при ИМ через 6-12 часов от начала заболевания. Максимальное возрастание отмечается на 2-4 сутки, и на 5-7 сутки уровень фермента приходит к норме.

**С-реактивный белок (СРБ).**

Белок острой фазы, синтезируется в печени. Уровень СРБ в крови повышается при повреждении тканей (воспаление, травма). Концентрация СЗБ в сыворотке или плазме возрастает в течение 24-48 ч после острого повреждения тканей, достигает пика в острой стадии и снижается после разрешения воспаления или травмы, базовый уровень СРБ отражает вялотекущее воспаление в интиме сосуда и проспективно определяет риск развития сосудистых осложнений.

**Прочие маркеры:**

- Натрийуретические пептиды (мозговой, предсердный).
- Белок, связывающий жирные кислоты, сердечная форма (H-FABP).
- Гомоцистеин.
- Цитокины.
- Гемостатические факторы.
- Молекулы адгезии.
- Каспазы.
- Липидный спектр.

**Исследования при подозрении на заболевания сердечнососудистой системы**

Заболевания ССС	Обязательные исследования	Дополнительные исследования
Стенокардия	Холестерин, его фракции, триглицериды, индекс атерогенности, фракции липопротеидов, креатинкиназа и ее изоферменты, лактатдегидрогеназа и ее изоферменты, аминотрансферазы, коагулограмма.	Глюкоза, тест толерантности к глюкозе, электролиты (К, Na, Ca, Cl), фосфолипиды, кислотно-основное состояние.
Инфаркт миокарда	Креатинкиназа и ее изоферменты, лактатдегидрогеназа и ее изоферменты, тропонин, аминотрансферазы,	Аполипопротеин А, миоглобин в крови и моче, глюкоза, тест толерантности к глюкозе, электролиты (К, Na, Ca, Cl),

	коагулограмма, белки острой фазы, мочевая кислота, мочевины, холинэстераза.	гликопротеины, сиаловые кислоты, кислотно-основное состояние.
Гипертоническая болезнь	Мочевина, креатинин, мочевая кислота, холестерин и его фракции, индекс атерогенности, холинэстераза, триглицериды, электролиты (K, Na).	Фосфолипиды, ренин, альдостерон, фракции липопротеидов.
Симптоматические гипертонии	При заболеваниях почек: мочевины, проба Реберга, креатинин, ренин, альдостерон.	Адреналин, норадреналин, ванилил-миндальная кислота (в моче).
	При эндокринных заболеваниях: феохромоцитомы – адреналин, норадреналин (в крови и моче), ванилил-миндальная кислота (в моче);	Свободные жирные кислоты, глюкоза (в крови и моче), ренин.
	первичный альдостеронизм – K, Na, альдостерон, ренин;	17-оксикортикостероиды, ангиотензин-I.
	гиперкортицизм – адренокортикотропный гормон.	Глюкоза, тест толерантности к глюкозе, ренин, ангиотензин-I.
Артериальная гипотензия	Гидрокортизон.	
Кардиомиопатия	Креатинкиназа, лактатдегидрогеназа, креатинин, аминотрансферазы.	Альдолаза, сиаловые кислоты.
Атеросклероз	Холестерин и его фракции, триглицериды, индекс атерогенности, фракции липопротеидов.	Фосфолипиды, аполипопротеины А и В, глюкоза, тест толерантности к глюкозе.
Эндомиокардит	Лактатдегидрогеназа, креатинкиназа, сиаловые кислоты, белки острой фазы, профиль протеинограммы.	Электролиты (K, Na, Ca, Cl).

### ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

1. Структура, классификация, функции липидов.
2. Атерогенность липопротеинов, маркеры увеличения смертности от ССЗ.
3. Уровни холестерина (желаемый, погранично-высокий, высокий).
4. Правила взятия крови для проведения исследований липидного обмена.
5. Дислипидемии, характеристика, классификация.
6. Первичные гиперлипидемии.
7. Вторичные гиперлипидемии.
8. Этапы диагностики нарушений липидного обмена.
9. ИБС, атеросклероз, понятия причинно-следственные связи.
10. Теории атеросклероза, механизм развития атеросклероза.
11. Алгоритм оценки риска ИБС.

12. ИБС, понятие, причины, факторы риска.
13. Диагноз инфаркта миокарда, энзимодиагностика, маркеры высокой и низкой специфичности.
14. Креатинкиназа МВ, структура, диагностическая значимость при ОИМ.
15. Миоглобин, структура, диагностическая значимость при ОИМ.
16. Тропонины, структура, диагностическая значимость при ОИМ.
17. Аминотрансферазы, структура, диагностическая значимость при ОИМ.
18. ЛДГ, структура, диагностическая значимость при ОИМ.
19. СРБ, структура, диагностическая значимость при ОИМ
20. Лабораторная диагностика стенокардии.
21. Лабораторная диагностика ГБ.
22. Лабораторная диагностика гипотензии.
23. Лабораторная диагностика миокардита.
24. Лабораторная диагностика атеросклероза.
25. Лабораторная диагностика кардиомиопатий.

### ЗАДАЧИ

1. Рассчитайте концентрацию ЛПНП в сыворотке пациента, опираясь на результаты следующих измерений:

Холестерин общий:  $E_{\text{пробы}} = 318$ ,  $E_{\text{кал}} = 269$ ,  $C_{\text{кал}} = 5.17$  ммоль/л.

Холестерин ЛПВП:  $E_{\text{пробы}} = 304$ ,  $E_{\text{кал}} = 297$ ,  $C_{\text{кал}} = 1,29$  ммоль/л.

Триглицериды:  $E_{\text{пробы}} = 362$ ,  $E_{\text{кал}} = 278$ ,  $C_{\text{кал}} = 2,29$  ммоль/л.

Ваш комментарий.

Ответ: общий холестерин 6,1 ммоль/л, холестерин ЛПВП 1,3 ммоль/л, триглицериды 2,9 ммоль/л, холестерин ЛПНП 3,5.

2. У пациента при биохимическом анализе крови обнаружили резкое повышение активности ЛДГ, АсАТ и АлАТ. Коэффициент де Ритиса равен 3,85. Какое заболевание можно предположить у обследуемого? Активность каких ещё ферментов сыворотки крови будет повышена? Укажите правильные ответы:

А) креатинфосфокиназы и ее изофермента МВ-формы

Б) щелочной фосфатазы

В)  $\gamma$ -глутамилтранспептидазы

Г)  $\alpha$ -гидроксibuтиратдегидрогеназы.

**Тема занятия 14: Клинический и биохимический анализ мочи в диагностике заболеваний почек.**

**Цель занятия:** Знать основные заболевания почек: гломерулонефрит, пиелонефрит, почечная недостаточность, нефротический синдром, нефролитиаз. Иметь понятие о фильтрации, реабсорбции, секреции, физиологических и патологических компонентах мочи, нарушениях диуреза, клиническом и биохимическом анализе мочи.

**Перечень знаний и практических навыков:**

- Знать основные заболевания почек: гломерулонефрит, пиелонефрит, почечная недостаточность, нефротический синдром, нефролитиаз;
- Охарактеризовать понятия о фильтрации, реабсорбции, клиренсе, почечном пороге;
- Изучить нарушения диуреза: полиурия, олигоурия, анурия, никтурия;
- Определить нормальные уровни физиологических компонентов мочи: мочевины, креатинина, креатина, мочевого кислоты;
- Знать патологические компоненты мочи: глюкозурия, протеинурия и ее виды.
- Уметь провести оценку клинического и биохимического анализа мочи при основных заболеваниях почек;
- Оценивать нарушения диуреза;
- Охарактеризовать содержание физиологических компонентов мочи;
- Уметь провести диагностическую оценку патологических компонентов мочи.

Заболевания почек и мочеполовой системы занимают важное место в структуре заболеваемости населения. По данным ВОЗ около 7-10% взрослого населения индустриально развитых стран имеют различную нефрологическую патологию. Среди многочисленных болезней почек широко распространены гломерулонефрит, пиелонефрит, поликистоз, гидронефроз, мочекаменная болезнь. В 2002 году Национальным почечным фондом США предложен термин – «Хроническая болезнь почек», объединяющий различные нозологические формы заболеваний почек. Хроническая болезнь почек – это повреждение почек либо снижение их функции в течение 3 месяцев и более. Существенное влияние на развитие и прогрессирование хронических заболеваний почек в той или иной популяции может оказать целый ряд факторов. К ним относятся распространенность некоторых инфекций, прием некоторых лекарственных препаратов, алкоголь и курение, состояние окружающей среды, климат, характер и традиции питания, генетические особенности популяции и др. Одновременно с этим артериальная гипертензия, сахарный диабет, аутоиммунные заболевания, дислипидемия, ожирение и метаболический синдром являются факторами, ассоциирующимися с развитием дисфункции почек.

Правильная интерпретация результатов лабораторных тестов возможна в случае четкого представления о строении и функции почек, и процессе мочеобразования. Почки представляют собой парный паренхиматозный орган. Основной функциональной единицей почки является нефрон. Группы нефронов дают начало собирательным трубкам, которые открываются наружу в области верхушки почечного сосочка. Сосочек открывается в почечную чашечку, переходящую в почечную лоханку продолжением которой является мочеточник. Нефрон состоит из сосудистого клубочка, его капсулы (капсула Боумена-Шумлянского) и канальцевого аппарата (проксимального канальца, петли Генле, дистального канальца и собирательной трубки). Каждый отдел нефрона имеет высокую структурно-функциональную специализацию (рис. 1).

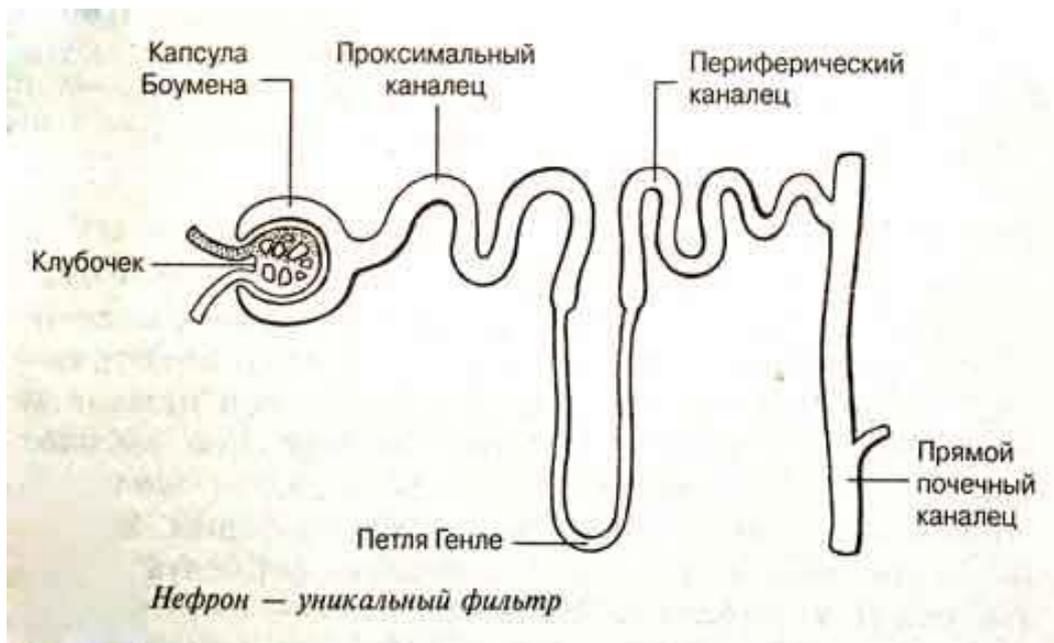


Рис. 1. Строение нефрона.

Клубочковая фильтрация представляет собой пассивный процесс перехода жидкой части плазмы крови из просвета капилляров клубочков в капсулу клубочка через почечный фильтр (эндотелий капилляров, базальная мембрана, эпителий капсулы) (рис.2). При этом вместе с плазмой крови фильтруются низкомолекулярные вещества. Скорость клубочковой фильтрации определяется: 1 – величиной почечного кровотока, 2 – внутриклубочковым гидростатическим давлением и 3 – площадью поверхности фильтрации. Следовательно, при повышении почечного кровотока, увеличении внутриклубочкового давления и при гипертрофии клубочков (увеличении площади поверхности фильтрации) скорость клубочковой фильтрации будет увеличиваться.

В клинической практике скорость клубочковой фильтрации измеряется по методу Реберга-Тареева, основывающемся на определении клиренса эндогенного креатинина. Креатинин продукт метаболизма, в норме экскретируемый почками. Существует несколько вариантов пробы Реберга.

Наиболее распространенные - это суточная и разовая. В суточной пробе Реберга определяется концентрация креатинина в сыворотке крови и в моче, собранной за сутки (24ч). Вычисляется минутный диурез: общее количество мочи за сутки (мл) разделить на 24 (ч) и на 60 (мин). Далее скорость клубочковой фильтрации рассчитывается по формуле: **СКФ = Креатинин мочи (моль/л) x минутный диурез (мл/мин) / Креатинин крови (моль/л)**

Разовая проба Реберга проводится утром до приема жидкости. Пациент опорожняет мочевой пузырь, затем выпивает 0,5л воды и через полчаса сдает кровь. Еще через полчаса собирает всю мочу. Измеряется объем собранной мочи. Вычисляется минутный диурез: количество собранной мочи (мл) разделить на 60 (мин). СКФ вычисляется по ранее приведенной формуле.



Рис. 2. Строение почечного фильтра.

Процесс реабсорбции протекает в проксимальных канальцах, петле Генли и в дистальных канальцах. Реабсорбция представляет собой способность клеток почечных канальцев к обратному всасыванию веществ из просвета канальцев в кровь. В просветах канальцев реабсорбируются все биологически важные органические вещества (глюкоза, аминокислоты, белок, мочевины), а также лактат, бикарбонат неорганический фосфор, хлор, калий, натрий. В петле Генли и дистальных канальцах реабсорбируются неорганические компоненты канальцевой жидкости: калий, натрий, магний, кальций (рис. 3).

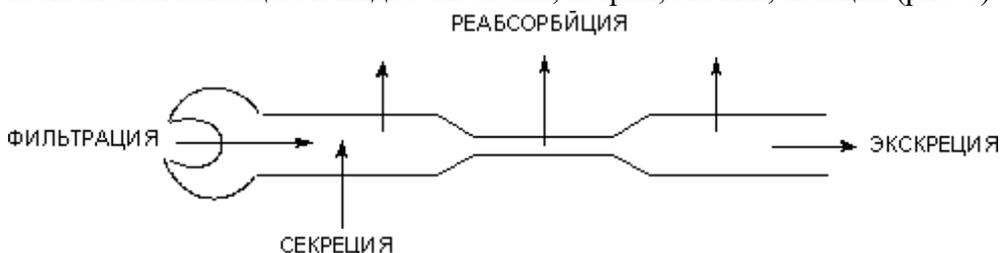


Рис. 3. Процессы, протекающие в нефроне.

Наряду с реабсорбцией в канальцах происходит секреция. Канальцевая секреция характеризуется способностью клеток почечных канальцев переносить из крови в просвет канальцев подлежащие выведению электролиты и различные вещества (органические, чужеродные, образованные в процессе метаболизма и синтезированные в клетках канальцев). В проксимальных канальцах осуществляется секреция органических кислот и оснований, конечных продуктов обмена чужеродных веществ. Секреция может быть пассивной и активной (с затратой энергии). В дистальном канальце осуществляется секреция ионов калия, водорода и аммиака. Способность почек к секреции ионов водорода и аммиака обеспечивает регуляцию кислотно-основного состояния, а способность секреции ионов калия – водно-солевой гомеостаз.

Изменение мочи являются важным признаком поражения почек и мочевыводящих путей, поэтому общий анализ мочи остается традиционным лабораторным исследованием состояния почек. **Общий анализ мочи** включает определение физико-химических свойств

(цвет, прозрачность, реакция, относительная плотность, белок, глюкоза, кетоны, билирубин, уробилиноген) и микроскопию мочи. Физические параметры мочи во многом зависят от особенности диеты, водного режима, приема лекарственных препаратов, возраста и поэтому могут иметь диагностическое значение в совокупности с другими параметрами мочи.

*Изменение цвета мочи* признак, который побудит пациента, обратиться к врачу. Следует помнить, что интенсивность окраски мочи зависит от концентрации урохромов (продуктов пигментного обмена). Прием пищи влияет на оттенки мочи. Свекла придает красный оттенок, а ревеня – зеленый. Прием медикаментов может изменить цвет мочи. Аспирин придает розовый оттенок, амидопирин – красный, фурагин и 5 НОК – желто-коричневый, витамины – выраженную опалесценцию желтым цветом (табл.1).

**Таблица 1**

**Изменение цвета мочи при различных патологических состояниях**

Цвет мочи	Патологические состояния	Причина
Темно-желтый	Застойная почка, отеки, ожоги, понос, рвота	Повышенная концентрация красящих веществ
Бледный	Сахарный и несахарный диабет, ренальная глюкозурия, почечная недостаточность	Малая концентрация красящих веществ
Темно-бурый	Гемолитическая анемия	Уробилиногенурия
Темный (черный)	Острая гемолитическая почка, алкаптонурия, меланосаркома	Гемоглобинурия, меланин
Красный	Нефролитиаз, инфаркт почки, свинцовая анемия	Гематурия, уропорфирурия
Вид «мясных помоев»	Острый и обострение хронического гломерулонефрита	Гематурия
Цвет пива, зеленовато-бурый	Паренхиматозная желтуха	Билирубиноурия, уробилиногенурия
Зеленовато-желтый, коричневый	Механическая желтуха	Билирубиноурия
Беловатый	Жировое перерождение	Липурия, гной, кристаллы фосфатов
Молочный	Лимфостаз почек	Хилурия

Изменение цвета мочи часто зависит от наличия солей. Так мочева кислота придает моче насыщенно-желтый цвет, ураты – кирпично-красный, фосфаты формируют белый осадок.

*Прозрачность мочи.* Моча в норме прозрачна. Мутность может быть вызвана бактериями, эритроцитами, клеточными элементами, солями, жиром, слизью. Причины помутнения, как правило, устанавливаются с помощью простых методик:

- при нагревании или добавлении щёлочи исчезает мутность, вызванная **уратами**
- при добавлении уксусной кислоты исчезает мутность, обусловленная выпадением **фосфатов**
- при добавлении соляной — **оксалатов**. Если мутность исчезает при добавлении спирта или эфира, это может указывать на присутствие в моче жира.

- муность, связанная с наличием гноя, не исчезает ни от нагревания, ни от добавления кислот, а добавление щёлочи вызывает образование густой стекловидной массы.

Более точно причины помутнения позволяет установить микроскопическое исследование мочевого осадка.

*Количество мочи* зависит от водного режима. Здоровые взрослые люди в течение суток выделяют с мочой от 0,6 до 2,0 л жидкости. При этом отношение дневного объема выводимой мочи к ночному соответствует 3–4:1. Увеличение ночного диуреза называется никтурия. Наблюдается при гипертрофии простаты, диабетенарушении сердечно-сосудистой системы, тяжелые поражения почек. Состояние, при котором суточный объем (диурез) мочи превышает 2 л, называется полиурией. Отмечается при обильном питье, сахарном и несахарном диабете, при нефросклерозе, эндокринных нарушениях мочеобразования.

При выделении за сутки менее 500 мл мочи констатируют олигурию. Олигурия подразделяется на преренальную, ренальную и постренальную. Преренальная олигурия обусловлена недостаточностью кровенаполнения почек (уменьшение объема циркулирующей крови, падение тонуса сосудов, кровотечение, стеноз почечных сосудов). Почечная олигурия обусловлена нарушением фильтрации мочи, вследствие воспалительных изменений в клубочках почек (гломерулонефрит, вирусные и бактериальные инфекции, тубулоинтерстициальный некроз). Постренальная олигурия связана с обтурацией мочевыделительной системы камнем, кровяным сгустком, опухолью.

Полное прекращение выделения мочи называется анурией (физиологическая у новорожденных в течение первых часов жизни). Наблюдается при тяжелом поражении почек, острой почечной недостаточности, прогрессирующем перитоните, отравлениях.

Дизурия расстройство мочеиспускания, может быть поллакиурия – частое мочеиспускание, оллакиурия – редкое мочеиспускание и энурез – недержание мочи.

*Относительная плотность* мочи зависит от концентрационной способности почек. Кроме того, плотность мочи зависит от глюкозурии и протеинурии. Диапазон относительной плотности в течение суток должен быть от 1,003 до 1,028. Причину нарушений концентрационной функции почек лучше анализировать в динамическом наблюдении. Для этого используется проба Зимницкого. Суть пробы Зимницкого заключается в измерении относительной плотности мочи в 8-ми отдельных порциях, собранных в течение суток через каждые три часа (6-9, 9-12, 12-15, 15-18, 18-21, 21-00, 00-3 и 3-6 часов). Чем больше разница между максимальным и минимальным значением относительной плотности, тем выше функциональная способность почек. В норме она должна быть не менее 0,007. В первую очередь эта проба более чувствительна к выявлению патологии канальцев. Гипостенурия – нарушение процесса концентрирования первичного ультрафильтрата при сохранении разведения мочи.

Гиперстенурия – повышение относительной плотности мочи.

Изостенурия – постоянная величина относительной плотности мочи в течение суток.

*Реакция мочи* в норме является показателем характера питания. При смешанном питании характерно преобладание кислых продуктов в пище, поэтому рН мочи 5,5–6,5. Для вегетарианцев характерна нейтральная или щелочная реакция. При смешанном питании щелочная моча может быть признаком инфицирования мочевых путей, поскольку микрофлора

преобразует мочевины (компонент мочи) в аммоний, защелачивая мочу. В клинической практике определение рН важно в связи с тем, что одни препараты, используемые в нефрологии, эффективно действуют в кислой среде, другие – в щелочной среде.

*Глюкозурия* расценивается как явление патологическое. Глюкоза свободно фильтруется почечными клубочками и в норме полностью реабсорбируется клетками проксимальных канальцев. Перенос глюкозы из просвета канальца через мембрану щеточной каемки происходит с помощью переносчика. Максимальное количество молекул глюкозы, реабсорбируемых из канальцевой жидкости в кровь, зависит от числа переносчиков глюкозы. Если количество реабсорбируемой глюкозы превышает возможности переносчиков, то глюкоза появляется в моче. Максимальная концентрация глюкозы в крови, при которой не наблюдается глюкозурии, называется почечным порогом. В норме почечный порог составляет 10 ммоль/л глюкозы в крови. С возрастом почечный порог для глюкозы повышается. Количество переносчиков глюкозы снижается при хронических заболеваниях почек, при гипертонической болезни, при диабетической нефропатии. Это означает, что при этих заболеваниях глюкозурия может появляться при концентрации глюкозы в крови менее пороговой (<10 ммоль/л).

*Кетонурия* – содержание в моче кетоновых тел. Кетонурия не является непосредственным признаком поражения почек.

Кетоновые тела – это общее понятие для трех продуктов обмена веществ, которые образуются в печени: ацетон, ацетоуксусная и бета-оксимасляная кислота.

В норме кетоновые тела в общем анализе мочи отсутствуют. Хотя на самом деле за сутки с мочой выделяется незначительное количество кетоновых тел. Такие концентрации не могут быть определены обычными методами, используемыми в лабораториях, поэтому принято считать, что в норме в моче кетоновых тел нет.

Кетоновые тела обнаруживаются в общем анализе мочи при нарушении обмена углеводов и жиров, которое сопровождается увеличением количества кетоновых тел в тканях в крови (кетонемия).

В нормальных условиях организм черпает энергию в основном из глюкозы. Глюкоза накапливается в организме, в первую очередь в печени, в виде гликогена. Гликоген образует энергетический резерв, который может быть быстро мобилизован при необходимости компенсировать внезапный недостаток глюкозы. При дефиците глюкозы в организме гликоген под воздействием ферментов расщепляется до глюкозы, которая поступает в кровь. При физических и эмоциональных нагрузках, при болезнях с повышенной температурой и других повышенных затратах энергии запасы гликогена исчерпываются, организм начинает получать энергию из запасов жира. При распаде жира образуются кетоновые тела, которые выводятся с мочой.

По сравнению со взрослыми, у детей запасы гликогена намного меньше, использование жиров начинается раньше, и как результат, при анализе мочи обнаруживается кетонурия. У новорожденных повышение кетоновых тел в моче почти всегда вызывается недокормленностью. Если с кетоновыми телами в общем анализе мочи обнаруживается глюкоза, то это верный признак сахарного диабета.

Также кетоновые тела в общем анализе мочи появляются в следствие обезвоживания организма. Они обнаруживаются в моче при резком похудении, лихорадочных состояниях, голодании, тяжелых отравлениях с сильной рвотой и поносом. Кетоновые тела в моче при беременности могут свидетельствовать о наличии раннего

токсикоза. Уровень кетоновых тел в моче выражается в ммоль/л или обозначается плюсами. Количество плюсов определяет уровень содержания кетоновых тел:

- (+) – слабopоложительная реакция;
- (++) и (+++) – положительная;
- (++++) – резко положительная.

*Протеинурия* (обнаружение белка в моче) является важным и практически значимым симптомом поражения почек и мочевыводящих путей. Проникновение белка через почечный фильтр в просвет канальцев почек зависит от состояния базальной мембраны капсулы клубочка, формы и размеров белковой молекулы, количества белка в плазме. В норме через почечный фильтр проходят белки с молекулярной массой до 70 кД (альбумин, легкие цепи иммуноглобулинов, многие ферменты). В норме концентрация белка в разовой порции мочи не должна превышать 0,033 г/л. В суточной моче допускается до 0,15 г/сутки. В моче здоровых людей обнаружено более двухсот белков, имеющих различное происхождение. Одни фильтруются из плазмы крови, другие имеют почечное происхождение или секретируются эпителием мочевого тракта.

Протеинурия может быть функциональной и органической. Функциональная протеинурия связана с гемодинамическим стрессом и может наблюдаться на фоне лихорадки, эмоциональном стрессе, после физической нагрузки или охлаждения. Увеличение экскреции белка с мочой при смене положения тела (из горизонтального в вертикальное), наблюдаемое чаще у подростков, называется ортостатической протеинурией.

Органическая (патологическая) протеинурия может быть

- Преренальной
- Ренальной
- Постренальной.

Преренальная (перегрузочная) не связана с поражением почек. Она возникает в результате заболеваний, сопровождающихся повышенным синтезом низкомолекулярных белков (миеломная болезнь).

Ренальная протеинурия обусловлена поражением клубочков и канальцев почек. При этом страдает процесс фильтрации (гломерулярный тип протеинурии) или нарушается реабсорбция белков в проксимальных канальцах (тубулярный тип протеинурии). При повреждении клубочкового барьера (гломерулярный тип протеинурии) выделяют высокоселективную, селективную и неселективную протеинурию. При высокоселективном типе в моче обнаруживаются низкомолекулярные белки до 70 кД (альбумины). При селективной протеинурии в моче выявляют белки до 150 кД. При неселективной протеинурии в моче обнаруживаются белки с высокой молекулярной массой 830-930 кД (иммуноглобулины).

Постренальная протеинурия обусловлена попаданием воспалительного экссудата, богатого белком, в мочу (цистит, простатит).

Корректное количественное определение белка в моче в ряде случаев оказывается непростой задачей. Трудности ее решения определяются следующим рядом факторов:

- низким содержанием белка в моче здорового человека, часто находящимся на пороге чувствительности большинства известных методов;

- присутствием в моче множества соединений, способных влиять на ход химических реакций;
- значительными колебаниями содержания и состава белков мочи при различных заболеваниях, затрудняющими выбор адекватного калибровочного материала.

Количественные методы определения белка в моче можно разделить на турбидиметрические и колориметрические.

### ***Турбидиметрические методы***

К турбидиметрическим методам относятся:

- определение белка с сульфосалициловой кислотой (ССК),
- определение белка с трихлоруксусной кислотой (ТХУ),
- определение белка с бензетоний хлоридом.

Турбидиметрические методы основаны на снижении растворимости белков мочи вследствие образования суспензии взвешенных частиц под воздействием преципитирующих агентов. О содержании белка в исследуемой пробе судят либо по интенсивности светорассеяния, определяемого числом светорассеивающих частиц (нефелометрический метод анализа), либо по ослаблению светового потока образовавшейся суспензией (турбидиметрический метод анализа).

Величина светорассеяния в преципитационных методах обнаружения белка в моче зависит от множества факторов: скорости смешивания реактивов, температуры реакционной смеси, значения рН среды, присутствия посторонних соединений, способов фотометрии. Тщательное соблюдение условий реакции способствует образованию стабильной суспензии с постоянным размером взвешенных частиц и получению относительно воспроизводимых результатов.

Некоторые лекарственные препараты влияют на результаты турбидиметрических методов определения белка в моче, приводя к так называемым «ложноположительным», либо «ложноотрицательным» результатам. К ним относятся некоторые антибиотики (бензилпенициллин, клоксациллин и др.), рентгеноконтрастирующие йодсодержащие вещества, сульфаниламидные препараты.

Турбидиметрические методы плохо поддаются стандартизации, часто приводят к получению ошибочных результатов, но, несмотря на это, в настоящее время они широко используются в лабораториях из-за невысокой стоимости и доступности реактивов. Наиболее широко в России используется метод определения белка с сульфосалициловой кислотой.

### ***Метод с сульфосалициловой кислотой***

#### ***Принцип метода***

Интенсивность помутнения при коагуляции белка сульфосалициловой кислотой, измеренная по оптической плотности при 620 нм, пропорциональна его концентрации.

Линейная зависимость сохраняется до концентрации белка 1 г/л. При более высоких концентрациях пробу следует развести в 2–3 раза, результат умножить на разведение. Результаты, получаемые данным методом чувствительны к изменениям температуры. Рекомендуется производить измерения при температуре +18–22° С.

Ложноположительные результаты могут быть получены при наличии в моче контрастных веществ, содержащих органический йод. Поэтому тест нельзя использовать у лиц, принимающих препараты йода. Ложноположительный тест может быть также обусловлен приемом сульфаниламидных препаратов, больших доз пенициллина и при

высоких концентрациях в моче мочевой кислоты.

#### Процедура анализа

Перед проведением анализа мочу центрифугируют и используют надосадочную жидкость.

Готовят и подписывают две пробирки – для опытной и контрольной проб. В обе пробирки вносят по 3 мл раствора сульфосалициловой кислоты. В опытную пробирку вносят 1 мл мочи, в контрольную – 1 мл физиологического раствора хлорида натрия.

Содержимое пробирок тщательно перемешивают и выдерживают при комнатной температуре в течение 10 минут. Определяют оптическую плотность опытной пробы при длине волны 620 нм (590–650 нм, оранжевый или красный светофильтр) против контрольной пробы в кювете с толщиной слоя 10 или 5 мм.

При стоянии образцов более 20 минут возможно уменьшение значений оптической плотности за счет оседания части преципитата. Непосредственно перед измерением пробирку с опытной пробой тщательно встряхнуть.

Расчет проводят по калибровочному графику.

Для построения калибровочного графика из калибровочного раствора альбумина и 9 г/л раствора натрия хлористого готовят следующие разведения:

№ пробирки	Калибровочный раствор альбумина, мл	9г/л раствор хлорида натрия, мл	Концентрация белка, г/л
1	0,25	4,75	0,05
2	0,50	4,50	0,10
3	1,00	4,00	0,20
4	2,50	2,50	0,50
5	5,00	-	1,00

Полученные разведения обрабатывают так же, как опытную пробу, а затем строят калибровочный график, одна из осей которого – концентрация белка в растворе, другая – оптическая плотность. Концентрацию белка в образце пациента определяют, подставляя полученную оптическую плотность в калибровочный график.

#### ***Колориметрические методы***

Наиболее чувствительными и точными являются колориметрические методы определения общего белка мочи, основанные на специфических цветных реакциях белков.

К ним относятся:

1. биуретовая реакция,
2. метод Лоури,
3. методы, основанные на способности различных красителей образовывать комплексы с белками:
  - Понсо S,
  - Кумасси бриллиантовый синий,
  - пирогаллоловый красный.

С точки зрения исполнителя, в повседневной работе лаборатории при большом потоке исследований биуретовый метод является неудобным из-за большого числа операций. В то же время, метод характеризуется высокой аналитической надежностью, позволяет определять белок в широком диапазоне концентраций и выявлять альбумин,

глобулины и парапротеины со сравнимой чувствительностью, вследствие чего биуретовый метод рассматривают в качестве референтного и рекомендуют для сравнения других аналитических методов обнаружения белка в моче. Биуретовый метод определения белка в моче предпочтительно выполнять в лабораториях, обслуживающих нефрологические отделения, и использовать в тех случаях, когда результаты определения с помощью других методов представляются сомнительными, а также для определения величины суточной потери белка у нефрологических больных.

Метод Лоури, обладающий более высокой чувствительностью по сравнению с биуретовым методом, сочетает биуретовую реакцию и реакцию Фолина на аминокислоты тирозин и триптофан в составе белковой молекулы. Несмотря на высокую чувствительность, данный метод не всегда обеспечивает получение надежных результатов при определении содержания белка в моче. Причиной тому служит неспецифическое взаимодействие реактива Фолина с небелковыми компонентами мочи (чаще всего аминокислотами, мочевой кислотой, углеводами). Отделение этих и других компонентов мочи путем диализа или осаждения белков позволяет с успехом использовать данный метод для количественного определения белка в моче. Некоторые лекарственные препараты – салицилаты, хлорпромазин, тетрациклины способны оказывать влияние на данный метод и извращать результаты исследования.

Достаточная чувствительность, хорошая воспроизводимость и простота определения белка по связыванию красителей делают эти методы перспективными, однако высокая стоимость реактивов препятствует более широкому их использованию в лабораториях. В настоящее время в России все большее распространение получает метод с пирогаллоловым красным.

Проводя исследование уровня протеинурии, нужно иметь в виду, что различные методы определения протеинурии имеют разную чувствительность и специфичность к многочисленным белкам мочи.

Учитывая выраженные колебания уровня протеинурии в различное время суток, а также зависимость концентрации белка в моче от диуреза, различное его содержание в отдельных порциях мочи, в настоящее время при патологии почек принято оценивать выраженность протеинурии по суточной потере белка с мочой, то есть определять так называемую суточную протеинурию. Она выражается в г/сут.

При невозможности сбора суточной мочи рекомендуется определять в разовой порции мочи концентрации белка и креатинина. Поскольку скорость выделения креатинина в течение дня достаточно постоянна и не зависит от изменения скорости мочеотделения, отношение концентрации белка к концентрации креатинина постоянно. Данное отношение хорошо коррелирует с суточной экскрецией белка и, следовательно, может использоваться для оценки выраженности протеинурии. В норме отношение белок/креатинин должно быть менее 0,2. Белок и креатинин измеряют в г/л. Важным достоинством метода оценки выраженности протеинурии по соотношению белок-креатинин является полное исключение ошибок, связанных с невозможностью или неполным сбором суточной мочи.

#### ***Метод с пирогаллоловым красным***

##### ***История метода***

В 1983 г. Y. Fujita с соавторами предложили использовать для определения белка мочи органический краситель – пирогаллоловый красный (ПГк). Прошло 20 лет, и метод

занял одно из первых мест, постепенно вытесняя все другие. коммерческие наборы реагентов с использованием ПГк выпускает множество фирм, среди которых «Bayer Diagnostics», «Beckman», «Biodirect», «Biocon Diagnostik», «Bio-Rad Laboratories», «Eurodiag», «Kone», «Merck», «Randox», «Serono», «Sentinel CH», «Sigma» и другие.

#### Принцип метода

Оригинальный метод основан на связывании комплекса красителя пирогаллоловый красный и молибдата натрия с молекулами белка в кислой среде (рН ~2,5). Комплекс устойчив к воздействию многих соединений, в том числе лекарственных препаратов, солей, оснований, кислот. Взаимодействие комплекса краситель-молибдат с белком приводит к изменению окраски пробы, которое регистрируется фотометрически при длине волны 600 нм через 10 мин при температуре 37°C. Количество белка определяют по градуировочному графику, построенному по стандартному раствору.

Чувствительность – не более 30 мг/л

Материалом для исследования служит моча или спинномозговая жидкость пациента.

Метод линеен в области концентраций от 0,1 до 1,5 г/л.

#### Процедура анализа

Приготовить и подписать три пробирки:

- Холостая проба
- Калибровочная проба
- Опытная проба

В пробирку с опытной пробой вносится моча или ликвор пациента, в калибровочную – раствор для калибровки с известной концентрацией белка, в холостую пробу вносят дистиллированную воду. Во все пробирки вносят краситель в соотношении с сывороткой 50:1.

Пробы перемешивают и инкубируют в течение 10 минут при 37°C. Затем измеряют оптическую плотность калибровочной и опытной проб против холостой пробы при 600 нм в кювете толщиной 1 см.

#### Расчеты:

Концентрацию общего белка рассчитывают по формуле:

$$C = \frac{A_{оп.}}{A_{кал.}} \times C_{кал.},$$

где:  $C$  — концентрация общего белка в анализируемой пробе, г/л;

$A_{оп.}$  — оптическая плотность анализируемой пробы;

$A_{кал.}$  — оптическая плотность калибратора;

$C_{кал.}$  — содержание общего белка в калибраторе, г/л.

При микроскопическом исследовании мочевого осадка различают органическую и неорганическую часть.

**Органическая часть** представлена эритроцитами, лейкоцитами, цилиндрами и эпителием. *Эритроцитурия* – патологический мочевой синдром (табл.2).

## Причины эритроцитурии

<b>Преренальные</b>	
Передозировка антикоагулянтов Гемофилия Гипо- и афибриногенемии Тромбоцитопении и тромбоцитопатии Тяжелые заболевания печени с нарушением синтеза факторов свертывания ДВС-синдром	
<b>Почечные</b>	
Клубочковые	<b>Пролиферативные</b> (первичные и вторичные гломерулонефриты) <b>Непролиферативные</b> (наследственный нефрит, мембранозная нефропатия, нефросклероз, сосудистые поражения)
Неклубочковые	Поликистоз почек, тубулоинтерстициальные поражения почек, опухоли, сосудистые и инфекционные поражения почек
<b>Постренальные</b>	
Повреждения лоханки и мочеточника	Закупорка, инфекция, камни, опухоль, пороки развития сосудов, туберкулез почки
Повреждение мочевого пузыря	Закупорка, инфекция, опухоль, пороки развития сосудов, травма
<b>Прочие</b>	
Гематурия, вызванная физической нагрузкой Нефроптоз Гипертрофия или аденокарцинома предстательной железы Эндометриоз Псевдогематурия	

*Лейкоцитурия.* У здорового человека при микроскопии осадка мочи обнаруживаются единичные лейкоциты в каждом поле зрения. Лейкоцитурия бывает, как правило, при инфекционных процессах в почках и мочеполовом тракте.

По типу обнаруженных лейкоцитов выделяют разные типы уроцитогрaмм:

- нейтрофильный — инфекция: пиелонефрит, туберкулёз
- мононуклеарный — гломерулонефрит, интерстициальный нефрит
- лимфоцитарный — системная красная волчанка, ревматоидный артрит (системный вариант)
- эозинофильный — аллергоз

По количеству выделенных лейкоцитов можно разделить на микролейкоцитурию (менее 200 в п/зр) и пиурию (более 200 в п/зр).

Уровень лейкоцитурии:

- почечный (тубулярный и гломерулярный) — при гломерулонефрите, интерстициальном нефрите
- почечный (чашечки, лоханки) — при пиелонефрите, туберкулёзе, карбункуле почки, аномалиях положения почек, гипоплазии, поликистозе почек, гидронефрозе.
- внепочечный (мочеточники) — удвоение мочеточников, дивертикул мочеточника, мегалоуретер, эктопия мочеточника, ПМР, перегиб мочеточника.

- внепочечный (мочевой пузырь) — дивертикул мочевого пузыря, цистит, камни мочевого пузыря, уретероцеле, туберкулёз
- внепочечный (уретра) — стриктура уретры, клапан уретры, свищ уретры, уретрит, фимоз

#### Клинический характер лейкоцитурии

- Абактериальная — интерстициальный процесс в почечной ткани
- Бактериальная — инфекция, туберкулёз

*Цилиндрурия* – цилиндры в моче. Цилиндры представляют собой слепки почечных канальцев, состоящие из белка и гликозаминогликанов (гиалина). В норме гиалин секретируется почечным эпителием дистального канальца и выделяется с мочой в растворенном виде. Увеличение белка в моче, закисление мочи, наличие воспалительного процесса в тубулярной части нефрона, замедление тока мочи по дистальным канальцам способствуют выпадению гиалина в осадок и агрегации белка.

В целях диагностики латентных форм воспалительных заболеваний почек и мочевых путей в нефрологической практике широко пользуются методами количественного подсчета эритроцитов, лейкоцитов и цилиндров. Это метод Аддиса-Каковского (подсчет эритроцитов, лейкоцитов и цилиндров в объеме суточной мочи) и метод Нечипоренко (в 1 мл мочи). В норме у взрослых выделяется  $1 \times 10^6$ /л эритроцитов,  $2-4 \times 10^6$ /л лейкоцитов и  $0,02 \times 10^6$  цилиндров.

**Эпителиальные клетки** в моче имеют различное происхождение и попадают в мочу по мере ее прохождения по всему мочевому тракту.

В осадке мочи можно встретить 3 вида эпителия: плоский эпителий, переходный эпителий и почечный эпителий.

Моча проходит через почки, мочеточники и другие отделы мочевыделительной системы и постоянно соприкасается с эпителием. Иногда клетки эпителия отслаиваются, и их можно обнаружить при помощи микроскопического анализа осадка мочи. Так как строение клеток эпителия в различных органах отличается, в моче могут обнаруживаться отдельные виды эпителиальных клеток.

*Плоский эпителий.* У мужчин плоский эпителий попадает в мочу только из нижней трети мочеиспускательного канала, и в моче здоровых мужчин он практически не встречается. У женщин плоский эпителий попадает в мочу из мочеиспускательного канала и влагалища, поэтому в женской моче он практически всегда присутствует.

Особого диагностического значения клетки плоского эпителия не имеют, однако увеличение их количества наблюдается при инфекции мочевыводящих путей.

В нативном препарате клетки плоского эпителия располагаются разрозненно или небольшими пластами. Клетки имеют округлую форму, их диаметр в 6-8 раз превышает диаметр эритроцита, бесцветны, их цитоплазма гомогенная или нежно зернистая. В центре цитоплазмы просматривается большое, занимающее меньшую часть клетки, ядро (рис. 4).



Рис. 4. Многослойный плоский неороговевающий эпителий.

*Переходный эпителий* выстилает лоханки почек, мочеточники, мочевого пузыря, крупные протоки предстательной железы и верхний отдел мочеиспускательного канала. Клетки переходного эпителия в моче здоровых встречаются людей в единичном количестве. Отторгнутые клетки переходного эпителия характеризуются полиморфизмом величины и формы (полигональные, округлые, цилиндрические). Размер их может превышать диаметр эритроцита в 5-10 раз, ядра хорошо различимы. Усиленная эксфолиация клеток переходного эпителия может быть при воспалении мочевого пузыря, лоханок или мочеточников, интоксикации, после инструментальных урологических обследований, при полимозе и раке мочевого пузыря, после приступа почечно-каменной болезни (рис. 5).



Рис. 5. Переходный эпителий

*Почечный эпителий.* Наличие клеток почечного эпителия в моче является характерным признаком поражения паренхимы почек. В моче здоровых людей почечный эпителий в норме не обнаруживается. У новорожденных иногда присутствуют единичные клетки почечного эпителия. Почечный эпителий может появиться при пиелонефритах, гломерулонефритах, интоксикациях, определенных инфекционных заболеваниях, расстройствах кровообращения. Клетки, как правило, округлой формы, небольшого размера, с центрально расположенным ядром (рис. 6).

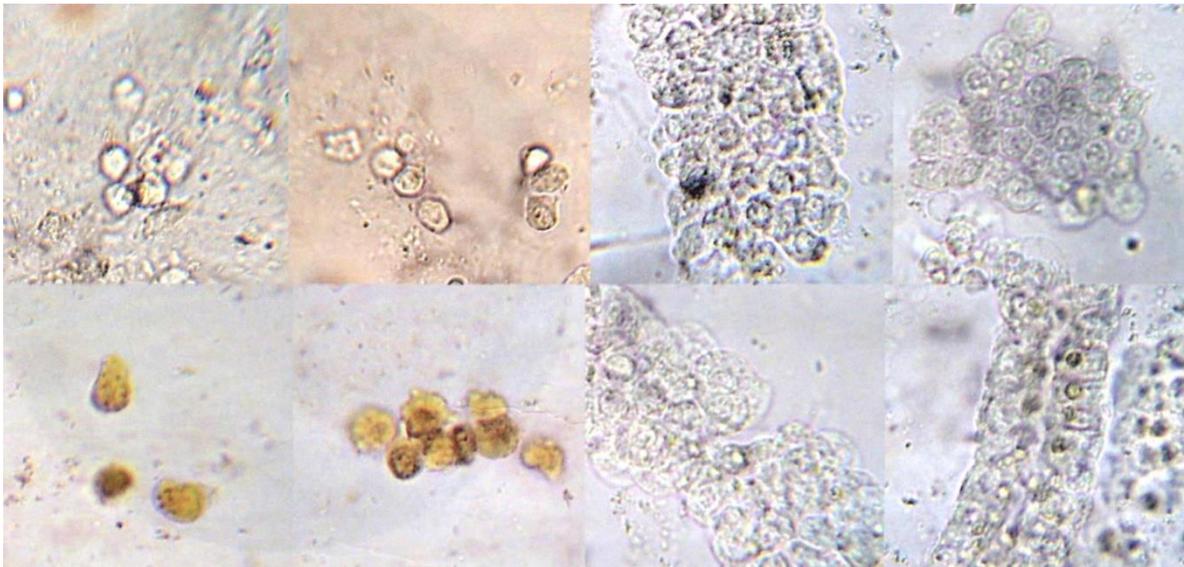


Рис. 6. Почечный эпителий.

**Неорганизованный осадок** мочи представлен солями разной химической природы.

Физиологическими компонентами мочи является мочевины, креатинин.

Мочевина представляет собой продукт метаболизма белков, в норме экскретируемый почками. Концентрация мочевины в крови от 2,5 до 8,3 ммоль/л считается физиологически допустимой. Увеличение концентрации мочевины в крови, сопровождающееся, выраженным клиническим синдромом интоксикации, именуется уремией. Сама мочевины мало токсична, но токсичны вещества накапливающиеся вместе с ней. Поэтому мочевины рассматривают как маркер интоксикации. У больных с уремией отмечается пониженное содержание мочевины в моче.

Креатин образуется в печени и стоком крови доставляется в мышечную ткань, где происходит его фосфорилирование с образованием креатинфосфата. Креатинфосфат является макроэргом, используемым при сокращении мышечными волокнами. В миофибриллах происходит его разрушение с выделением энергии. Образовавшийся в результате реакции креатинин, будучи беспороговым веществом, выделяется с мочой. Уровень его концентрации в крови и моче определяется в основном мышечной массой и выделительной способностью почек. Суточное выделение креатинина с мочой относительно постоянно, поэтому определение его концентрации в крови и моче широко используют для оценки функционального состояния почек.

Как уже говорилось, в основе мочеотделения лежат процессы фильтрации, секреции и реабсорбции – в целом определяющие способность почек к «очищению» от разнообразных веществ. Методы, определяющие очистительную способность почек (клиренс), основываются на сравнении содержания определенных (креатинин) веществ в крови и моче. Клубочковый клиренс представляет клубочковую фильтрацию и соответствует количеству выделенной первичной мочи (мл) за 1 мин. В клинической практике используется метод Реберга о котором говорилось выше.

Мочевая кислота является конечным продуктом метаболизма нуклеопротеинов. При поражении почек нарушается выделение мочевой кислоты с мочой.

С клинической точки зрения процесс диагностики поражения почек целесообразно строить на синдромно-нозологическом принципе. Различают следующие **синдромы поражения почек**:

- мочевого,
- нефротический,
- гипертонический,
- остронефритический,
- острая почечная недостаточность,
- хроническая почечная недостаточность,
- синдром канальцевой дисфункции.

Мочевой синдром наиболее постоянный признак поражения мочевыделительной системы. В понятие мочевого синдрома входят протеинурия, гематурия, лейкоцитурия и цилиндрурия. При отсутствии экстраренальных признаков (отеки, гипертензия) изменения в моче являются единственным диагностическим критерием патологии почек. Например, гломерулонефрит с изолированным мочевым синдромом, хронический пиелонефрит с латентным течением, начальная стадия амилоидоза почек.

Нефротический синдром – состояние, характеризующееся генерализованными отеками, массивной протеинурией (выше 3,5 г/сутки), гипопроteinемией и гипоальбуминемией (менее 20 г/л), гиперлипидемией (холестерин выше 6,5 ммоль/л).

Гипертонический синдром связан с диффузными поражениями почек. Клинически проявляется в повышении артериального давления, лабораторно в снижении скорости клубочковой фильтрации.

Клинико-лабораторный комплекс остронефритического синдрома складывается из олигурии, протеинурии, гематурии, нарастанием отеков и артериальной гипертензии. Возникновение остронефритического синдрома наиболее характерно для острого нефрита.

Острая почечная недостаточность – синдром, характеризующийся внезапно развивающимися азотемией, изменениями водно-электролитного баланса и кислотно-основного состояния, т. е. быстро возникающими нарушениями основных, прежде всего экскреторных, функций почек. Эти изменения являются результатом острого тяжелого поражения почечного кровотока, клубочковой фильтрации и канальцевой реабсорбции, обычно возникающего одновременно. К развитию ОПН могут приводить большое число причин, в первую очередь экзогенного характера (токсические воздействия, инфекции), а также обструкция сосудов почек, закупорка мочевых путей, повреждение интерстициальной ткани.

Хроническая почечная недостаточность – понятие, которое включает в себя постепенное и постоянное ухудшение клубочковых и канальцевых функций почек такой степени, что почка не может больше поддерживать нормальный состав внутренней среды. Совокупность клинических и лабораторных симптомов, развивающихся при ХПН, называется уремией. ХПН представляет собой конечную фазу любого прогрессирующего почечного поражения. В числе наиболее частых причин ХПН различают: хронический гломерулонефрит, хронический пиелонефрит, амилоидоз, поликистоз.

Канальцевые дисфункции (тубулопатии) составляют группу нефропатий, течение которых характеризуется ранним частичным или генерализованным повреждением канальцевых функций при нормальной или несколько сниженной клубочковой

филтрации. Тубулярные изменения первичны, клубочковые повреждения могут развиваться на более поздних стадиях болезни и имеют вторичный характер.

Следует сказать, что понимание патофизиологических процессов, происходящих в почках, позволяют четко определить необходимость того или иного лабораторного исследования. При этом, правильная подготовка пациента перед анализом, соблюдение правил забора биологического материала для исследования являются залогом получения результатов, не вызывающих проблем при интерпретации.

### **ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ**

1. Филтрация, реабсорбция, клиренс, почечный порог.
2. Нормальные уровни физиологических компонентов мочи: мочевины, креатинина, креатина, мочевая кислота.
3. Основные заболевания почек:
  - 1) гломерулонефрит,
  - 2) пиелонефрит,
  - 3) почечная недостаточность,
  - 4) нефротический синдром,
  - 5) нефролитиаз.
4. Нарушения диуреза: полиурия, олигоурия, анурия, никтурия.
5. Патологические компоненты мочи: глюкозурия, протеинурия и ее виды.
6. Синдромы поражения почек:
  - 1) мочевого
  - 2) нефротический
  - 3) гипертонический
  - 4) остонефритический
  - 5) острая почечная недостаточность
  - 6) хроническая почечная недостаточность
  - 7) синдром канальцевой дисфункции.

### **САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ**

1. Записать протокол практического занятия с указанием ее цели и задачи, схемы и методики определения общего анализа мочи.
2. Расшифровать общий анализ мочи при различных патологических состояниях организма человека. Дать заключение с внесением в протокол.
3. Записать тесты на определение функции почек используемые в клинической практике. Дать заключение с внесением в протокол.

## Тестовые задания для самоконтроля

Выберите один правильный ответ

1. В помещениях, где проводится работа с кровью и другими биологическими жидкостями, генеральная уборка проводится...
  - а) два раза в день;
  - б) один раз в месяц;
  - в) один раз в полгода;
  - г) не проводится.
2. Кварцевание помещения проводится...
  - а) раз в неделю;
  - б) каждый день во время работы;
  - в) раз в месяц;
  - г) несколько раз в день в регламентированные часы.
3. Основными задачами здравоохранения на современном этапе являются...
  - а) приватизация;
  - б) распространение добровольного медицинского страхования;
  - в) недопущение снижения объемов медицинской помощи;
  - г) индивидуализация.
4. В районе деятельности клинико-диагностической лаборатории для характеристики нормы нужно ориентироваться на значения аналитов...
  - а) приведенные в справочной литературе;
  - б) приведенные в инструкциях к использованным наборам;
  - в) референтные значения контрольных сывороток;
  - г) выведенные для данной местности и приведенные в бланке лаборатории.
5. Сыворотку крови получают путем...
  - а) спонтанно свернувшейся цельной крови с последующим центрифугированием;
  - б) центрифугирования крови с антикоагулянтом;
  - в) центрифугирования нативной крови.
6. Моча, собранная для анализа, может храниться в холодильнике...
  - а) не более 20 минут;
  - б) не более 2 часов;
  - в) не более 4 часов;
  - г) не более 24 часов.
7. Понятие «абсорбция» в фотометрии идентично понятию...
  - а) отражение;
  - б) пропускание;
  - в) рассеивание;
  - г) оптическая плотность;
  - д) тушение.
8. Биохимические анализаторы подразделяют на...
  - а) ручные, полуавтоматические и автоматические;
  - б) автономные и неавтономные;
  - в) большие и малые.
9. В преджелтушный период острого вирусного гепатита, как правило, повышена сывороточная активность...
  - а) АсАТ;

- б) альфа-амилазы;
  - в) сорбитолдегидрогеназы;
  - г) АлАТ;
  - д) щелочной фосфатазы.
10. Неконъюгированный билирубин в гепатоцитах подвергается...
- а) соединению с серной кислотой;
  - б) декарбоксилированию;
  - в) соединению с глюкуроновой кислотой;
  - г) дезаминированию.
11. Конъюгированный билирубин в основной массе поступает в...
- а) желчевыводящие капилляры;
  - б) кровь;
  - в) лимфатическую систему;
  - г) слюну.
12. Причинами гемолитической болезни новорожденных являются...
- а) относительное снижение активности УДФ-глюкуронилтрансферазы в первые дни жизни;
  - б) абсолютное снижение активности УДФ-глюкуронилтрансферазы в первые дни жизни;
  - в) дефицит лигандинга;
  - г) слабая активность желчевыводящих путей;
  - д) несовместимость крови матери и плода по группе или по резус-фактору.
13. Для гемолитической болезни новорожденных характерно...
- а) выраженная анемия, ретикулоцитоз, эритро- и нормобластоз, гипербилирубинемия за счет непрямой фракции от 100 до 342 мкмоль/л, достигает максимума к 3–5 дню жизни;
  - б) увеличение концентрации непрямого билирубина в сыворотке до 140–240 мкмоль/л.
14. Наибольшую опасность представляет билирубин для...
- а) почек;
  - б) печени;
  - в) нервной ткани.
15. Синтез белков плазмы крови осуществляют...
- а) печень;
  - б) селезенка;
  - в) мышцы;
  - г) тонкий кишечник.
16. Биуретовый метод определения общего белка относится к методам...
- а) азотометрическим;
  - б) гравиметрическим;
  - в) преципитационным;
  - г) спектрофотометрическим;
  - д) колориметрическим.
17. Диспротеинемии это...
- а) увеличение общего белка;
  - б) уменьшение общего белка;
  - в) снижение фибриногена;
  - г) нарушение соотношения фракций белков плазмы.
18. Основную массу (60%) клеток, располагающихся в островках лангерганса, составляют...

- а)  $\alpha$ -клетки;
  - б)  $\beta$ -клетки;
  - в) D-клетки;
  - г) PP-клетки;
  - д) E-клетки.
19. Наиболее частая причина хронического панкреатита...
- а) инфекции;
  - б) злоупотребление алкоголем в течение продолжительного времени;
  - в) травмы брюшной полости;
  - г) желчекаменная болезнь.
20. К лабораторным тестам для диагностики острого панкреатита в первую очередь относят...
- а) щелочная фосфатаза;
  - б) стеркобилин;
  - в) трансаминазы;
  - г) альфа-амилаза.
21. Сахарный диабет развивается в связи с...
- а) повышенным потреблением сахара в пищу;
  - б) усиленным мочеотделением;
  - в) абсолютной или относительной недостаточностью инсулина.
22. Основным симптомом, определяющим патогенез и клинику сахарного диабета...
- а) глюкозурия;
  - б) гипергликемия;
  - в) гипогликемия;
  - г) полидипсия.
23. Почечный порог глюкозы составляет...
- а) 8,0-9,0 ммоль/л;
  - б) 8,9-10 ммоль/л;
  - в) 10-15 ммоль/л.
24. Гликозилированный гемоглобин это...
- а) продукт взаимодействия гемоглобина с глюкозой;
  - б) медь-содержащий протеид;
  - в) ранний маркер сахарного диабета;
  - г) показатель гипогликемии.
25. К факторам риска ишемической болезни сердца относят...
- а) повышение уровня ЛПНП и низкий уровень ЛПВП;
  - б) повышение уровня ЛПВП и низкий уровень ЛПНП.
26. Антиатерогенными являются...
- а) хиломикроны;
  - б) ЛПОНП;
  - в) ЛПВП;
  - г) ЛПНП;
  - д) ЛПНП.
27. О наличии нефротического синдрома свидетельствует суточная потеря белка с мочой равная...
- а) 0,5 -1 г;

- б) 1-3 г;
  - в) 3-3,5 г;
  - г) более 3,5 г;
  - д) в любом количестве.
28. Протеинурия может сопровождать...
- а) острый гломерулонефрит;
  - б) жировой гепатоз;
  - в) рак печени;
  - г) инфаркт миокарда.
29. Протеинурия может быть показателем поражения...
- а) поджелудочной железы;
  - б) печени;
  - в) мочевыводящих путей;
  - г) тонкого кишечника.
30. Нормальное количество лейкоцитов в 1 мл мочи по методу нечипоренко составляет до...
- а) 1 тыс.;
  - б) 2 тыс.;
  - в) 4 тыс.;
  - г) 8 тыс.;
  - д) 10 тыс.

Ответы на тестовые задания

№ тестового задания	№ ответа
01	б
02	г
03	г
04	г
05	а
06	б
07	г
08	а
09	в
10	в
11	а
12	д
13	а
14	в
15	а
16	б
17	б
18	б
19	б
20	г
21	в
22	б
23	б
24	а
25	а
26	д
27	д
28	а
29	в
30	б

## Рекомендуемая литература

### Основная литература

1. Руководство по организации и практическим аспектам лабораторной медицины [Текст] : учеб. пособие / Яковлев А. Т., Загороднева Е. А., Краюшкина Н. Г. и др. ; ВолгГМУ Минздрава РФ ; [под ред. А. Т. Яковлева]. - Волгоград : Изд-во ВолгГМУ, 2018. - 256, [4] с. : табл.
2. Камышников, В.С. Методы клинических лабораторных исследований [Текст] / В.С. Камышников; [ под ред. В. С. Камышникова]. – М.:МЕДпресс-информ, 2018. – 736 с.
3. Клиническая лабораторная диагностика [Текст] . Ч.1 / Е. А. Загороднева [и др.] ; ВолгГМУ Минздрава РФ ; [под ред. А. Т. Яковлева]. - Волгоград : Изд-во ВолгГМУ, 2015. - 183, [1] с. : ил. - Библиогр. : с. 175-176. - Лицензионный договор от 26.10.15.
4. Клиническая лабораторная диагностика [Текст] : учеб.-метод. пособие. Ч. 2 / Е. А. Загороднева [и др.] ; ВолгГМУ Минздрава РФ ; [под ред. А. Т. Яковлева]. - Волгоград : Изд-во ВолгГМУ, 2015. - 175, [1] с. : ил. - Библиогр. : с. 169-170. - Лицензионный договор от 26.10.15.
5. Очерки клинической лабораторной диагностики [Текст] : учеб. пособие. Ч. 1 / А. Т. Яковлев [и др.] ; ВолгГМУ Минздрава РФ. - Волгоград : Изд-во ВолгГМУ, 2017. - 72, [4] с. : ил., табл. - Лицензионный договор б/н от 15.10.2017.
6. Очерки клинической лабораторной диагностики [Текст] : учебное пособие. Ч. 2 / А. Т. Яковлев [и др.] ; Министерство Здравоохранения Российской Федерации, Волгоградский государственный медицинский университет. - Волгоград : Изд-во ВолгГМУ, 2019. - 85, [2] с. : ил., табл. - Библиогр.: с. 84-85. - Лицензионный договор б/н от 21.03.2019.
7. Очерки клинической лабораторной диагностики [Текст] : учебное пособие. Ч. 3 / А. Т. Яковлев [и др.] ; Министерство Здравоохранения Российской Федерации, Волгоградский государственный медицинский университет. - Волгоград : Изд-во ВолгГМУ, 2019. - 97, [2] с. : ил., табл. - Библиогр.: с. 96-97. - Лицензионный договор б/н от 21.03.2019.
8. Кишкун А.А., Централизация клинических лабораторных исследований / Кишкун А.А. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2015. - 368 с. - ISBN 978-5-9704-3568-7 - Текст : электронный // ЭБС "Консультант студента" : [сайт]. - URL : <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970435687.htm>
9. Кишкун, А. А. Назначение и клиническая интерпретация результатов клинических лабораторных исследований [Текст]. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. – 446 с.

### Дополнительная литература

1. Биохимия [Электронный ресурс] : учебник / под ред. Е. С. Северина. - 5-е изд., испр. и доп. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2015. – Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru>
2. Клиническая цитология [Текст] : учеб.-метод. пособие / Е. А. Загороднева [и др.] ; ВолгГМУ Минздрава РФ. - Волгоград : Изд-во ВолгГМУ, 2016. - 183, [5] с. : ил. - Библиогр. : с. 177-179. - Лиц. договор от 26.10.2015.
3. Кишкун А. А. Клиническая лабораторная диагностика [Электронный ресурс] : учеб. пособие / Кишкун А. А. . - М. : ГЭОТАР-Медиа , 2015 . – 976 с.:ил. - Режим доступа : <http://www.studentlibrary.ru>
4. Клиническая биохимия [Электронный ресурс] : учеб. пособие / под ред. В. А. Ткачука; [авт.: В. Н.Бочков, А. Б. Добровольский, Н. Е. Кушлинский и др.]. - 3-е изд., испр. и доп. . - М. : ГЭОТАР-Медиа , 2008 . - 454 с.: ил. . - Режим доступа:

<http://www.studentlibrary.ru>

Алексеев В.В.

5. Медицинские лабораторные технологии : руководство по клинической лабораторной диагностике : в 2 т. Т. 1 : практическое руководство / В.В. Алексеев, А.И. Карпищенко; Алексеев В.В.; Карпищенко А.И. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2012. - 472 с. <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970422748.html>. - ISBN ISBN 978-5-9704-2274-8.