

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ**

**КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ
ДИАГНОСТИКА**

Часть 2

Учебно-методическое пособие

Волгоград, 2015

УДК
ББК
К

Рецензенты:

зав. кафедрой патологической анатомии ГБОУ ВПО ВолгГМУ,
д. м. н., профессор А.В. Смирнов;
профессор кафедры биологии ГБОУ ВПО ВолгГМУ,
д. м. н., доцент Г.Л. Снигур

Авторы:

доцент, к. м. н. *Е. А. Загороднева*
ассистент, к.м.н. *К. П. Вахания*
ассистент *У. Б. Матохина*
ассистент, к.м.н. *Л. Ю. Мешкова*
ассистент, к.м.н. *Н. Г. Краюшкина*
ассистент *Е. С. Рожкова*

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

Клиническая лабораторная диагностика: Учебно-методическое пособие. Часть 2 /
Е. А. Загороднева, К. П. Вахания и др. / под ред. д. м. н., проф. А. Т. Яковлева. – Волгоград:
Изд-во ВолгГМУ, 2015. – 177 с.

В учебно-методическом пособии рассмотрены принципы организации лабораторной службы; даны современные сведения о структуре и функции жизненно важных органов, о клинико-лабораторных тестах, отражающих особенности их состояния, методах лабораторно-диагностического исследования, об особенностях изменения биохимического и морфологического состава крови, мочи, желудочного содержимого, цереброспинальной жидкости, мокроты, отделяемого половых органов и иного биологического материала при широко встречающихся заболеваниях, а также о выполнении контроля качества лабораторных исследований, интерпретации полученных результатов.

Учебно-методическое пособие предназначено для студентов, обучающихся по специальности «Медико-профилактическое дело» лечебного факультета и «Медицинская биохимия» медико-биологического факультета ВолГМУ.

© Волгоградский государственный
медицинский университет, 2015

© Авторы, указанные на обороте
титального листа, по темам, 2015

Содержание

№	Разделы:	Стр.
1.	Исследование иммунного статуса организма человека.....	4
2.	Исследование белкового состава крови.....	16
3.	Лабораторная диагностика заболеваний поджелудочной железы.....	30
4.	Диагностика заболеваний сердечно-сосудистой системы.....	56
5.	Лабораторные исследования системы гемостаза.....	78
6.	Кислотно-щелочной баланс организма.....	100
7.	Молекулярно–генетические методы диагностики в КЛД.....	118
8.	Молекулярно–генетические методы диагностики инфекционных и наследственных болезней.....	132
9.	Организация лаборатории для исследований объектов окружающей среды.....	146
10.	Лабораторные методы исследований объектов окружающей среды.	160
	<i>Рекомендуемая литература.....</i>	172
	<i>Тестовые задания для самоконтроля.....</i>	173
	<i>Ответы на тестовые задания.....</i>	177

1. Тема занятия: Исследование иммунного статуса организма человека.

Цель занятия: Освоить методы исследования для оценки иммунного статуса организма человека.

Перечень знаний и практических навыков:

- Иметь представление об иммунном статусе человека.
- Уметь дать оценку состояния врожденного иммунитета.
- Знать порядок подготовки оборудования, материала и реактивов для проведения исследования иммунного статуса.
 - Уметь интерпретировать результаты, получаемые при постановке методов исследования иммунного статуса.
 - Освоить фагоцитарную активность нейтрофильных гранулоцитов.
 - Научиться рассчитывать ФП, ФЧ, ИЗФ.
 - Освоить метод НСТтеста.

Иммунный статус – это совокупность количественных и функциональных показателей, отражающих состояние иммунной системы человека в данный момент времени.

Состояние иммунного статуса неразрывно связано с возрастными особенностями развития организма человека с рождения до глубокой старости. Изменения показателей иммунной системы происходят постоянно под воздействием самых разнообразных внешних и внутренних факторов: начиная с течения беременности, характера вскармливания на первом году жизни, а также вследствие перенесенных заболеваний, наличия сопутствующих нарушений, к примеру, органов пищеварения и других органов и систем.

Таким образом, нарушения иммунного статуса при различных заболеваниях должны рассматриваться не изолированно, а в комплексе с другими важными системами жизнедеятельности организма. Комплексная оценка состояния различных звеньев иммунной системы должна учитывать как количественные, так и качественные изменения показателей иммунитета.

Показания, при которых необходима оценка иммунного статуса:

1. Состояния, при которых иммунологические методы исследования имеют решающее диагностическое значение (первичные иммунодефициты, дисгаммаглобулинемии, миелома, болезнь тяжелых и легких цепей, СПИД, трансплантации и гемотрансфузии).

2. Болезни, при которых оценка иммунного статуса и проведение специальных иммунологических тестов позволяют провести дифференциальную диагностику внутри группы заболеваний (аутоиммунные заболевания, лейкозы, лимфомы и др.).

3. Заболевания, при которых иммунологические исследования помогают оценить степень их тяжести, прогнозировать осложнения и исходы (инфекционные заболевания с затяжным или хроническим течением, оценка степени риска при оперативных вмешательствах), осуществлять текущий контроль за лечением (антибиотикотерапия, применение цитостатиков, иммуномодуляторов и иммунодепрессантов, лучевая терапия и т.д.).

Исследование иммунного статуса – это многокомпонентное исследование, которое состоит из нескольких этапов:

- оценка гуморального иммунитета;
- клеточного иммунитета;
- неспецифической резистентности организма.

Этапы исследования иммунного статуса

Тесты первого уровня:

- Подсчет абсолютного количества лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов и тромбоцитов.
- Определение концентрации сывороточных иммуноглобулинов различных классов (IgG, IgA, IgM, IgE).

Тесты второго уровня:

Исследование фагоцитарной функции:

- подсчет абсолютного числа фагоцитов (нейтрофилов и моноцитов);
- оценка интенсивности поглощения микробов фагоцитами;

➤ способности фагоцитирующих клеток переваривать захваченные микробы.

Исследование система комплемента:

➤ определение гемолитической активности комплемента CH50.

Исследование Т-системы иммунитета:

➤ подсчет общего числа лимфоцитов;

➤ подсчет процента и абсолютного числа зрелых Т-лимфоцитов (CD3) и двух основных их субпопуляций: хелперов/индукторов (CD4) и киллеров/супрессоров (CD8);

➤ определение пролиферативного ответа на основные Т-митогены (фитогемагглютинин и конканавалин А).

Исследование В-системы иммунитета:

➤ определение концентрации иммуноглобулинов различных классов (G, A, M, E) в сыворотке крови;

➤ определение процента и абсолютного количества В-лимфоцитов (CD19, CD20) в периферической крови.

Тесты 3-го уровня:

Исследование фагоцитарной функции:

➤ оценка интенсивности хемотаксиса фагоцитов;

➤ определение экспрессии молекул адгезии (CD11a, CD11b, CD11c, CD18) на поверхностной мембране нейтрофилов.

Исследование Т-системы иммунитета:

➤ исследование продукции цитокинов (интерлейкина-2 (ИЛ-2 или IL-2), ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, гамма-интерферона (INF- γ), фактора некроза опухоли (ФНО или TNF- α));

➤ определение активационных молекул на поверхностной мембране Т-лимфоцитов (CD25, HLA-DR);

➤ выявление молекул адгезии (CD11a, CD18);

➤ исследование пролиферативного ответа на специфические антигены, чаще всего на дифтерийный и столбнячный анатоксины;

➤ проведение аллергической реакции с помощью кожных тестов с рядом микробных антигенов.

Исследование В-системы иммунитета:

- субклассов иммуноглобулинов, особенно IgG;
- секреторного IgA;
- исследование соотношения κ (каппа) и λ (лямбда) цепей иммуноглобулинов;
- определение специфических антител к белковым и полисахаридным антигенам;
- исследование способности лимфоцитов к пролиферативному ответу на В- (стафилококк, липополисахарид энтеробактерий) и Т-В- (митоген лаконоса) митогены.

Фагоцитоз является главным механизмом естественной резистентности, а также обязательным звеном индукции и формирования специфического иммунного ответа. Фагоцитоз осуществляют полиморфноядерные лейкоциты – ПМЯЛ (нейтрофилы, эозинофилы, базофилы) и моноядерные (моноциты и макрофаги).

Функциональное состояние ПМЯЛ оценивают по фагоцитарной и бактерицидной активности, хемотаксическим и миграционным свойствам. Активность фагоцитирующих клеток изучают *in vivo* и *in vitro*.

Изучение показателей фагоцитоза имеет диагностическое значение в комплексном анализе и диагностике иммунодефицитных состояний: часто рецидивирующих гнойных воспалительных процессов, длительно незаживающих ранах, склонности к послеоперационным осложнениям. Помогает в диагностике вторичных иммунодефицитных состояний, вызванных лекарственной терапией, а также в оценке эффективности различных фармакологических препаратов при инфекционных заболеваниях.

Бактерицидное действие фагоцитирующих клеток определяется кислородзависимыми и кислороднезависимыми механизмами. Главные кислородзависимые факторы – миелопероксидаза, НАДФ-оксидаза, действие этих ферментов обусловлено образованием мощных бактерицидных продуктов – кислородных радикалов: синглетный кислород (O_2), супероксидный анион (O_2^-), гидроксильный радикал (OH), перекись водорода.

Кислороднезависимые механизмы бактерицидности:

- лизоцим – вызывает расщепление мукопептидов клеточной стенки бактерий;
- трансферрин, лактоферрин – лишают пролиферирующие бактерии железа;
- катионные белки – повреждают мембраны микроорганизмов;
- протеолитические, гидролитические ферменты – переваривание убитых микроорганизмов;
- молочная кислота, образующаяся в результате гликолиза и окислительного фосфорилирования – повышает активность гидролитических ферментов.

Для оценки бактерицидной активности применяют различные цитохимические тесты, радиометрические, бактериологические методы.

Общепринятым унифицированным методом является НСТ-тест (это тест восстановления нитросинего тетразолия).

Показатели НСТ – теста существенно повышаются в начальном периоде многих острых бактериальных инфекций, тогда как при подостром и хроническом течении инфекционного процесса они, как правило, снижены. Снижение спонтанного и стимулированного НСТ может быть обусловлено патологией самих нейтрофилов (хроническая гранулематозная болезнь, дефицит глюкоза-6-фосфат-дегидрогеназы нейтрофилов) или дефицитом гуморальных факторов, обеспечивающих нормальный фагоцитоз (дефицит иммуноглобулинов, комплемента). Нагрузочный тест является информативными, т. к. характеризует резервы бактерицидной активности нейтрофилов.

Получение фагоцитирующих клеток. Источниками ПМЯЛ может быть периферическая кровь, перитонеальный экссудат, клеточная суспензия органов. При исследовании фагоцитарной активности полученные клеточные суспензии культивируют в присутствии объекта фагоцитоза – бактерий, дрожжевых клеток, эритроцитов животных, частиц латекса и через определенное время оценивают активность фагоцитоза различными методами.

Микроскопический метод

Принцип метода оценки фагоцитоза. Метод основан на определении с помощью светового микроскопа поглотительной и переваривающей способности нейтрофилов крови по отношению к объекту фагоцитоза после их совместной инкубации. Для этого, взвесив пекарских дрожжей и исследуемые лейкоциты инкубируют необходимое время, после чего подсчитывают процент фагоцитирующих клеток и среднее число поглощенных объектов одним фагоцитом.

Исследуют мазки после 30-минутной и 2-х часовой инкубации под иммерсионной системой светового микроскопа. Среди 100 нейтрофилов подсчитывают активные (поглотившие хотя бы 1 дрожжевую клетку) и неактивные (не поглотившие ни одной дрожжевой клетки) нейтрофилы. При подсчете для удобства пользуются гематологическим калькулятором: одной клавишей отмечают фагоцитирующие нейтрофилы, другой – нефагоцитирующие, в сумме они должны составить 100 клеток, третьей (трехзначной) клавишей отмечается количество поглощенных дрожжей.

ФП – фагоцитарный показатель, процент клеток, вступивших в фагоцитоз (процент активных нейтрофилов). ФЧ – фагоцитарное число, среднее число поглощенных дрожжей активными нейтрофилами.

В норме пик поглотительной активности фагоцитов приходится на 30 мин, через 30 минут начинается переваривание поглощенных дрожжей, через 2 часа оно должно закончиться.

Принцип метода оценки бактерицидности фагоцитов:

Метод основан на способности нейтрофилов поглощать нитросиний тетразолий и восстанавливать его в гранулы нерастворимого диформаза, в виде гранул синего цвета. Этот тест отражает степень активации НАДФ-оксидазы и гексозомонофосфатного шунта.

Спонтанный НСТ-тест характеризует спонтанную активность нейтрофилов, стимулированный (пирогеналом) – индуцированную активность.

В каждом мазке подсчитывают 100 нейтрофилов, среди которых определяют процент клеток, содержащих отложения диформаза. Вычисляют индекс стимуляции (ИС).

$$ИС = \% \text{ в стимулированном НСТ-тесте} / \% \text{ в спонтанном НСТ-тесте}$$

В норме у здоровых людей спонтанный НСТ составляет в среднем до 10%, стимулированный – 40 – 80%. Величина цитохимического индекса в базальных условиях колеблется в пределах 0,10 – 0,15, при стимуляции – 0,5 – 1,5.

Методы изучения клеточного звена иммунитета

Под клеточным иммунным ответом понимают способность CD4 Т-лимфоцитов после распознавания специфического антигена, находящегося на презентирующих клетках, и реагировать на него синтезом ряда цитокинов, ведущих к активации антиген-специфических CD8+ Т-киллеров и CD4+ эффекторов гиперчувствительности немедленного типа, а также активации клеток моноцитарно-макрофагальной системы.

Для характеристики основных процессов клеточного ответа используют следующий перечень тестов:

- Определение общего количества Т-лимфоцитов и их различных субпопуляций.
- Определение гиперчувствительности замедленного типа с помощью кожных проб.
- Определение пролиферативного ответа к Т-митогенам, аллоантигенам, антигенам.
- Определение различных субпопуляций лимфоцитов.
- Уровень гормонов тимуса.
- Уровень секретируемых цитокинов.
- Тест ингибиции миграции лейкоцитов.

Определение субпопуляций Т-лимфоцитов с использованием моноклональных антител

В настоящее время идентификация субпопуляций Т-лимфоцитов осуществляется с помощью меченных флюорохромом МКА к

соответствующим клеточным рецепторам (CD4, CD8, CD16 и др.). В качестве метки могут использоваться флуоресцеин-изотиоцианат (ФИТЦ), фикоэритрин (ФЭ) и др. Прямой метод постановки реакции основан на использовании меченных МКА непосредственно к клеточным структурам. Непрямой вариант заключается в том, что с поверхностными антигенами клетки взаимодействуют специфические немеченые МКА (чаще всего полученные от мыши), а проявление результатов реакции осуществляется с помощью антивидовых (в данном случае антимышинных) меченных иммуноглобулинов. Метка (флюорохром) выявляется при просмотре препарата в ультрафиолетовых лучах (люминесцентная микроскопия).

Определение цитотоксичности естественных киллеров

Естественные киллеры (ЕК) – клетки лимфоидного ряда, ответственные за независимый от продуктов МНС спонтанный лизис опухолевых, вирусомодифицированных, мутировавших клеток.

Активность ЕК определяют в цитотоксическом тесте по лизису меченых радиоактивными изотопами клеток-мишеней, которыми могут служить опухолевые линии клеток Л-562 (миелолейкоз человека), gAC-1 и др. В качестве тестируемых клеток-эффекторов используют суспензии спленоцитов, клеток лимфоузлов или мононуклеары периферической крови.

Для тестирования берут освобожденные от эритроцитов ядросодержащие клетки селезенки (А). Клетки линии К-562 метят ³H-уридином (В).

Реакцию выполняют в 96-луночных планшетах. Готовят клеточные взвеси в различных пропорциях (каждое вносится в 3 лунки планшета). После инкубации содержимое ячеек переносят на мембранные фильтры и отмывают.

Функциональную активность ЕК оценивают по разнице радиоактивности, выявляемой на сцинтилляционном b-счетчике, в ячейках, содержащих или не содержащих эффекторные клетки. Индекс цитотоксичности (ИЦ) определяют по формуле:

$$ИЦ = (CPMt / CPMc) \times 100,$$

где $CPMt$ – число импульсов в тестерных ячейках, $CPMc$ – число импульсов в контрольных ячейках.

Реакция бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) с неспецифическими митогенами

Ответ Т-лимфоцитов на действие антигена или митогена сопровождается каскадом внутриклеточных сигналов, пролиферацией, приобретением эффекторных функций, продукцией цитокинов и их рецепторов. Ослабление иммунных функций Т-лимфоцитов в системе *in vivo* приводит к снижению способности отвечать на первичные и вторичные антигенные воздействия и негативно отражаются на их способности активироваться *in vitro*. Т-клеточная активация *in vitro* приводит к изменению морфологии клеток и переходом их в бластные формы, появлению клеточных рецепторов для ростовых факторов, продукции и секреции цитокинов и экспрессией связанных с активацией клеточных антигенов (таких как CD69, HLA-DR, CB38, C025, C071 и др.)

Существуют различные методы активации лимфоцитов *in vitro*. Известно довольно много селективно действующих Т- и В-митогенов. Митогены – неспецифические стимуляторы, вовлекающие в процесс бласттрансформации большую часть лимфоцитов независимо от их иммунологической специфичности. Причем одни из них избирательно активируют только Т-лимфоциты, другие – В-лимфоциты и называются соответственно Т- и В-клеточными митогенами. Наиболее часто используемые митогены для Т-лимфоцитов – фитогемагглютинин (ФГА), конканавалин А (КонА), антиCD3 моноклональные антитела и форбол мирикат ацетат (ФМА). Для В-лимфоцитов неспецифическими митогенами являются бактериальный липополисахарид (ЛПС) и митоген лаконоса.

Активация с помощью ФМА ведет к очень быстрому появлению на поверхности Т-клеток рецептора к IL-2 и продукции ряда цитокинов, но при этом практически не наблюдается продукции IL-4 Th2-лимфоцитами. ФМА является низко специфичным по отношению к клеточным популяциям и активирует В-клетки и моноциты также хорошо, как и Т-клетки. Обеспечивая высокий уровень активации, ФМА в тоже время является токсичным для

клеток. Было также показано, что ФМА снижает экспрессию CD4 и CD8-антигенов на поверхности Т-лимфоцитов, что делает проблематичным идентификацию субпопуляций лимфоцитов, продуцирующих цитокины. Несомненным преимуществом ФМА является очень быстрая активация (4 – 6 часов) и высокий уровень продукции цитокинов.

Активация с помощью анти-CD3 моноклональных антител ведет к появлению детектируемого уровня цитокинов через 20 часов культивирования. Максимальные значения экспрессии как рецепторов к цитокинам, так и самих цитокинов достигается в промежутке времени 44 – 72 часа культивирования. При этом достигается высокий уровень продукции цитокинов как Th1-клетками (IL-2, INF γ), так и Th2 клетками (IL4). Кроме того, при активации с помощью анти-CD3 антител не происходит снижения экспрессии антигенов CD4 и CD8 на поверхности клеток.

В настоящее время для изучения активации лимфоцитов наряду с определением ДНК и РНК, широко используют определение активационных маркеров, появляющихся на поверхности клеток только после воздействия митогенов.

Лимфоциты, вступившие в контакт с митогеном, реагируют на него бласттрансформацией. Они увеличиваются в размерах, в них усиливается синтез ДНК, РНК и белка, появляются многочисленные митозы. Если измерять образование ДНК или морфологически идентифицировать такие бласты и подсчитывать их процент, можно получить показатель, характеризующий иммунологическую реактивность различных популяций лимфоцитов. Следует отметить, что добавленные в культуру митогены (ФГА, КонА, митоген лаконоса и др.) неспецифически стимулируют лимфоциты к бласттрансформации и полученные таким образом показатели характеризуют состояние клеток в данный момент и их общую способность к реакции.

Процессы бласттрансформации лимфоцитов осуществляются в организме постоянно, благодаря чему иммунная система поддерживается в состоянии функциональной готовности. В норме интенсивность этих антигенами, поступающими через слизистые различных органов. РБТЛ, являясь надежным тестом определения иммунологической реактивности различных клеточных

популяций под влиянием антигенов, служит критерием специфической реактивности Т- и В-лимфоцитов, а под воздействием неспецифических стимуляторов – показателем общей иммунологической реактивности, косвенно свидетельствуя и о потенциальной способности иммунной системы к реакциям на антигены. Исходя из этого, РБТЛ с антигенами и неспецифическими стимуляторами применяют для оценки иммунологического статуса организма при различных патологических состояниях. Эта реакция с соответствующими антигенами может быть использована для выявления у больных повышенной чувствительности к этим антигенам при инфекционных, аллергических, аутоиммунных процессах. Наиболее широко РБТЛ применяется в клинике с митогенами для оценки общей клеточной реактивности. Снижение пролиферативного ответа на митогены свидетельствует о наличии иммунодефицита, однако механизмы последнего могут быть различными.

Существуют различные методы регистрации бласттрансформированных лимфоцитов:

1. Микроскопический метод – морфологическая идентификация и подсчет процента бластов с помощью микроскопа.

2. Радиоизотопный метод – с помощью включения радиоактивной метки (чаще всего это предшественник ДНК, ³H-тимидин) в синтез ДНК с последующей регистрацией в сцинтиляционном счетчике.

3. МТТ-тест – основан на изменении цвета связывающегося с клетками красителя 3-4,5диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенил-2-тетразолия из синего в желтый. Реакция учитывается в 96-луночной планшете на плашечном фотометре.

4. Метод с использованием BrdU (бромдезоксимуридина), который включается в ДНК вместо тимидина. Регистрация происходит с помощью моноклональных антител к BrdU на проточном цитофлуориметре.

5. Метод оценки с помощью КФСЭ (5- и 6-карбоксифлуоресцеин-сукцинилмидил эфира). Окрашенные КФСЭ лимфоциты делятся под влиянием митогена, и из одной клетки с большей (исходной) интенсивностью свечения получают две клетки, интенсивность каждой из которых примерно в два раза

ниже исходной и так далее. На цитометрической гистограмме окрашенные КФСЭ клетки располагаются в виде ряда последовательных пиков с уменьшающейся интенсивностью свечения. Клетки анализируются на проточном цитофлюориметре.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

1. Оценка фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов.
2. Расчет ФП, ФЧ, ИЗФ.
3. Определение субпопуляций Т-лимфоцитов с использованием моноклональных антител
4. Определение цитотоксичности естественных киллеров
5. Реакция бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) с неспецифическими митогенами

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

1. Записать протокол практического занятия с указанием цели и задач, функции нейтрофильных лейкоцитов.
2. Записать основные методы оценки фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов.
3. Интерпретировать результаты НСТ-теста.

2. Тема занятия: 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 результатов лечения воспалительного процесса по данным показателей белков острой фазы.

Белки представляют собой высокомолекулярные полипептиды, состоящие из более 20 видов α -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 α - и β -глобулинов;
- клетки ретикулоэндотелиальной системы (РЭС) костного мозга и лимфатических узлов – часть β -глобулинов и γ -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).

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 (α 1-глобулины, α 2-глобулины, β -глобулины, γ -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 (рис 1). 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 (**γ -глобулины**) оказываются последними (рис. 2).



Рис. 1. Общий вид электрофореза

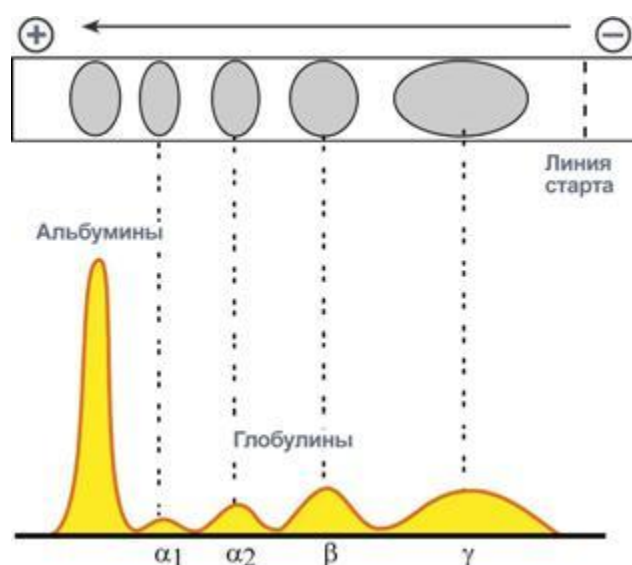


Рис. 2. Электрофореграмма (вверху) и графический результат ее обработки (внизу)

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

Количество выделяемых фракций определяется условиями проведения электрофореза. При электрофорезе на бумаге и пленках ацетата целлюлозы в клинко-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.

Альбуминовая фракция включает в себя *альбумин* (основная часть) и *преальбумин* – ее доля составляет более 50% от всех белков плазмы (табл. 1.).

Таблица 1

Нормальная протеинограмма

Альбумины	52-65 %	35-50 г/л
α_1 -Глобулины	2,5-5 %	1-3 г/л
α_2 -Глобулины	7-13 %	6-10 г/л
β -Глобулины	8-14 %	7-11 г/л
γ -Глобулины	12-22 %	8-16 г/л

Глобулиновые фракции более разнородны.

Фракция альфа1-глобулина включает в себя следующие белки:

- α_1 -антитрипсин (основной компонент этой фракции) – ингибитор многих протеолитических ферментов – трипсина, химотрипсина, плазмина и т.д.
- α_1 -липопротеин (ЛПВП) – участвует в транспорте липидов.
- α_1 -кислый гликопротеин (орозомукоид). Он повышается в ответ на различные острые и хронические воспалительные стимулы. Используется для индикации острофазового ответа.

Фракция альфа2-глобулинов включает:

- α_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 хореоатетоза). 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.

- β -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 (табл.2).

Типы протеинограмм

Тип протеинограммы	Альбумины	Фракции глобулинов				Примеры заболеваний
		α_1	α_2	β	γ	
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
α_2 -глобулиновые плазмоцитомы	↓	↓	↑↑	↓	↓	α_2 -Плазмоцитомы
β -глобулиновые плазмоцитомы	↓	↓	↓	↑↑	↓	β_1 -Плазмоцитомы, β_1 -плазмноклеточная лейкемия и макроглобулинемия Вальденштрема
γ -глобулиновые плазмоцитомы	↓	↓	↓	↓	↑↑	γ -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 (табл.3).

**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_2 -гликопротеид)	0,4 - 1,3
		α_1 - 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_2 -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.

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. Определения содержания общего белка в моче.
7. Общая характеристика белковых фракции.
8. Альбумины, гипер- и гипоальбунемия.
9. α 1-Глобулины: α 1- протеиназный ингибитор, α 1-кислый гликопротеин.
10. α 2-Глобулины: α 2-макроглобулин, гаптоглобин, церуло-плазмин.
11. β -Глобулины: трансферрин, гемопексин.
12. γ -Глобулины: иммуноглобулины, гипер-гаммаглобулинемия.
13. Белки острой фазы воспаления, классификация, характеристика.
14. Тесты на белки острой фазы используемые в клинической практике.
15. Типы протеинограмм.
16. Протеинограмма при остром и хроническом воспалении.
17. Протеинограмма при нарушении функций почечного фильтра и злокачественных новообразованиях.
18. Протеинограмма при гепатитах, циррозах печени, механической желтухе.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

1. Записать протокол практического занятия с указанием ее цели и задач, схемы и методики определения общего белка крови и мочи, классификации белковых

фракций, белков ОФ по степени увеличения их концентрации в сыворотки крови, таблицы нормальной протеинограммы.

2. Расшифровать протеинограммы при различных патологических состояниях организма человека. Дать заключение с внесением в протокол.

3. Записать тесты на белки острой фазы используемые в клинической практике. Дать заключение с внесением в протокол.

3. Тема занятия: Лабораторная диагностика заболеваний поджелудочной железы.

Цель занятия: Знать биохимическую диагностику заболеваний поджелудочной железы, диагностическое значение определения активности ферментов в крови и моче. Изучить основные формы сахарного диабета, уметь правильно оценивать результаты гликемического профиля, глюкозотолерантного теста, маркеры ранней диагностики сахарного диабета, уметь выявлять маркеры сосудистого риска.

Перечень знаний и практических навыков:

- Знать ферменты поджелудочной железы.
- Уметь интерпретировать данные содержания ферментов поджелудочной железы в крови и моче.
- Изучить классификацию сахарного диабета и его формы.
- Знать основные симптомы и клинические проявления сахарного диабета.
- Охарактеризовать отличие абсолютной и относительной инсулиновой недостаточности.
- Овладеть навыком оценки результатов гликемического профиля.
- Знать методы определения содержания глюкозы.
- Изучить принцип и уметь интерпретировать глюкозотолерантный тест.
- Охарактеризовать основные маркеры ранней диагностики сахарного диабета.
- Иметь представление о гликозилированном гемоглобине и фруктозамине, как эффективных методах контроля гипергликемии.
- Производить оценку сосудистого риска при сахарном диабете.
- Уметь интерпретировать полученные результаты содержания гликозилированного гемоглобина.
- Производить оценку показателей липидного спектра.

Поджелудочная железа имеет вид уплощенного постепенно суживающегося тяжа и состоит из головки, тела, хвоста. В толще железы от хвоста до головки проходит проток поджелудочной железы, который, сливаясь с общим желчным

протоком (реже самостоятельно), проникает в стенку 12перстного кишечника и открывается на вершине большого сосочка 12перстной кишки (фатерова сосочка).

Функции поджелудочной железы:

1. *Экзокринная функция* (внешнесекреторная или экскреторная) – секрета в 12 п.к. сока, содержащего набор ферментов, гидролизующих все основные группы пищевых полимеров, основными из которых являются: липаза, α -амилаза, трипсин и химотрипсин.

Основные ферменты панкреатического сока секретируются в неактивной форме (трипсиноген, химотрипсиноген) и активируются только в 12 п.к., превращаясь под действием энтерокиназы в трипсин и химотрипсин.

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 фосфотаза 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 α -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 α -амилазы мочи.

Диагностическое значение анализа

Основная ценность определения Р-типа α -амилазы заключается в том, что увеличение ее активности высокоспецифично для заболеваний поджелудочной железы. Панкреатическая α -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 α -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 α -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.

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, калликрейна, катепсинов и других ферментов тканевых протеаз). Важнейшая физиологическая роль α -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 α -1-антитрипсина в сыворотке крови повышается при злокачественных новообразованиях: раке (особенно шейки матки) и метастазах, лимфоме (особенно лимфогранулематозе), заболеваниях легких (эмфиземе).

Поскольку α -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 α -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 α -1-антитрипсина. Приобретенный дефицит α -1-антитрипсина встречается при нефротическом синдроме, гастроэнтеропатии с потерей белка, острой фазе термических ожогов. Всем пациентам с хроническими заболеваниями печени показано плановое определение уровня α -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 α 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 α -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 α -2-макроглобулина из сосудистого русла за счет поглощения гепатоцитами, макрофагами и фибробластами. Было показано, что различные формы α -2-макроглобулина связывают такие цитокины как ИЛ-1, 2, 6, 8, ФНО-а и др. Молекулярная масса: 725 килодальтонов. Молекула - tetramer с четырьмя идентичными подъединицами с молекулярными массами 179 килоДальтон.

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.

Д. Эндокринопатии.

Е. Сахарный диабет, индуцированный химикатами и лекарствами.

Ф. Инфекции (врожденная краснуха, цитомегаловирус, вирусы Коксаки).

Г. Необычные формы иммуноопосредованного диабета.

Н. 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.

Выраженное похудание, особенно характерное для диабета 1-го типа. Типичный симптом диабета, появляющийся, несмотря на наличие у больных повышенного аппетита. Похудание, а нередко даже истощение больных вызвано повышенным катаболизмом жиров, а также белков из-за исключения глюкозы из энергетического обмена клеток больного.

Вышеперечисленные основные симптомы являются наиболее характерными для диабета первого типа. Для них характерно острое развитие. Как правило, пациент может назвать точно дату либо период появления данных симптомов.

Также развитие диабета сопровождают вторичные симптомы, представляющие собой неспецифические клинические признаки, развитие которых происходит постепенно в течение продолжительного времени. Вторичные симптомы характерны для диабета первого, а также второго типа.

Вторичные симптомы диабета:

- Зуд кожи, а также слизистых оболочек больного (вагинальный зуд).

- Общая мышечная слабость.
- Сухость во рту.
- Головная боль.
- С трудом поддающиеся лечению воспалительные поражения кожи.
- Присутствие при диабете первого типа ацетона в моче. Ацетон появляется в результате сжигания жировых запасов.

- Ощущение во рту вкуса железа.
- Затуманенное зрение либо другие признаки ухудшения зрения.
- Грибковые инфекции.
- Онемение рук и ног.
- Сухость кожных покровов.

Осложнения сахарного диабета:

- **Острые осложнения диабета** (часто как результат неадекватной терапии):
 - Кетоацидотическая кома.
 - Гиперосмолярная кома.
 - Лактатацидотическая кома.
 - Гипогликемическая кома.
- **Поздние осложнения диабета**
 - Микроангиопатия (ретинопатия, нефропатия).
 - Макроангиопатия (инфаркт миокарда, инсульт, гангрена ног).
 - Нейропатия.
 - Поражения других органов и систем – энтеропатия, гепатопатия, катаракта, остеоартропатия, дермопатия и др.

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-транспортерами. 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 (табл. 4).

Таблица 4

Критерии диагностики СД и других категорий гипергликемии (ВОЗ,1999)

Тесты, ммоль/л	Концентрация глюкозы, ммоль/л			
	цельная кровь	плазма	цельная кровь	плазма
	Сахарный диабет			
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
	Нарушенная толерантность к глюкозе			
Натощак	< 6,1	< 6,1	< 7,0	< 7,0
Через 2 ч после нагрузки глюкозой или оба показателя	> 6,7 и < 10,0	> 7,8 и < 11,1	> 7,8 и < 11,1	> 8,9 и < 12,2
	Нарушенная гликемия натощак			
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

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).

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 клиничко-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 8,9 – 10,0 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.

Толерантность 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 (табл. 5).

Таблица 5

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%)	>7,8<11,1 (>140<200 мг%)
Сахарный диабет	>6,1 (>110 мг%)	>11,1 (>200 мг%)

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 сахарным диабетом.

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. Многочисленные исследования доказали, что применение препаратов, снижающих постпрандиальный уровень глюкозы плазмы, способствует и снижению частоты развития сосудистых осложнений.

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 за уровнем 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%.

Методы определения содержания глюкозы

Определение концентрации глюкозы в крови – одно из наиболее часто выполняемых биохимических исследований в клинко-диагностической лаборатории. 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:

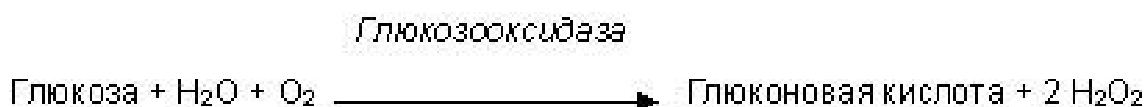
1. *Редуктометрические*. Почти не используются.
2. *Колориметрические*. Почти не используются.
3. *Ферментативные*:
 - а) *Глюкозооксидазный*:
 - фотометрический по конечной точке;
 - фотометрический кинетический;

- отражательная фотометрия – сухая химия;
- электрохимический.

б) Гексокиназный.

Глюкозооксидазный метод.

Сегодня наибольшее распространение получили методы, основанные на использовании фермента – глюкозооксидазы. 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. Существует несколько способов для регистрации глюкозооксидазной реакции (см. схему).



Среди вышперечисленных 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 анализаторов.

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.

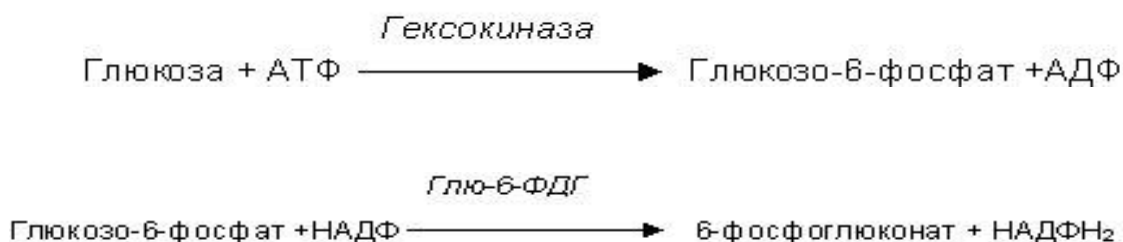
Наряду с методом фотометрирования по конечной точке, несколько лет назад появились наборы, в которых реализован **кинетический метод фотометрирования**. Суть метода состоит в том, что при определенном соотношении активностей глюкозооксидазы и пероксидазы, скорость образования окрашенного соединения некоторое 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.

В заключении следует упомянуть и о недостатках глюкозооксидазного метода. 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. Этот метод линеен, как правило, до 20 – 30 ммоль/л глюкозы.

Гексокиназный метод.

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.

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. 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. 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.

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.

Основные показания к применению: диагностика сахарного диабета первого типа, оценка риска развития сахарного диабета первого типа у лиц с отягощенной наследственностью по сахарному диабету.

C-peptide – показатель синтеза инсулина и обмена углеводов.

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, секретирясь в кровь в эквимолярных количествах. 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.

Основные показания к применению: диагностика диабета I и II типов, инсулинома, оценка секреции инсулина при заболеваниях печени, оценка инсулинотерапии.

Проинсулин – предшественник инсулина, синтезирующийся бета-клетками островков Лангерганса поджелудочной железы. 3 – 10% проинсулина поступает в кровоток, остальная часть превращается в инсулин путем отщепления С-пептида. Нарушение превращения проинсулина в инсулин клинически характеризуется наличием нарушенной толерантности к глюкозе или мягким течением сахарного диабета 2 типа. Таким образом, повышение концентрации проинсулина в крови особенно характерно для сахарного диабета 2 типа, но может иметь место и при сахарном диабете 1 типа. Повышается также при вторичном диабете, связанном с беременностью и ожирением, при гиперинсулинизме на фоне инсулиномы.

Критерии компенсации сахарного диабета

Критериями компенсации сахарного диабета в настоящее время считаются: хорошее состояние, стабильное течение болезни (суточная нормогликемия и аглюкозурия) и нормальное содержание гликированного гемоглобина.

Хорошей компенсацией ИЗСД (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, гликированный гемоглобин – 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 глюकोзурия 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 ИЗСД, 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% (табл.6).

Таблица 6

**Критерии компенсации углеводного обмена
при сахарном диабете 2 типа**

Показатели	Типы гликемий	Критерии компенсации углеводного обмена при СД2		
		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 HbA1c-тест, где Hb – 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 месяца, в течение которых происходит взаимодействие гемоглобина и глюкозы.

В норме содержание HbA1c в крови составляет 5 – 7% от общего уровня 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 – 2,0% выше, чем HbA1c. У больных с хорошей компенсацией сахарного диабета он находится в пределах 8,5 – 11,0%. На

показатель гликозилированного гемоглобина могут влиять такие патологические состояния, как анемия, полицитемия, гемоглобинопатии.

Второй показатель, использующийся при определении степени компенсации сахарного диабета, - это **фруктозамин**.

Фруктозамин образуется в результате связывания глюкозы с белками плазмы крови. Повышение концентрации фруктозамина в плазме крови свидетельствует о том, что в последние 2 – 3 недели (время жизни сывороточного белка альбумина) в крови был повышенный уровень глюкозы. 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. В норме концентрация фруктозамина в крови не превышает 285 мкмоль/л.

Как известно, хроническая гипергликемия является причиной развития и прогрессирования осложнений заболевания, а макроангиопатические осложнения – основной причиной смерти пациентов с СД.

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);
- 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. Функции поджелудочной железы.
2. Понятие и формы панкреатита.
3. Лабораторные тесты при остром и хроническом панкреатите.
4. Диагностическое значение определения α -амилазы при заболеваниях поджелудочной железы.
5. Диагностическое значение определения α -1-антитрипсина при заболеваниях поджелудочной железы.
6. Диагностическое значение определения α -2-макроглобулина при заболеваниях поджелудочной железы.
7. Сахарный диабет, определение, классификация.
8. Диагностические критерии сахарного диабета I и II типов.
9. Основные симптомы и клинические проявления.
10. Инсулин, влияние на метаболизм.
11. Гипергликемия и глюкозурия.
12. Нарушенная толерантность к глюкозе. Диагностические критерии оценки глюкозотолерентного теста.
13. Нарушенная гликемия натощак.
14. Абсолютная и относительная недостаточность инсулина.
15. Постпрандиальная гипергликемия, понятие.
16. Методы определения содержания глюкозы в крови.
17. Принципы глюкозооксидазного и гексокиназного методов.
18. Ранняя диагностика сахарного диабета.
19. Критерии компенсации сахарного диабета.
20. Гликозилированный гемоглобин, фруктозамин, понятия.
21. Показатели липидного спектра при сахарном диабете.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

1. Записать протокол практического занятия с указанием цели и задач, перечислить основные функции поджелудочной железы, основные формы панкреатита и их характеристику.
2. Записать формы сахарного диабета, основные клинические симптомы, нормы содержания глюкозы, принцип глюкозотолерентного теста, понятия абсолютной и относительной инсулиновой недостаточности.
3. Записать основные принципы определения глюкозы в крови, способы ранней диагностики сахарного диабета, понятие о гликозилированном гемоглобине и фруктозамине.
4. Интерпретировать результаты содержания гликозилированного гемоглобина. Дать заключение с внесением в протокол.

4. Тема занятия: Диагностика заболеваний сердечно-сосудистой системы.

Цель занятия: научиться оценивать показатели липидного обмена и высчитывать риск развития сердечнососудистых заболеваний (ССЗ), 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.
- 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: сульфоллипиды, 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.

Лipopотеины (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) (табл. 6).

Таблица 6

Характеристика липопотеинов

Класс ЛП	Плотность	Размер, нм	Состав ЛП, %				Апо	Место образования	Основная функция
			Белок	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	1,064-1,210	7,0-13	45	5	25	25	А-I, А-II, С, Е	печень, тонкая кишка, катаболизм ХМ и ЛПОНП	обратный транспорт ХС

Апо – апопротеины,

ТГ – триглицериды,

ХС – холестерин,

ФЛ – фосфолипиды.

При проведении электрофореза липопотеины подразделяют на фракции, одна из которых остается на старте (хиломикроны), другие мигрируют к зонам глобулинов – β -ЛП, пре- β -ЛП, α -ЛП, флотирующие β .

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 ЛПВП₂, ЛПВП₃.

При этом по электрофоретической подвижности

ЛПОНП соответствует пре- β -ЛП,

ЛППП - флотирующим β

ЛПНП - β -ЛП,

ЛПВП - α -ЛП,

ХМ – остается на старте.

Чем меньше размер частиц **ХС ЛПНП**, тем выше их **атерогенность** (критерий, характеризующий риск развития атеросклероза) (рис. 3).



Рис. 3. Структура липопротеинов низкой плотности

- Повышение уровня ЛПНП на 10% сопровождается увеличением риска ишемической болезни сердца (ИБС) на 20%.
- Суммарный риск ИБС возрастает при сочетании с другими факторами риска:
 - низкий уровень ЛПВП,
 - курение,

- артериальная гипертония,
- сахарный диабет.

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
- Уровень ХС ЛПВП снижен при высоких триглицеридах, при курении, ожирении, гиподинамии.

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).

$$\text{Общий ХС} = \text{ХС ЛПНП} + \text{ХС ЛПОНП} + \text{ХС ЛПВП}$$

Расчет ХС ЛПОНП

$$\text{В моль/л ХС ЛПОНП} = \text{ТГ} / 2,2$$

$$\text{В мг/дл ХС ЛПОНП} = \text{ТГ} / 5$$

Расчет ХС ЛПНП

Формула Фридвальда - если уровень ТГ не превышает 4,5 ммоль/л

$$\text{В ммоль/л ХС ЛПНП} = \text{ОХС} - \text{ТГ} / 2,2 - \text{ХС ЛПВП}$$

$$\text{В мг/дл ХС ЛПНП} = \text{ОХС} - \text{ТГ} / 5 - \text{ХС ЛПВП}$$

Исследование липидного обмена

Правила взятия крови для исследования липидного обмена

1. Кровь для исследования следует брать утром натощак 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 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. Пробы хранить при температуре 0 – 4°C не более 3 суток (в процессе хранения пробы концентрация триглицеридов меняется под действием эндогенных липаз).

10. Определение липидного профиля проводить не менее 2 раз в разное время (с интервалом 2 недели), учитывать результаты не менее 2-х измерений.

Результаты анализа липидного спектра интерпретируются согласно табл. 7 – 8.

Таблица 7

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

Таблица 8

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 **дислипипротейнемиями** понимают такие изменения в липидном обмене, которые характеризуются повышением, снижением или полным отсутствием одного или двух классов ЛП.

- Абеталипипротейнемия.
- Гипобеталипипротейнемия.
- Гиперальфалипипротейнемия.
- Анальфалипипротейнемия.
- Семейная наследственная недостаточность ЛХАТ (лецитин-холестерин-ацетилтрансфераза).

Гиперлипипротейнемии (ГЛП)

Гиперлипипротейнемия – основной фактор риска ИБС, характеризующийся повышенным содержанием липидов и ЛП в сыворотке крови (табл. 9).

Таблица 9

Характеристики гиперлипопротеинемий

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	ЛППП	↑↑	↑↑	+++	<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) (табл. 10).

Таблица 10

Клиническая классификация гиперлипопротеинемий

Первичные гиперлипопротеинемии	Вторичные гиперлипопротеинемии
Полигенные гиперлипопротеинемии	Сахарный диабет
Моногенные гиперлипопротеинемии	Хронический алкоголизм
Семейная гиперхолестеринемия	Гипотиреоз
Семейная комбинированная гиперлипидемия	Обструктивные заболевания печени
Дисбеталипопротеинемия	Нефротический синдром
Семейная эндогенная гиперглицидемия	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 (рис. 4):

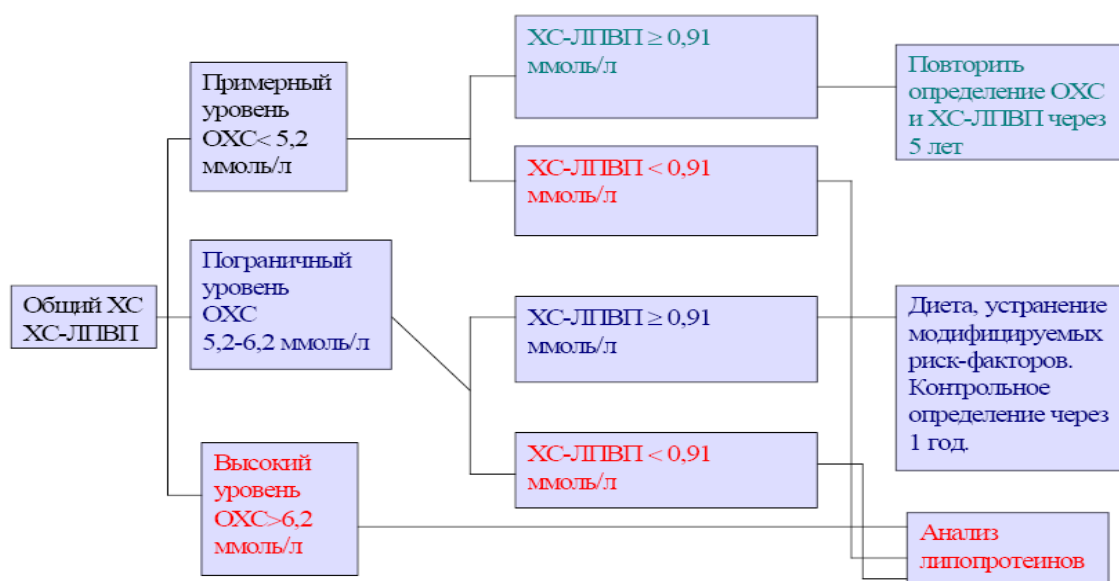


Рис. 4. Алгоритм оценки риска ИБС

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 (ИА) для оценки соотношения атерогенных и антиатерогенных ЛПП рассчитывается по формуле:

$$\text{ИА} = (\text{ОХС} - \text{ХС ЛПВП}) / \text{ХС ЛПВП}$$

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:

- Дислипотеинемии (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 фолациновый 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 (Бендитт, 1973, 1988).
- Инфекционная (Фабрикант К.Г., 1985).
- Нарушения активного транспорта и дефицита в клетках полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) (Титов В.Н., 1995).

При дефиците полиеновых жирных кислот, главным образом Ω -3 жирных кислот доминируют 2 процесса:

- изменение структуры и свойств мембран клеток и химической структуры биологически активных эйкозаноидов;
- патологическая компенсация, направленная на создание афизиологичного 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 (рис. 5).

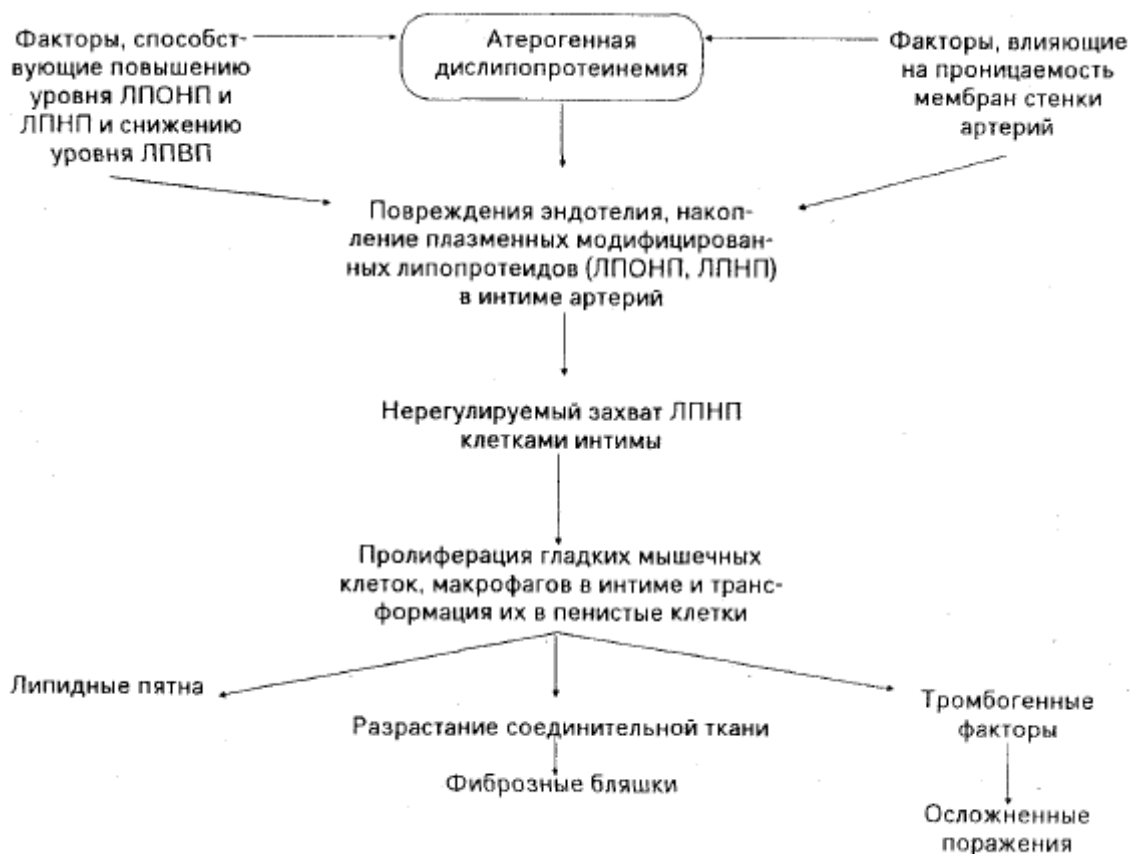


Рис. 5. Патогенез атеросклероза

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.

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) – атеросклеротическое поражение системы коронарных артерий, 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 факторы, которые могут привести к обострению ИБС:

- пищевые привычки;
- ожирение;
- 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.

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 (рис. 6).

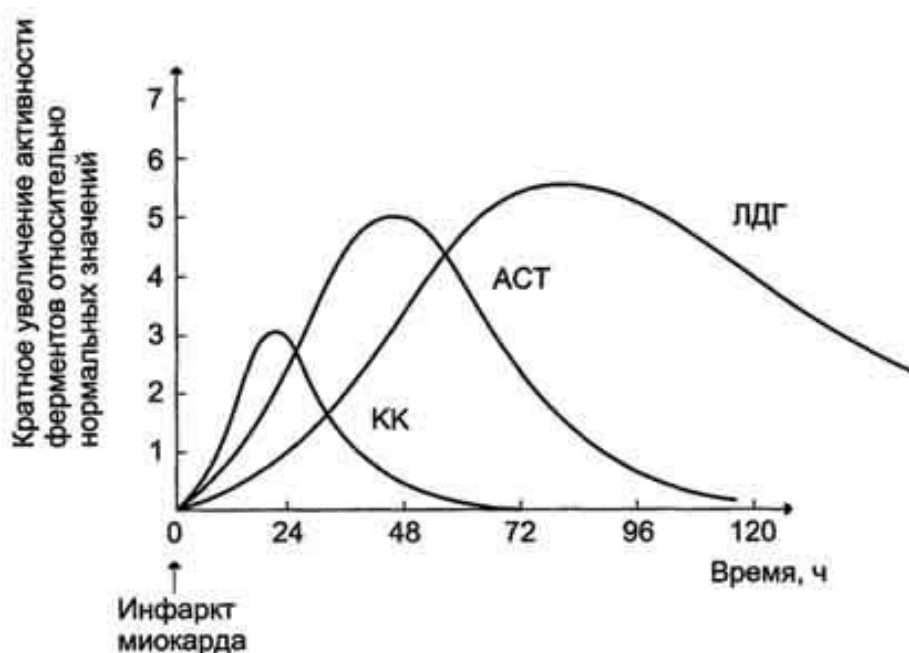


Рис. 6. Энзимодиагностика инфаркта миокарда

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.

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

1. МВ-фракция креатинкиназы (КК-МВ).

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.

Диагностическая значимость при ОИМ:

Увеличение наблюдается уже через 4 – 8 ч после острого приступа и достигает максимума через 12 – 24 ч, на третьи сутки активность фермента возвращается к нормальным значениям (при неосложненном течении ИМ). При расширении зоны ИМ активность КК-МВ повышена дольше, что позволяет диагностировать ИМ пролонгированного и рецидивирующего течения. Величина повышения КК-МВ соответствует величине пораженной зоны миокарда. Если в первые часы ИМ больному начали проводить тромболитическую терапию, то пик активности КК-МВ может появиться раньше, чем обычно, что объясняется более быстрым вымыванием фермента из пораженной зоны.

2. Миоглобин.

Гемсодержащий хромопротеид; легкая цепь миозина. Является белком, транспортирующим кислород в скелетных мышцах и миокарде.

Повышение уровня миоглобина в крови может свидетельствовать о таких патологиях, как:

- инфаркт миокарда;
- синдром длительного сдавления;
- тяжелый электрошок;
- термические ожоги;
- вторичная токсическая миоглобинурия;
- повреждение скелетных мышц;
- артериальная окклюзия с ишемией мышечной массы.

Диагностическая значимость при ИМ:

Повышение уровня белка в крови наблюдается уже через 2 – 3 ч после появления боли при ИМ и сохраняется 2 – 3 суток. Повторные повышения уровня миоглобина в крови на фоне уже начавшейся нормализации могут свидетельствовать о расширении зоны ИМ или образовании новых некротических очагов.

Тропонин I.

Входит в состав сократительной системы миоцита. Анализ повышения тропонина крови применяется при:

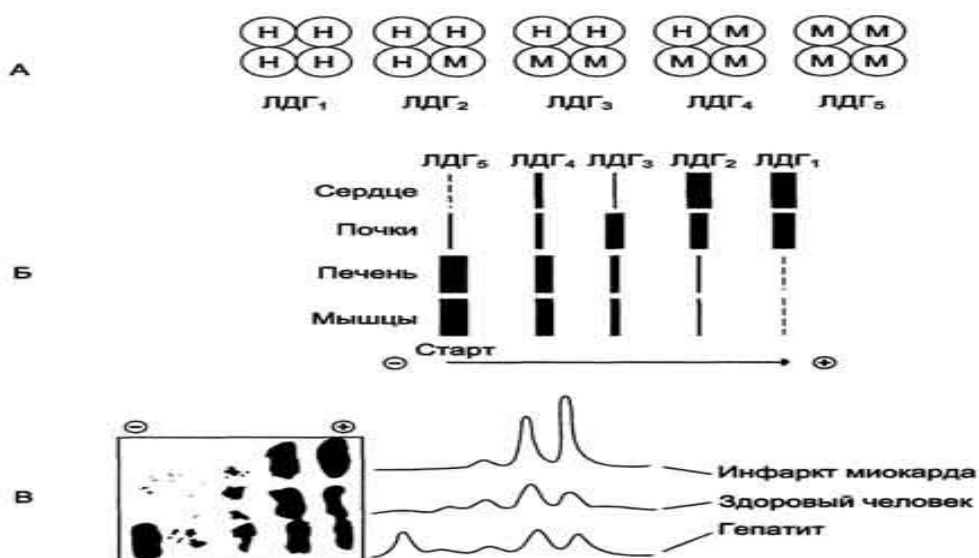
- диагностика ИМ;
- оценка реперфузии после применения тромболитической терапии;
- выделение групп высокого коронарного риска среди больных острым коронарным синдромом без подъема сегмента ST;
- выделение больных, получающих наибольший эффект от низкомолекулярных гепаринов.

Диагностическая значимость при ИМ:

Повышение уровня тропонина I в крови отмечается через 4 – 6 ч после острого приступа, достигает максимума на 2-й день и возвращается к норме между 6 и 8-ми сутками. Интервал абсолютной диагностической чувствительности для тропонинов при ОИМ составляет 125 – 129 ч. Специфичность методов определения тропонинов в крови при ИМ составляет 90% и превосходит специфичность для КК, ЛДГ и миоглобина.

4. Лактатдегидрогеназа (ЛДГ).

Изоферменты: ЛДГ 1 и 2 локализуются в сердце, ЛДГ 3 и 4 локализуются в легких, ЛДГ 5 локализуется в печени.



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.

3. Аланинаминотрансфераза (АЛАТ), аспартатаминотрансфераза (АсАТ).

Уровень аминотрансфераз в крови повышается при повреждении печени и миокарда.

В норме соотношение активностей АсАТ/АЛАТ (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.

4. С-реактивный белок (СРБ).

Белок острой фазы, синтезируется в печени.

Уровень СРБ в крови повышается при повреждении тканей (воспаление, травма). Концентрация СРБ 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 интима сосуда и проспективно определяет риск развития сосудистых осложнений.

5. Прочие маркеры:

- Натрийуретические пептиды (мозговой, предсердный).
- Белок, связывающий жирные кислоты, сердечная форма (Н-ФАВР).
- Гомоцистеин.
- Цитокины.

- Гемостатические факторы.
- Молекулы адгезии.
- Каспазы.
- Липидный спектр.

При подозрении на заболевания сердечнососудистой системы проводятся обязательные и дополнительные лабораторные исследования (табл. 11).

Таблица 11

Обязательные и дополнительные 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, коагулограмма, белки острой фазы, мочевая кислота, мочевины, холинэстераза.	Аполипопротеин А, миоглобин в крови и моче, глюкоза, тест толерантности к глюкозе, электролиты (К, Na, Ca, Cl), гликопротеины, сиаловые кислоты, кислотно-основное состояние.
Гипертоническая болезнь	Мочевина, креатинин, мочевая кислота, холестерин и его фракции, индекс атерогенности, холинэстераза, триглицериды, электролиты (К, 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),	Свободные жирные кислоты, глюкоза (в крови и моче), ренин.

	ванилил-миндальная кислота (в моче);	
	первичный альдостеронизм – К, Na, альдостерон, ренин;	17-оксикортикостероиды, ангиотензин-І.
	гиперкортицизм – адренокортикотропный гормон.	Глюкоза, тест толерантности к глюкозе, ренин, ангиотензин-І.
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 (К, Na, Са, 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 MB, 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.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

1. Записать протокол практического занятия с указанием его цели и задач, классификации липидов, липопротеинов, таблицы интерпретации исследований липидного спектра, занести в протокол таблицу «Основные кардиомаркеры и их диагностическая значимость».
2. Рассмотреть клинические случаи. Дать заключение с внесением в протокол.

5. Тема занятия: Лабораторные исследования системы гемостаза.

Цель занятия: Ознакомиться с основными тестами исследования сосудисто-тромбоцитарного, коагуляционного гемостаза, противосвертывающей системы, фибринолитической системы, а также с методами определения физиологических антикоагулянтов.

Перечень знаний и практических навыков:

- Иметь представление о свертывающей системе крови, основных компонентах системы гемостаза.
- Знать основные лабораторные исследования системы гемостаза.
- Знать показатели и методы оценки сосудисто-тромбоцитарного, коагуляционного гемостаза и фибринолиза.
- Уметь оценить показатели системы гемостаза.

Гемостаз – это функция организма, обеспечивающая, с одной стороны, сохранение крови в кровеносном русле в жидком агрегатном состоянии, а с другой стороны – остановку кровотечения и предотвращение кровопотери при повреждении кровеносных сосудов. Органы и ткани, участвующие в выполнении этих функций, образуют систему гемостаза. Элементы системы гемостаза участвуют также в таких важных процессах жизнедеятельности, как воспаление, репарация тканей, поддержание гомеостаза и др. Система гемостаза активно реагирует на различные экзогенные и эндогенные воздействия, может иметь врожденные и приобретенные функциональные нарушения – «болезни системы гемостаза».

Составляющие систему гемостаза компоненты условно можно разделить на морфологические и функциональные.

Морфологические компоненты системы гемостаза:

- Сосудистая стенка.
- Тромбоциты и клеточные элементы крови.
- Плазменные компоненты – белки, пептиды и небелковые медиаторы гемостаза, цитокины, гормоны.
- Костный мозг, печень, селезенка тоже могут рассматриваться как

компоненты системы гемостаза, поскольку в них синтезируются и пулируются тромбоциты и плазменные компоненты системы гемостаза.

Функциональные компоненты системы гемостаза:

- Прокоагулянты.
- Ингибиторы коагуляции, антикоагулянты.
- Профибринолитики.
- Ингибиторы фибринолиза.

Сохранение общей активности гемостаза в физиологических пределах можно определить как поддержание **гемостатического баланса**. При смещении гемостатического баланса за рамки физиологических норм возникают условия для развития патологических кровотечений или тромбозов.

Хотя механизмы работы системы гемостаза сложны, итог нормальной ее работы прост. При отсутствии повреждения система препятствует свертыванию крови. При возникновении повреждения запускается процесс остановки кровотечения: происходит спазм сосуда, в зоне повреждения начинается процесс свертывания крови. Через короткое время сформированный гемостатический тромб закрывает повреждение и прекращает кровопотерю. На поврежденном участке, защищенном тромбом, происходят процессы репарации. По мере восстановления повреждения тромб лизируется. Система гемостаза возвращается в исходное состояние.

Кровотечение и особенно тромбоз могут быть смертельно опасны для организма. Эти состояния легче предотвратить, чем лечить. Все это диктует необходимость лабораторной оценки состояний системы гемостаза.

В свёртывании крови различают два звена: *клеточный (сосудисто-тромбоцитарный)* и *плазменный (коагуляционный)* гемостаз.

- Под клеточным гемостазом понимают адгезию клеток (то есть взаимодействие клеток с чужеродной поверхностью, в том числе и с клетками иного вида), агрегацию (склеивание одноименных клеток крови между собой), а также высвобождение из форменных элементов веществ, активирующих плазменный гемостаз.

- Плазменный (коагуляционный) гемостаз представляет собой каскад реакций, в которых участвуют факторы свёртывания крови, завершающийся процессом образования фибрина. Образовавшийся фибрин подвергается далее разрушению под влиянием плазмина (фибринолиз).

В организме эти два звена свёртывающей системы крови тесно связаны и не могут функционировать отдельно.

Сосудисто-тромбоцитарный гемостаз

Очень важную роль в осуществлении реакций гемостаза играет сосудистая стенка. Эндотелиальные клетки сосудов способны синтезировать и/или экспрессировать на своей поверхности различные биологически активные вещества, модулирующие тромбообразование. К ним относятся фактор фон Виллебранда, эндотелиальный фактор релаксации (оксид азота), простаглицлин, тромбомодулин, эндотелин, активатор плазминогена тканевого типа, ингибитор активатора плазминогена тканевого типа, тканевой фактор (тромбопластин), ингибитор пути тканевого фактора и некоторые другие.

Кроме того, мембраны эндотелиоцитов несут на себе рецепторы, которые при определённых условиях опосредуют связывание с молекулярными лигандами и клетками, свободно циркулирующими в кровотоке.

При отсутствии каких-либо повреждений выстилающие сосуд эндотелиальные клетки обладают тромборезистентными свойствами, что способствует поддержанию жидкого состояния крови.

Тромборезистентность эндотелия обеспечивают:

- контактная инертность внутренней (обращённой в просвет сосуда) поверхности клеток;
- синтез мощного ингибитора агрегации тромбоцитов – простаглицлина;
- наличие на мембране эндотелиоцитов тромбомодулина, который связывает тромбин; при этом последний утрачивает способность вызывать свёртывание крови, но сохраняет активирующее действие на систему двух важнейших физиологических антикоагулянтов – протеинов С и S;

- высокое содержание на внутренней поверхности сосудов мукополисахаридов и фиксация на эндотелии комплекса гепарин-антитромбин III (АТIII);

- способность секретировать и синтезировать тканевой активатор плазминогена, обеспечивающий фибринолиз;

- способность стимулировать фибринолиз через систему протеинов С и S.

Нарушение целостности сосудистой стенки и/или изменение функциональных свойств эндотелиоцитов могут способствовать развитию протромботических реакций – антитромботический потенциал эндотелия трансформируется в тромбогенный.

Причины, приводящие к травме сосудов:

- экзогенные (механические повреждения, ионизирующее излучение, гипер- и гипотермия, токсические вещества, в том числе и лекарственные средства, и т.п.);

- эндогенные факторы. К ним относятся биологически активные вещества (тромбин, циклические нуклеотиды, ряд цитокинов и т.п.), способные при определённых условиях проявлять мембраноагрессивные свойства. Такой механизм поражения сосудистой стенки характерен для многих заболеваний, сопровождающихся склонностью к тромбообразованию.

После повреждения сосудов последовательно запускаются этапы сосудисто-тромбоцитарного гемостаза.

1. Рефлекторный спазм сосудов (обусловлен выделением тромбоцитами сосудосуживающих веществ (серотонина, адреналина, тромбоксана) в месте повреждения сосуда). Спазм сосудов развивается довольно быстро, но через несколько минут может прекратиться, и кровотечение возобновится.

2. Адгезия – приклеивание тромбоцитов к месту повреждения. В инициации этого процесса ведущая роль принадлежит волокнам коллагена, к которым прилипают отрицательно заряженные тромбоциты. При этом тромбоцит меняет свою форму и выбрасывает длинные ниточные отростки - псевдоподии. Важнейшим плазменным фактором адгезии тромбоцитов

является гликопротеид, синтезируемый эндотелием сосудов, т.е. фактор Виллебранда (он накапливается также и в тромбоцитах).

3. Обратная агрегация (скопление) тромбоцитов. Появление нитечных отростков, изменение формы тромбоцитов происходит еще при подходе к месту повреждения. Это способствует «склеиванию» тромбоцитов друг с другом (по 10-20) и прилипание в таком виде к стенке сосуда. Процесс агрегации ускоряет выделение из разрушенных тромбоцитов АДФ, адреналина, арахидоновой кислоты, простагландинов. Вследствие этого формируется первичный, так называемый белый тромб, который прикрывает поврежденный участок. Но он еще не плотный и может пропускать плазму крови.

4. Необратимая агрегация тромбоцитов – следующий этап превращения белого тромба. Основным стимулятором укрепления тромба является тромбин.

5. Ретракция тромбоцитарного тромба. Из разрушенных тромбоцитов получается пластинчатый фактор (ПФ-6) – тромбостенин. ПФ-6 напоминает актомиозин. Он способен сокращаться и тем самым уменьшать размер и уплотнять сгусток. В агрегации тромбоцитов также участвуют небелковые (Ca^{2+} , Mg^{2+}) и белковые плазменные кофакторы (альбумин, фибриноген и др.).

Все эти процессы происходят сравнительно быстро, поэтому кровотечение из небольших ран останавливается в течение нескольких минут.

В крупных сосудах тромбоцитарный тромб не выдерживает высокого давления и вымывается. Поэтому в крупных сосудах гемостаз может быть осуществлен путем формирования более прочного фибринового тромба, для образования которого необходим ферментативный коагуляционный механизм.

Плазменный (коагуляционный) гемостаз

Свертывание крови – это цепной ферментативный процесс, в котором последовательно происходит активация факторов свертывания и образование их комплексов. Сущность свертывания крови заключается в переходе растворимого белка крови фибриногена в нерастворимый фибрин, в результате чего образуется прочный фибриновый тромб.

Процесс свертывания крови осуществляется в 3 последовательные фазы.

Первая фаза является самой сложной и продолжительной. Во время этой фазы происходит образование активного ферментативного комплекса – протромбиназы, являющейся активатором протромбина. В образовании этого комплекса принимают участие тканевые и кровяные факторы. В результате формируются тканевая и кровяная протромбиназы. Образование тканевой протромбиназы начинается с активации тканевого тромбопластина, образующегося при повреждении стенок сосуда и окружающих тканей. Вместе с VII фактором и ионами кальция он активирует X фактор. В результате взаимодействия активированного X фактора с V фактором и с фосфолипидами тканей или плазмы образуется тканевая протромбиназа. Этот процесс длится 5 – 10 секунд.

Образование кровяной протромбиназы начинается с активации XII фактора при его контакте с волокнами коллагена поврежденных сосудов. В активации и действии XII фактора участвуют также высокомолекулярный кининоген (ф XV) и калликреин (ф XIV). Затем XII фактор активирует XI фактор, образуя с ним комплекс. Активный XI фактор совместно с IV фактором активирует IX фактор, который, в свою очередь, активирует VIII фактор. Затем происходит активация X фактора, который образует комплекс с V фактором и ионами кальция, чем и заканчивается образование кровяной протромбиназы. В этом также участвует тромбоцитарный фактор 3. Этот процесс длится 5 – 10 минут.

Вторая фаза. Во время этой фазы под влиянием протромбиназы происходит переход протромбина в активный фермент тромбин. В этом процессе принимают участие факторы IV, V, X.

Третья фаза. В эту фазу растворимый белок крови фибриноген превращается в нерастворимый фибрин, образующий основу тромба. Вначале под влиянием тромбина происходит образование фибрин-мономера. Затем с участием ионов кальция образуется растворимый фибрин-полимер (фибрин «S», soluble). Под влиянием фибринстабилизирующего фактора XIII происходит образование нерастворимого фибрин-полимера (фибрин «I», insoluble), устойчивого к фибринолизу. В фибриновых нитях оседают

форменные элементы крови, в частности эритроциты, и формируется кровяной сгусток, или тромб, который закупоривает рану.

После образования сгустка начинается *процесс ретракции*, т.е. уплотнения и закрепления тромба в поврежденном сосуде. Это происходит с помощью сократительного белка тромбоцитов тромбостенина и ионов кальция. Через 2 – 3 часа сгусток сжимается до 25 – 50% от своего первоначального объема и идет отжатие сыворотки, т.е. плазмы, лишенной фибриногена. За счет ретракции тромб становится более плотным и стягивает края раны.

Фибринолиз

Фибринолиз – это процесс расщепления фибринового сгустка, в результате которого происходит восстановление просвета сосуда. Фибринолиз начинается одновременно с ретракцией сгустка, но идет медленнее. Это тоже ферментативный процесс, который осуществляется под влиянием *плазмина (фибринолизина)*. Плазмин находится в плазме крови в неактивном состоянии в виде пламиногена. Под влиянием кровяных и тканевых активаторов пламиногена происходит его активация. Высокоактивным тканевым активатором является урокиназа. Кровяные активаторы находятся в крови в неактивном состоянии и активируются адреналином, лизокиназами. Плазмин расщепляет фибрин на отдельные полипептидные цепи, в результате чего происходит лизис (растворение) фибринового сгустка,

Если нет условий для фибринолиза, то возможна организация тромба, т.е. замещение его соединительной тканью. Иногда тромб может оторваться от места своего образования и вызвать закупорку сосуда в другом месте (эмболия).

У здоровых людей активация фибринолиза всегда происходит вторично в ответ на усиление гемокоагуляции. Под влиянием ингибиторов фибринолиз может тормозиться.

В клинической практике исследование системы гемостаза преследует следующие цели:

- диагностика нарушений системы гемостаза;

- выяснение допустимости оперативного вмешательства при выявленных нарушениях в системе гемостаза;

- проведение контроля за лечением антикоагулянтами прямого и непрямого действия, а также тромболитической терапией.

Преаналитический этап исследования гемостаза заключается в адекватном назначении анализов, выборе информативных методик при обязательном учете клинических симптомов.

Кровь забирают утром натощак широкой иглой (более 0,7 мм), наложение жгута на менее 1 мин, иначе повышается фибринолиз, первые 2 – 3 мл крови используют для получения сыворотки, и далее кровь забирают в вакуумные пробирки при соотношении крови и цитрата натрия (антикоагулянт, связывающий Ca^{2+}) 9/1. Следует особо учитывать гематокрит при НСТ=35 – 50%, т.е. 0,5 мл цитрата + крови до 5 мл.

Сосудистый компонент гемостаза

Показатели, характеризующие сосудистый компонент гемостаза:

- **Проба щипка.** Собирают под ключицей кожу в складку и делают щипок. У здоровых людей никаких изменений на коже не возникает ни сразу после щипка, ни через 24 ч. Если резистентность капилляров нарушена, на месте щипка появляются петехии или кровоподтёк, особенно отчётливо видимые через 24 ч.

- **Проба жгута.** Отступив на 1,5 – 2,0 см вниз от ямки локтевой вены, очерчивают круг приблизительно 2,5 см в диаметре. На плечо накладывают манжетку тонометра и создают давление 80 мм рт.ст в течение 5 мин. В очерченном круге подсчитывают все появившиеся петехии. У здоровых лиц петехии не образуются или их не более 10 (отрицательная проба жгута). При нарушении резистентности стенки капилляров количество петехий после проведения пробы резко возрастает.

Тромбоцитарный компонент гемостаза

Показатели, характеризующие тромбоцитарный компонент гемостаза:

- 1. Время (длительность) кровотечения.** Этот показатель характеризует функциональную активность тромбоцитов и их взаимодействие с сосудистой стенкой. Фактически это время от момента нанесения стандартной раны кожи

до момента прекращения вытекания крови, т. е. время остановки кровотечения. В норме для формирования первичного тромбоцитарного тромба, т. е. первичной остановки кровотечения, организму необходимо от 2 до 4 мин.

Наиболее распространенным лабораторным тестом, отражающим этот процесс, является определение времени кровотечения по Дукке (определение длительности кровотечения из микрососудов без дополнительной компрессии). Существуют также методы определения времени кровотечения на фоне венозного стаза (сдавление плеча манжетой до 40 мм рт. ст. с проколами или надрезами кожи предплечья) – пробы Айви, Борхгревинка и др.

Принцип метода определения времени кровотечения по Дукке: фиксируется время остановки кровотечения из капилляров и венул кожи, целостность которых нарушается строго дозированно с помощью плоского ланцета для получения крови из пальца или специального скарификатора с ограничителем глубины разреза. Выступающие капли крови промокают каждые 15 – 30 сек фильтровальной бумагой, не прикасаясь к ране. Время засекается с помощью секундомера. Как только наступает момент, когда фильтровальная бумага становится чистой, т. е. прекращается образование новых капель крови, секундомер выключают и определяют общую длительность кровотечения, а также оценивают размеры капель. Референсные значения: 2 – 4 минуты.

Увеличение времени кровотечения наблюдается при выраженных тромбоцитопениях или/и тяжелых нарушениях их функции (тромбоцитопатиях).

2. Определение количества тромбоцитов. Наибольшее распространение в настоящее время получили три метода подсчета тромбоцитов в крови:

- подсчет в камере Горяева;
- подсчет в мазках крови;
- электронно-автоматический метод.

Референсные значения: $180 - 380 \times 10^9/\text{л}$.

Метод подсчета тромбоцитов в камере Горяева проводится по стандартной методике с учетом разведения крови и объема большого квадрата счетной сетки Горяева с применением фазово-контрастного микроскопа для лучшего контрастирования тромбоцитов. Он является наиболее точным, но достаточно трудоемким.

Метод подсчета тромбоцитов в окрашенных мазках крови по Фонио основан на подсчете числа тромбоцитов на 1000 эритроцитов с последующим пересчетом на 1 л крови. Кровь смешивают с раствором магнезии сульфата или ЭДТА. Мазки готовят на предметных стеклах и окрашивают их по Романовскому-Гимзе. В каждом поле зрения микроскопа подсчитывают число эритроцитов и тромбоцитов, передвигая мазок до тех пор, пока не будут просчитаны 1000 эритроцитов. Зная число эритроцитов в 1 л крови, рассчитывают количество тромбоцитов в этом объеме. Однако следует учитывать, что у больных с анемией достоверность полученного результата выглядит весьма сомнительно.

Автоматический метод подсчета тромбоцитов с использованием современных электронных приборов значительно облегчает и ускоряет исследование, в связи с чем находит в последние годы все большее распространение в клинической практике.

3. Тромбоцитарные индексы. При проведении исследования тромбоцитов аппаратным методом помимо их количества вычисляют тромбоцитарные индексы (MPV, PDV – тромбоцитарную гистограмму и PCT).

MPV (mean platelet volume – средний объем тромбоцитов) увеличивается с возрастом: с 8,6 – 8,9 фл у детей 1 – 5 лет до 9,5 – 10,6 фл у людей старше 70 лет. «Молодые» (юные) кровяные пластинки имеют больший объем, поэтому при ускорении тромбоцитопоэза средний объем тромбоцитов возрастает. Единицы измерения: фемтолитр (фл, fL; 1 фл = 1 мкм³). Референсные значения: 7,0 – 11,0 фл.

PDV (platelet distribution width – ширина распределения тромбоцитов по объему) количественно отражает гетерогенность популяции этих клеток по размерам, т. е. степень анизоцитоза тромбоцитов. Наличие в крови

преимущественно молодых форм приводит к сдвигу гистограммы вправо, старые клетки располагаются в гистограмме слева. Референсные значения: 15,0 – 17,0%.

PCT (platelet crit – тромбоцит) является параметром, который отражает долю объема цельной крови, занимаемую тромбоцитами. Он аналогичен гематокриту. Референсные значения: 0,108 – 0,282%.

4. Агрегацию тромбоцитов исследуют в обогащенной тромбоцитами плазме крови с помощью специальных фотометров (агрегомеров) макро- или микроскопически – путем подсчета тромбоцитарных агрегатов и свободнолежащих тромбоцитов (качественные методы).

Принципы определения агрегационной активности основываются на регистрации агрегации по изменению оптической плотности богатой тромбоцитами плазмы (оптические или турбодиметрические агрегометры) и электропроводности в цельной крови (кондуктометрические агрегометры). Агрегационную функцию тромбоцитов определяют при воздействии различных физиологических агрегирующих (индуцирующих) агентов. Для исследования индуцированной агрегации тромбоцитов используют физиологические индукторы, такие как тромбин, адреналин, АДФ, коллаген и др. или специальные индукторы, такие как ристоцетин (ристомин).

Повышение агрегационной активности тромбоцитов характерно для претромботических состояний, идиопатического тромбоцитоза, тромбозов, инфарктов органов, атеросклероза, васкулитов, а также беременности. Снижение агрегации наблюдается при первичных (врожденных) и вторичных (симптоматических) тромбоцитопатиях, в том числе и при лечении дезагрегантами.

Плазменно-коагуляционное звено гемостаза

Показатели, характеризующие первую фазу:

- Время свертывания крови.
- Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ).
- Активность XII фактора.
- Активность XI фактора.
- Активность IX фактора.
- Активность VIII фактора.

- Активность X фактора.

Показатели, характеризующие вторую фазу:

- Протромбиновое время.
- Активность V фактора.
- Активность VII фактора.
- Активность II фактора.

Показатели, характеризующие третью фазу:

- Концентрация фибриногена в плазме.
- Активность XIII фактора в плазме.
- Тромбиновое время.

Противосвертывающая система

Сохранение крови в жидком состоянии во многом определяется наличием в кровотоке естественных веществ, обладающих антикоагулянтной активностью, которые постоянно синтезируются в организме и с определенной скоростью выделяются в кровоток. К ним относятся: антитромбин III, гепарин, протеины C и S, ингибитор тканевого пути свертывания – TFPI, α_2 – макроглобулин, антитрипсин и др.

В процессе свертывания крови, фибринолиза из факторов свертывания и других белков также образуются вещества, обладающие антикоагулянтной активностью. Антикоагулянты оказывают выраженное действие на все фазы свертывания крови, поэтому исследование их активности при нарушениях свертывания крови очень важно.

Показатели, характеризующие состояние антикоагулянтов:

- Антитромбин III.
- Гепарин.
- Активированное время свертывания крови.
- Протеин C.
- Протеин S.

Существенная сторона гемостаза – ингибирование процесса свертывания крови. Ингибиторы сохраняют жидкое состояние крови в циркуляции, препятствуют переходу локального тромбообразования в распространенное. Известны две группы естественных ингибиторов свертывания крови:

1. Первичные, предшествующие свертыванию крови
2. Вторичные, образующиеся в процессе свертывания крови, группа протеолиза.

Антитромбин III является наиболее мощным ингибитором свертывания, действующим не только как антитромбин, но и как инактиватор факторов Ха, IXa, XIa, XIIa, VIIa, V. На антитромбин III и его фактор – гепарин приходится 4/5 физиологической антикоагулянтной активности. В семьях с наследственным дефицитом антитромбина III имеется выраженная склонность к тромбозам (тромбофилия). В процессе гемостаза образуются дополнительные антикоагулянты в виде "отработанных" факторов свертывания крови: мощный антикоагулянт фибрин ("антитромбин 1"), адсорбирующий и инактивирующий большое количество тромбина; продукты фибринолиза, также являющиеся антикоагулянтами, делают молекулы фибриногена недоступными воздействию тромбина. Поэтому, определение в плазме продуктов расщепления фибриногена и фибрина имеет значение в распознавании ДВС – синдрома. В патологических условиях могут накапливаться мощные иммунные ингибиторы свертывания крови, специфические антитела против того или иного фактора, например ингибиторы факторов 8 и 9 при гемофилии.

Фибринолитическая (плазминовая) система

Показатели, характеризующие плазминовую систему:

- Плазминоген.
- Альфа-2-антиплазмин.
- Альфа-1-антитрипсин.
- Продукты деградации фибриногена и фибрина.
- D-димер.

Скрининговые тесты для оценки плазменного звена гемостаза

Лабораторная диагностика нарушений системы гемостаза является одной из самых дорогостоящих в лабораторной практике. Поэтому чрезвычайно важно соблюдать этапность проведения тестов, исходить из клинических данных и анамнеза пациента. На первом этапе для уточнения направленности нарушений необходимо провести тесты, отражающие состояние целых звеньев системы гемостаза. Поскольку в разных лабораториях при анализе гемостаза преследуются разные цели, перечень тестов, входящих в гемостатический скрининг для данной лаборатории, может отличаться от такового в других лабораториях. Однако существует набор рекомендуемых тестов, традиционно называемых скрининговыми для диагностики состояния системы гемостаза.

Скрининговые тесты:

- АПТВ (активированное парциальное тромбопластиновое время)
- протромбиновое время (по Квику)
- тромбиновое время и/или фибриноген

Скрининговые тесты на состояние внутреннего и внешнего каскада активации протромбиназы позволяют выявлять нарушения со стороны факторов-субстратов, кофакторов, ингибиторов каскада свертывания, а также действие некоторых лекарственных препаратов или аутоантител. Основным тестом на состояние внутреннего каскада свертывания плазмы является АПТВ, на состояние внешнего каскада - протромбиновое время.

Активированное парциальное (частичное) тромбопластиновое время (АПТВ)

АПТВ используется как скрининговый тест для оценки внутреннего каскада свертывания плазмы, скрининговой диагностики волчаночного антикоагулянта и слежения за антикоагулянтным действием гепаринов. Референсные значения АПТВ: 28,6 – 33,6 с.

Укорочение АПТВ наблюдается при: активация внутреннего механизма свертывания при тромбозах, тромбоэмболиях (связано с резистентностью фактора V к активированному протеину С, повышенным уровнем фактора VIII или активированных факторов свертывания); при ДВС-синдроме

(гиперкоагуляционная фаза); возможно при нормально протекающей беременности.

Удлинение АПТВ: дефицит факторов внутреннего пути свертывания (VIII – гемофилия А, IX – гемофилия В, XI, XII) при нормальных результатах протромбинового теста; дефицит факторов II, V, X в случае сопутствующей гипокоагуляции в протромбиновом тесте; дефицит фактора Виллебранда; гепаринотерапия; лечение антикоагулянтами непрямого действия; ДВС-синдром; на фоне переливаний реополиглокина; наличие волчаночного антикоагулянта; мутация фактора IX; дефекты при получении крови для исследования (гемолиз, передозировка цитрата натрия, забор крови из гепаринизированного катетера).

Протромбиновое время

Протромбиновое время (ПВ) – широко используемый скрининговый тест для оценки внешнего каскада свертывания плазмы. ПВ обычно используется для определения активности ф. VII, контроля за лечением непрямыми антикоагулянтами, при скрининге системы гемостаза, а также для количественного определения фибриногена в автоматических коагулометрах. Референсные значения ПВ: 9,2 – 12,2 с.

Укорочение ПВ: активация внешнего механизма свертывания при различных видах внутрисосудистого свертывания крови; последние недели беременности, прием пероральных контрацептивов.

Удлинение ПВ: дефицит или аномалия факторов протромбинового комплекса (VII, X, V,II) в случаях приема антикоагулянтов непрямого действия; болезни печени и желчевыводящей системы; лечение нефракционированным гепарином; ДВС-синдром; на фоне переливаний реополиглокина, препаратов гидроксиэтилкрахмала; наличие в крови волчаночного антикоагулянта; дефекты при получении крови для исследования (гемолиз, передозировка цитрата натрия, забор крови из гепаринизированного катетера).

Протромбин по Квику (%) как и протромбиновый индекс, позволяет определять активность протромбинового комплекса плазмы пациента в сравнении с измеренным протромбиновым временем контрольной плазмы. Но при этом расчет проводится по кривой зависимости протромбинового времени

от % содержания факторов протромбинового комплекса, построенной с использованием разных разведений контрольной плазмы.

МНО (Международное нормализованное отношение), латинская аббревиатура **INR (International Normalized Ratio)** - дополнительный способ представления результатов протромбинового теста, рекомендованный для контроля терапии непрямыми антикоагулянтами. МНО рассчитывается по формуле:

$$\text{МНО} = \left(\frac{\text{протромбиновое время пациента}}{\text{протромбиновое время донора}} \right)^{\text{ISI}}$$

где ISI (International Sensitivity Index of thromboplastin), он же МИЧ (международный индекс чувствительности) – показатель чувствительности тромбопластина, стандартизирующий его относительно международного стандарта. МНО – математическая коррекция, при помощи которой производится стандартизация протромбинового времени, что позволяет сравнивать результаты, полученные в разных лабораториях.

МНО и протромбин по Квику коррелируют отрицательно – снижение протромбина по Квику соответствует повышению МНО.

Тромбиновое время

Тромбиновое время (ТВ) – определение тромбинового времени является третьим по значимости базисным скрининговым тестом. Тест характеризует конечный этап процесса свертывания – превращение фибриногена в фибрин под действием тромбина, на него влияет концентрация фибриногена в плазме и наличие продуктов деградации фибрина. Референсные значения ТВ: 18 – 24 с.

Укорочение ТВ: гиперфибриногенемия (фибриноген 6,0 г/л и выше); начальная фаза острого и подострого ДВС-синдрома.

Удлинение ТВ: гепаринотерапия обычным гепарином; гипофибриногенемия (фибриноген ниже 1,0 г/л) в случаях развития острого ДВС-синдрома и при тромболитической терапии; влияние других ингибиторов полимеризации фибрин-мономера (парапротеины, миеломные белки и др.);

дефекты при получении крови для исследования (гемолиз, передозировка цитрата натрия, забор крови из гепаринизированного катетера).

Концентрация фибриногена в плазме

Количественное определение фибриногена по методу Клаусса является базисным тестом исследования гемостаза. Образование фибрина и его стабилизация представляют собой финальный этап формирования тромба, при котором растворимый фибриноген превращается в нерастворимый фибрин под действием тромбина и фактора XIII.

Фибриноген – острофазный белок. Концентрация его может превышать 10 г/л при тяжелых бактериальных инфекциях, при травме и тромбозе. К значительному росту фибриногена приводят заболевания почек (пиелонефрит, гломерулонефрит, гемолитико-уремический синдром), коллагенозы (ревматоидный артрит, узелковый периартериит), пароксизмальная ночная гемоглобинурия, новообразования (рак легкого). При атеросклерозе наблюдается устойчивое увеличение уровня фибриногена, трудно корригируемое лекарственными препаратами. Референсные значения фибриногена: 2,75 – 3,65 г/л

Снижение концентрации фибриногена: острый ДВС-синдром; дисфибриногенемии.

Повышение концентрации фибриногена: инфекционные, воспалительные и аутоиммунные процессы; подострый и хронический ДВС-синдром; нормально протекающая беременность.

Методы определения физиологических антикоагулянтов

Протеин С.

Для определения протеина С разработано несколько методов:

1. Метод с использованием хромогенного субстрата.
2. Коагуляционный метод.
3. Иммунохимический метод,

Активность протеина С следует определять до начала лечения антикоагулянтами непрямого действия и контролировать во время лечения. Референсные значения протеина С: 94 – 124%.

Повышение протеина С отмечается во время беременности.

Снижение протеина С: врожденный (наследственный) дефицит или аномалии протеина С; геморрагическая болезнь новорожденных; заболевания печени с нарушением ее функции; ДВС-синдром; нефротический синдром; синдром острой дыхательной недостаточности; менингококковый сепсис; гемодиализ; лечения пероральными (непрямыми) антикоагулянтами (дефицит витамина К); послеродовый и послеоперационный период.

Протеин S

Протеин S – витамин-К-зависимый белок, который является кофактором активированного протеина С. Референсные значения протеина S: 81 – 111%.

Для определения протеина S применяются методы:

1. Коагуляционный метод.
2. Иммунохимический метод,

Уменьшение содержания (активности) протеина S: врожденный (наследственный) дефицит; врожденное (наследственное) уменьшение свободной фракции протеина S; заболевания печени с нарушением ее функции; ДВС-синдром; нефротический синдром; системная красная волчанка; лечение пероральными (непрямыми) антикоагулянтами; прием эстрогенов (пероральных контрацептивов); беременность, послеродовый период; наличие аутоантител к протеину S.

Антитромбин III

Для определения активности антитромбина III (АТ) чаще всего используют *метод с хромогенным субстратом*. Антитромбин расщепляет субстрат, в результате чего образуется окрашенный продукт, количество которого зависит от исходной активности антитромбина III. Существуют также иммунохимические (турбидиметрия, нефелометрия) и коагуляционные методы.

Тест может применяться для мониторинга лечения гепарином. Длительная гепаринотерапия может приводить к снижению активности АТ в плазме. Лечение высокими дозами гепарина, особенно нефракционированным гепарином, приводит к транзиторному снижению АТ по механизму потребления, особенно у больных с тяжелой патологией, при критических

состояниях, при ДВС-синдроме, сепсисе, злокачественных опухолях. У новорожденных уровень АТ составляет около 50 % и достигает уровня взрослых к 6 мес. Референсные значения АТ: 86 – 116%.

Увеличение содержания (активности) АТ наблюдается во время менструации; при острых вирусных гепатитах, холестазе; приеме анаболических стероидов; лечении пероральными (непрямыми) антикоагулянтами.

Тесты для исследования фибринолитической системы

Наиболее распространенные в клинической практике методы оценки состояния фибринолитической системы основаны на:

- 1) исследовании времени и степени лизиса (растворения) сгустков крови или эуглобулиновой фракции плазмы (общеоценочные пробы);
- 2) определении концентрации плазминогена, его активаторов и ингибиторов (ТАП; ПАИ-1; α 2-антиплазмин).

Время лизиса эуглобулиновых сгустков / XIIa зависимый фибринолиз

Определение фибринолитической активности эуглобулиновой фракции плазмы крови является *важнейшим базисным методом* исследования системы фибринолиза, позволяющим оценить состояние внутреннего и внешнего механизмов образования плазминогена. Метод заключается в определении времени спонтанного лизиса сгустка, образующегося из эуглобулиновой фракции бестромбоцитной плазмы при добавлении к ней раствора хлорида кальция.

Существуют и другие модификации метода эуглобулинового лизиса сгустка. Например, растворение сгустка может быть значительно ускорено предварительным введением в плазму **каолина** – мощного контактного активатора внутреннего механизма фибринолиза, связанного с активированием комплекса факторов: фактор XII-калликреин-кининоген (“**XIIa зависимый фибринолиз**”).

Референсные значения: XIIa зависимый фибринолиз 4 – 10 минут.

Укорочение времени лизиса (активация фибринолиза): уменьшение концентрации фибриногена – гипо- и дисфибриногенемия.

Увеличение времени лизиса (угнетение фибринолиза): гиперфибриногенемия.

Плазминоген и тканевой активатор плазминогена (ТАП)

Определение количества плазминогена основано на гидролизе хромогенного субстрата. Определение плазминогена используют для диагностики ДВС-синдрома и тромбофилий; выявления нарушений фибринолиза; контроля лечения фибринолитическими препаратами при тромбозах, тромбоэмболиях, инфарктах.

Дефицит плазминогена крайне редкое событие, чаще встречается дефицит тканевого активатора плазминогена (ТАП). Дефицит ТАП является одним из потенциальных факторов риска тромбоза, хотя клинически это подтверждается не всегда. Тканевой активатор плазминогена (ТАП) освобождается в кровоток из эндотелиальных клеток сосудистой стенки при стрессовых воздействиях, в частности при манжеточной пробе (дозированном пережатии вен). Сначала определяют базовый уровень ТАП, потом на 10 – 15 минут на предплечье накладывают жгут или раздувают манжетку, вызывающую венозный стаз, затем берут вторую порцию крови, в которой повторно определяют ТАП. Сравнивают результаты обеих проб. ТАП обладает высокой амидазной активностью, позволяющей эффективно использовать для его определения метод хромогенных субстратов.

Определение ТАП проводится у больных *с тромбофилией* как часть панели тестов на выявление причины тромбофилии, особенно при нагрузочных манжеточных пробах. Повышение ТАП после инфаркта миокарда рассматривается как неблагоприятный фактор. Нарушение освобождения ТАП после венозного стаза описано у больных с тромбозами и патологией почек.

Референсные значения плазминогена: 71 – 101%.

Тесты активации свертывания крови

D-димеры

D-димеры – специфические продукты деградации фибрина, входящие в состав тромба. Они образуются в процессе лизиса сгустка крови под влиянием плазмина и некоторых неспецифических фибринолитиков. Концентрация D-димеров в сыворотке пропорциональна активности фибринолиза и количеству

лизируемого фибрина. Этот тест позволяет судить об интенсивности процессов образования и разрушения фибриновых сгустков.

Определение D-димеров проводится *иммуноферментным методом* с использованием моноклональных антител, *иммунодиффузии, методом турбидиметрии, латекс-агглютинации.*

Во всех методах исследования используются моноклональные антитела к эпитопам на D-димере, которые образуются при расщеплении нерастворимого фибрина плазмином. Этих эпитопов нет на фибриногене и растворимых фибрин-мономерных комплексах (РФМК), поэтому ***D-димеры – показатель того, что в процессе фибринолиза расщепляется именно фибрин,*** а не фибриноген или фибрин-мономеры. Поскольку эти антитела не взаимодействуют с фибриногеном, исследования могут проводиться как в плазме, так и сыворотке.

На определение D-димеров практически не оказывает влияние техника взятия крови, примесь тромбоцитов, не требуется использования ингибиторов для подавления других факторов.

Референсные значения D-димера: 33,5 – 727,5 нг/мл.

Повышение уровня D-димеров в крови определяется при возникновении венозных тромбозов, атеротромбозе, тромбоэмболии легочной артерии, ДВС-синдроме, после операций, особенно при большом операционном поле и других состояниях с повышенным образованием фибрина. D-димеры достаточно долго циркулируют в крови, время их полувыведения составляет более 24 ч, повышение D-димеров может персистировать в течении нескольких недель после острого тромбоза.

Уровень D-димеров повышен у больных с тромбозом глубоких вен бедра, с тромбоэмболией легочной артерии, он может повышаться после обширных хирургических вмешательств, травм, при онкологических заболеваниях.

Растворимые фибрин-мономерные комплексы (РФМК)

При ряде форм патологии, характеризующихся активацией свертывания крови (ДВС, тромбозы, тромбофилии), происходит расширение пула

фибриногена, в результате чего увеличивается количество растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК). В последнее время стал активно использоваться *ортофенантролиновый тест*. С помощью ортофенантролинового теста возможно не только качественное, но и количественное определение РФМК. Референсные значения: (РФМК по орто-фенантролиновому тесту) - до 4,0 мг%

Повышение: активация внутрисосудистого свертывания крови (ДВС-синдром, тромбоз глубоких вен, эмболии легочной артерии); возможно при лечении антикоагулянтами; физический и психологический стрессы; нормально протекающая беременность; в период новорожденности.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

1. Гемостаз, физиологические основы системы гемостаза и ее составные компоненты.
2. Сосудисто-тромбоцитарный гемостаз, значение.
3. Коагуляционный гемостаз, фибринолиз, значение.
4. Показатели, характеризующие сосудистый компонент гемостаза.
5. Показатели, характеризующие тромбоцитарный компонент гемостаза.
6. Показатели характеризующие плазменно-коагуляционное звено гемостаза.
7. Скрининговые тесты для оценки плазменного звена гемостаза.
8. Методы определения физиологических антикоагулянтов.
8. Тесты для исследования фибринолитической системы.
9. Тесты для исследования активации свертывания крови.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

1. Записать протокол практического занятия с указанием ее цели и задачи, основных компонентов системы гемостаза.
2. Записать основные лабораторные методики, используемые для оценки свертывающей и противосвертывающей системы.

6. Тема занятия: Кислотно-щелочной баланс организма.

Цель занятия: Иметь представление о роли буферных и физиологических систем в поддержании кислотно-щелочного равновесия, формах нарушения КЩС, знать методы диагностики нарушений кислотно-щелочного равновесия и неотложных состояний в реаниматологии и анестезиологии.

Перечень знаний и практических навыков:

- Знать показатели кислотно-щелочного баланса организма.
- Изучить механизм работы буферной системы гемоглобина.
- Охарактеризовать физиологические системы: роль легких, почек, печени в поддержании кислотно-щелочного равновесия.
- Знать формы нарушения кислотно-щелочного баланса, алкалоз и ацидоз.
- Знать неотложные состояния в анестезиологии и реаниматологии, общеклинические анализы, экспресс-диагностику.
- Уметь оценить нарушения кислотно-щелочного баланса организма.
- Овладеть навыком диагностической оценки неотложных состояний.

Одним из условий существования живого организма является постоянство его внутренней среды. Это постоянство выдерживается по целому ряду параметров, в том числе и по концентрации водородных ионов (рН).

Кислотно-основное равновесие (КОС) – это состояние, которое обеспечивается физиологическими и физико-химическими процессами, составляющими функционально единую систему стабилизации концентрации ионов H^+ . Нормальные величины концентрации ионов H^+ около 40 нмоль/л, что в 10^6 раз меньше, чем концентрация многих других веществ (глюкоза, липиды, минеральные вещества). Для поддержания рН артериальной крови в нормальных границах (т. е. для стабилизации кислотно-основного состояния организма) служат буферные системы (бикарбонатная, фосфатная, гемоглобиновая и др.). Наиболее емкой системой является бикарбонатная, представляющая собой смесь слабой угольной кислоты (H_2CO_3) и ее однозамещенных солей – бикарбонатов. Буферные системы обладают

свойством противостоять изменениям рН при добавлении кислот или оснований. Снижение $\text{NaHCO}_3/\text{H}_2\text{CO}_3$ ведет к ацидозу, увеличение – к алкалозу. При этом рН остается в пределах нормальных значений (от 7,35 до 7,45) (табл. 12).

Таблица 12

Нормальные показатели кислотно-щелочного равновесия

Кровь	рН	pCO_2 , мм рт.ст.	HCO_3^- , мЭКВ/л
Артериальная	7,37 – 7,43	36 – 44	22 – 26
Венозная	7,32 – 7,38	42 – 50	23 – 27

При снижении рН артериальной крови ниже 7,35 говорят об ацидемии, при увеличении свыше 7,45 – об алкаемии.

Кислотно-основное равновесие – это состояние, которое обеспечивается физиологическими и физико-химическими процессами, составляющими функционально единую систему стабилизации концентрации ионов H^+ . Метаболическая активность клеток, функция ферментов и стабильность мембран зависит от рН, который является главным показателем КОС. Большая часть ферментативных реакций в организме протекает в узком диапазоне рН (7,30 – 7,50). Сдвиги концентрации ионов H^+ приводят к изменению активности внутриклеточных ферментов даже в пределах физиологических значений. Например, ферменты глюконеогенеза более активны при закислении цитоплазмы, что актуально при голодании или мышечной нагрузке, ферменты гликолиза – при обычных рН.

При нормальном метаболизме за сутки в организме образуется примерно 15000 ммоль ионов водорода (15000000000 нмоль). При норме около 100 нмоль/л во внеклеточной жидкости.

КОС характеризуют концентрацией водородных ионов, которые обозначаются символом рН. Величина рН – это десятичный логарифм концентрации ионов водорода в растворе, взятый с обратным знаком.

При изменении концентрации ионов H^+ в крови активируется компенсационная деятельность двух крупных систем организма:

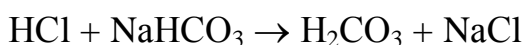
1. Система химической компенсации

- действие внеклеточных и внутриклеточных буферных систем,
- интенсивность внутриклеточного образования ионов H^+ и HCO_3^- .

2. Система физиологической компенсации

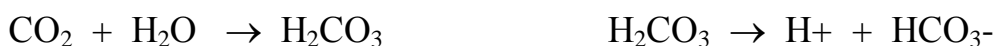
- легочная вентиляция и удаление CO_2 ,
- почечная экскреция ионов H^+ (ацидогенез, аммониегенез), реабсорбция и синтез HCO_3^- .

Буферная система представляет собой сочетание слабой кислоты и соли, образованной этой кислотой и сильным основанием. При включении буферных систем происходит замена сильной кислоты (или основания) на слабую, количество свободных ионов $[H^+]$ уменьшается. Например:



В плазме крови наиболее значимы бикарбонатная и белковая буферные системы, слабые буферные кислоты которых находятся в равновесии в основном с натриевыми солями этих кислот. В клетках преимущественное значение имеют фосфатная и белковая (в эритроцитах – гемоглобиновая) буферные системы, при этом буферные основания представлены в основном калийными солями фосфорной кислоты и белков.

На pH крови существенно влияет pCO_2 , который можно считать дыхательным компонентом КОС. Механизм влияния состоит в следующем:



При избытке CO_2 в уравнениях с учетом коэффициента диссоциации (ассоциации) происходит последовательно сдвиг вправо, образуется угольная кислота и H^+ и ацидоз. При недостатке CO_2 происходит сдвиг влево и алкалоз.

Емкость бикарбонатной буферной системы составляет большую часть буферной емкости крови. Состоит из слабой кислоты (H_2CO_3) и соли сильного основания ($NaHCO_3$) в соотношении 1 к 20. Механизм действия данной системы заключается в том, что при выделении в кровь относительно больших количеств

кислых продуктов водородные ионы (H^+) взаимодействуют с ионами бикарбоната (HCO_3^-) с образованием слабодиссоциирующей угольной кислоты H_2CO_3 . Снижение концентрации угольной кислоты достигается ускоренным выведением CO_2 через легкие в результате их гипервентиляции. Когда же в крови увеличивается количество оснований, то они, взаимодействуя со слабой угольной кислотой, образуют ионы бикарбоната и воду. При этом заметных сдвигов в величине pH не происходит. Высокая ценность бикарбонатного буфера определяется тем, что CO_2 и H_2O при избытке быстро выводятся легкими и почками соответственно.

Фосфатная буферная система имеет наибольшее значение в почечной и тканевой регуляции КОС. В крови роль сводится в основном к поддержанию постоянства и воспроизводства бикарбонатного буфера. Представлена фосфатом одноосновным NaH_2PO_4 (слабая кислота) и двуосновным Na_2HPO_4 (слабое основание).

Буферная система белков крови функционирует в зависимости от pH среды. В щелочной среде белки диссоциируют с освобождением иона $[H^+]$, а в кислой выполняют роль акцептора ионов $[H^+]$. Наибольшей мощностью обладает гемоглобиновый буфер, который можно рассматривать как часть белкового. На него приходится до 30% всей буферной емкости крови. В буферной системе гемоглобина существенную роль играет гистидин, который содержится в белке в большом количестве. Изоэлектрическая точка гистидина равна 7,6, что позволяет гемоглобину легко принимать и легко отдавать ионы водорода при малейших сдвигах физиологической pH крови (в норме 7,35 – 7,45).

Буферная система гемоглобин-оксигемоглобин играет важную роль в регуляции соотношения гемоглобин (слабое основание) – оксигемоглобин (слабая кислота), а также в преобразовании растворенной угольной кислоты в углекислый газ и выведении его через легкие. Образующийся в тканях углекислый газ поступает в эритроциты и превращается в угольную кислоту (H_2CO_3). Под влиянием фермента карбоангидразы эритроцитов H_2CO_3 диссоциирует на ион H^+ и анион HCO_3^- . Ион водорода связывается с гемоглобином и фосфатами, а анион бикарбоната возвращается в плазму крови. Электрохимическая нейтральность

поддерживается за счет перемещения в эритроциты ионов хлора. В эритроцитах анион хлора связывается с катионом калия.

В физиологических условиях повышение $p\text{CO}_2$ в венозной крови, оттекающей от тканей, стимулирует образование HCO_3^- в эритроцитах. Напротив, снижение $p\text{CO}_2$ в артериальной крови угнетает образование бикарбоната. При этом обеспечивается относительное постоянство артерио-венозной разницы $\text{HCO}_3^- / \text{CO}_2$ и, следовательно, величины рН.

Редуцированный гемоглобин в тканях является акцептором ионов $[\text{H}^+]$ и тем самым препятствует закислению тканей.

Оксигемоглобин, образующийся в легких, ведет себя как кислота, так как является донатором ионов $[\text{H}^+]$. Поэтому смещения рН в щелочную сторону не происходит. В тканевых капиллярах HbO_2 , отдавая кислород, теряет часть своих кислотных свойств.

Образующийся редуцированный гемоглобин, представленный в виде калиевой соли, обладает повышенным сродством к ионам водорода и связывает их, освобождая при этом ионы калия, которые при массивной агрессии кислот выходят из эритроцитов, вызывают гиперкалиемию и беспрепятственно выводятся почками.

В лёгких образующийся оксигемоглобин связывает значительную часть калия, в результате чего анион хлора вытесняется за пределы эритроцита и связывается с катионом натрия, освобожденным при удалении углекислоты. В итоге происходит активное образование и задержка в организме аниона HCO_3^- (основания) и удаление угольной кислоты.

Степень связывания кислорода с гемоглобином существенно зависит от сдвигов рН плазмы крови: при сдвиге его в кислую сторону (ацидоз, рН снижается) сродство гемоглобина к кислороду снижается и соответственно уменьшается насыщение гемоглобина кислородом; при сдвиге рН в щелочную сторону (алкалоз, повышается) имеет место обратная зависимость: сродство гемоглобина к кислороду и насыщение его кислородом возрастают.

Функции этой системы зависят от концентрации гемоглобина в крови и от поступления достаточных количеств кислорода: при анемии и гипоксии её мощность резко снижается.

В легких после удаления CO_2 (угольной кислоты) происходит защелачивание крови. При этом присоединение O_2 к дезоксигемоглобину H-Hb образует кислоту HHbO_2 более сильную, чем угольная. Она отдает свои ионы H^+ в среду, предотвращая повышение рН:



В капиллярах тканей постоянное поступление кислот (в том числе и угольной) из клеток приводит к диссоциации оксигемоглобина HbO_2 и связыванию ионов H^+ в виде H-Hb : $\text{HbO}_2 + \text{H}^+ \rightarrow [\text{H-HbO}_2] \rightarrow \text{H-Hb} + \text{O}_2$

В тканях гемоглобин может образовывать соединения с CO_2 – карбамингемоглобин.

Наиболее важными функциональными системами организма, принимающими участие в регуляции КОС, являются дыхательная, мочевыделительная, пищеварительная системы, печень, кожа.

Легкие обеспечивают поддержание содержания CO_2 . Количество CO_2 отражает равновесие между его продукцией в процессе клеточного обмена и выведением легкими с выдыхаемым воздухом. Легочная вентиляция обеспечивает удаление угольной кислоты, образованной при функционировании бикарбонатной буферной системы. При усиленном образовании ионов водорода бикарбонатная система связывает $[\text{H}^+]$ с помощью бикарбоната натрия и переводит сильные кислоты в слабую угольную кислоту с последующим образованием из нее воды и углекислого газа, который выводится с выдыхаемым воздухом. Адекватные изменения вентиляции регулируются дыхательным центром, который чувствителен к углекислому газу и ионам водорода. В условиях гиперкапнии и ацидоза стимулируется дыхательный центр, углекислый газ выводится. Дополнительная вентиляция легких приводит к удалению CO_2 , а значит и H_2CO_3 , и повышает рН крови, что компенсирует закисление межклеточной жидкости и плазмы крови продуктами метаболизма, в первую очередь, органическими кислотами.

При снижении $p\text{CO}_2$ интенсивность стимуляции снижается, возникает гиповентиляция, углекислый газ в организме задерживается. По скорости реакции на изменение $p\text{H}$ – это вторая система после буферных систем.

Мочевыделительная система принимает участие в регуляции кислотно-основного равновесия. Почки обеспечивают поддержание в равновесии бикарбонатной системы. Происходит элиминация H^+ и восполнение ионов бикарбоната.

Ионы водорода активно секретируются в мочу канальцевым эпителием, причем этот процесс восстанавливает физиологические соотношения в фосфатной буферной системе и обеспечивает преобладание двузамещенного натрия в крови, оттекающей от почек. Выводимые таким путем избытки водородных ионов составляют т.н. титруемую кислотность мочи. Анионы сильных кислот выводятся вместе с катионом NH_4^+ , который образуется из аммиака и водорода в почках. Этот процесс называется аммиогенезом и также направлен на удаление избытка ионов водорода. Почечная регуляция КОР, таким образом, включает образование и удаление ионов аммония, секрецию ионов водорода, а также экономию аниона бикарбоната (анионы бикарбоната из первичной мочи почти полностью абсорбируются в почечных канальцах).

В физиологических условиях в почках осуществляется экскреция ионов $[\text{H}^+]$ и реабсорбция ионов Na^+ и HCO_3^- . Углекислый газ поступает в клетки почечных канальцев из плазмы крови и мочи, где с участием карбоангидразы происходит следующее взаимодействие:



Образовавшийся ион $[\text{H}^+]$ секретируется в просвет канальцев, где нейтрализуется буферными системами клубочкового ультрафильтрата. Активность карбоангидразы зависит от $p\text{H}$: чем ниже $p\text{H}$, тем ее активность выше, и наоборот.

В почках функционируют два механизма регуляции бикарбоната внеклеточной жидкости: реабсорбция бикарбоната и его образование в клетках почечного эпителия.

Развитие почечной реакции на смещение кислотно-основного состояния происходит в течение нескольких часов и даже дней.

Регуляция кислотно-основного состояния в печени происходит путем окисления низкомолекулярных органических кислот (молочная кислота и др.), синтеза мочевины из аммиака, секреции в составе желчи бикарбоната натрия, экскреции через желчный шунт в кишечник продуктов метаболизма. В желудочно-кишечный тракте поддержание КОС обеспечивается путем регуляции количества и качества абсорбируемых и экскретируемых электролитов и воды.

Кислотно-основное состояние крови оценивается комплексом показателей (табл. 13).

Таблица 13

Основные показатели КОС крови

Показатели	Нормальные значения
pH крови	7,40
pCO ₂	40 ± 5мм Hg
AB	19 – 25 ммоль/л
SB	20 – 26 ммоль/л
BB	44 – 52 ммоль/л
BE	± 2,3 ммоль/л
pH мочи	5,0-7,0

- **pH** – показатель водородных ионов плазмы крови. Интегральный показатель, отражающий состояние буферных систем и физиологических механизмов компенсации. Изменяется при воздействии факторов, превышающих возможности этих систем. Величина pH – основной показатель КОС. У здоровых людей pH артериальной крови равен 7,40 (7,35 – 7,45), т. е. кровь имеет слабощелочную реакцию. Снижение величины pH означает сдвиг в кислую сторону – ацидоз (pH < 7,35), увеличение pH – сдвиг в щелочную сторону – алкалоз (pH > 7,45). Сдвиги pH более чем на 0,4 (pH менее 7,0 и более 7,8) считаются несовместимыми с жизнью. Колебания pH в пределах 7,35 – 7,45 относятся к зоне полной компенсации.

- **pCO₂** – показатель парциального напряжения CO₂ в крови. Отражает функциональное состояние системы дыхания. В норме PaCO₂ составляет 40 мм рт. ст. с колебаниями от 35 до 45 мм рт. ст. Повышение или снижение PaCO₂ является признаком респираторных нарушений. Альвеолярная гипервентиляция сопровождается снижением PaCO₂ (артериальной гипокапнией) и респираторным алкалозом, альвеолярная гиповентиляция – повышением PaCO₂ (артериальной гиперкапнией) и респираторным ацидозом.

- **AB** (actual bicarbonate) – истинные бикарбонаты плазмы, то есть содержание ионов HCO₃⁻ в крови, взятой у данного больного в конкретных условиях.

- **SB** (standart bicarbonate) – стандартные бикарбонаты плазмы крови. Содержание бикарбоната у данного больного, определяемое в стандартных условиях (pCO₂ = 40 мм Hg, HbO₂ = 100%, to = 37°C).

Стандартные и истинные бикарбонаты характеризуют бикарбонатную буферную систему крови. В норме значения SB и AB совпадают и составляют 24,0 + 2,0 ммоль/л. Количество стандартных и истинных бикарбонатов уменьшается при метаболическом ацидозе и увеличивается при метаболическом алкалозе.

- **BB** (buffer base) – буферные основания плазмы, то есть сумма всех основных компонентов бикарбонатной, фосфатной, белковой, гемоглобиновой систем. Поскольку общее количество буферных оснований (в отличие от стандартных и истинных бикарбонатов) не зависит от напряжения CO₂, по величине BB судят о метаболических нарушениях КОС. В норме содержание буферных оснований составляет 48,0 + 2,0 ммоль/л.

- **BE** (base excess) – сдвиг буферных оснований отражает изменения содержания буферных оснований крови по сравнению с нормальным для данного больного NBV. В норме показатель BE равен нулю, допустимые пределы колебаний +2,3 ммоль/л. При повышении содержания буферных оснований величина BE становится положительной (избыток оснований), при снижении – отрицательной (дефицит оснований). Величина BE является наиболее информативным показателем метаболических нарушений КОС благодаря знаку (+

или -) перед числовым выражением. Дефицит оснований, выходящий за пределы колебаний нормы, свидетельствует о наличии метаболического ацидоза, избыток – о наличии метаболического алкалоза.

- **NBB** – сумма всех основных компонентов буферных систем крови больного, но оцениваемая в стандартных условиях ($pH = 7.38$, $pCO_2 = 40$ мм Hg, $t = 37^\circ C$).

- **pH мочи** – показатель водородных ионов мочи отражает функциональное состояние почек, интенсивность процессов ацидо- и аммионогенеза.

Несостоятельность компенсаторных механизмов организма в предотвращении сдвигов концентрации водородных ионов приводит к различным нарушениям кислотно-основного равновесия. В зависимости от механизмов развития этих нарушений различают дыхательный ацидоз (или алкалоз) и метаболический ацидоз (или алкалоз).

Ацидоз – изменение КОС, при котором в крови появляется абсолютный или относительный избыток кислот. Алкалоз – изменение КОС, характеризующееся абсолютным или относительным увеличением основных валентностей в крови.

По степени компенсации все состояния можно разделить на:

- компенсированные - $pH = 7,40 \pm 0,04$

- субкомпенсированные

ацидоз - $pH = 7,35 - 7,31$

алкалоз - $pH = 7,45 - 7,49$

- декомпенсированные

ацидоз - $pH < 7,30$

алкалоз - $pH > 7,50$

Метаболический ацидоз – наиболее часто встречающаяся форма нарушений КОС - обусловлен избыточным образованием и накоплением в тканях и крови органических кислот или потерей оснований. Щелочной резерв крови уменьшается в первую очередь за счет истощения бикарбоната. Он возникает при сахарном диабете (увеличение кетоновых тел – бета-оксимасляной и

ацетоуксусной кислот), нарушении питания, голодании, лихорадке, токсических состояниях, почечно-гломерулярной недостаточности, сердечно-сосудистой недостаточности, инфекционных и воспалительных процессах, заболеваниях желудочно-кишечного тракта, шоковых состояниях. При метаболическом ацидозе кислотность мочи и содержание в ней аммиака увеличены.

При метаболическом ацидозе происходят расстройства микроциркуляции, повреждается сосудистая стенка и повышается ее проницаемость. Из-за повышения уровня кининов в плазме и внеклеточной жидкости происходит вазодилатация. Развивается гипотония. Описанные изменения в сосудах микроциркуляторного русла способствуют процессу тромбообразования и кровоточивости. При рН крови менее 7,2 возникает снижение сердечного выброса. Наблюдается дыхание Куссмауля.

Лабораторные показатели метаболического ацидоза:

Компенсированный ацидоз – абсолютное количество ионов HCO_3^- и pCO_2 снижено, но их соотношение (20/1) не изменено. Истощение буферных систем приводит к снижению рН крови и декомпенсации.

Декомпенсированный ацидоз – рН крови, pCO_2 , АВ, SB, BB – снижены. Увеличено отрицательное значение BE, что указывает на истощение щелочного резерва крови.

Респираторный ацидоз характеризуется повышением концентрации в крови водородных ионов вследствие задержки в организме углекислого газа. Дыхательный (респираторный) ацидоз возникает вследствие гиповентиляции легких. Это может происходить при бронхиальной астме, пневмонии, при нарушениях кровообращения с застоем в малом круге, отеке лёгких, эмфиземе. Нарушения центральной регуляции дыхания при травмах и опухолях мозга, кровоизлияниях в мозг, отравление морфином, барбитуратами, алкоголем, неправильно выбранный режим ИВЛ могут стать причиной респираторного ацидоза. В результате наблюдается гиперкапния, т.е. повышение pCO_2 артериальной крови; при этом увеличивается содержание H_2CO_3 в плазме крови, что, в свою очередь, приводит к компенсаторному нарастанию ионов бикарбоната

(HCO_3^-) в плазме (увеличивается т.н. щелочной резерв крови). Одновременно со снижением рН крови при дыхательном ацидозе повышается выведение с мочой свободных и связанных (в форме аммонийных солей) кислот.

На фоне гиперкапнии развивается паралитическое расширение сосудов головного мозга, увеличивается продукция ликвора, повышается внутричерепное давление. При тяжелых нарушениях возможно генерализованное угнетение ЦНС. Гиперкапния и гипоксия вызывают увеличение катехоламинов, стимулируется сосудодвигательный центр. Усиливается сердечная деятельность (ЧСС, МОК, УО), повышается тонус артериол, развивается гипертензия. При нарастающем респираторном ацидозе усиливается тканевая гипоксия, возникают аритмии, снижается чувствительность адренорецепторов к катехоламинам. Прогрессирует сердечная недостаточность, гипотензия, расстройства функции желудочно-кишечного тракта, легочная гипертензия.

Лабораторные показатели респираторного ацидоза:

- рН крови снижен;
- pCO_2 , АВ, SB и ВВ повышены;
- BE - умеренный сдвиг в положительную сторону;
- гипохлоремия как результат усиленного выведения с мочой;
- гиперкалиемия на начальной стадии ацидоза, сменяющаяся в последующем гипокалиемией (в течение 5 – 6 дней).

Метаболический алкалоз характеризуется дефицитом ионов $[\text{H}^+]$ в крови в сочетании с избытком бикарбонатных ионов. Метаболический алкалоз может развиваться в результате потери большого количества кислотных эквивалентов (при неукротимой рвоте, желудочно-кишечных расстройствах) и усиленного поступления из желудочно-кишечного тракта веществ, не подвергшихся нейтрализации кислым желудочным соком и обладающих основными свойствами, а также при накоплении подобных агентов в тканях (в частности, при тетании) и в случаях избыточного и бесконтрольного введения щелочных растворов для коррекции метаболического ацидоза. При метаболическом алкалозе повышается содержание бикарбоната (HCO_3^-) в плазме и, следовательно, увеличивается

щелочной резерв крови. Как компенсацию метаболического алкалоза следует рассматривать возникающую при этом гиперкапнию в результате снижения возбудимости дыхательного центра в условиях повышенного рН и, соответственно, урежения частоты дыхания. Данный тип нарушения КОР сопровождается снижением кислотности мочи и содержания в ней аммиака.

Над клиническими признаками метаболического алкалоза, как правило, превалирует клиника основного заболевания. Наиболее выражены судороги и приступы тетании (из-за гипокальциемии) и нарушение функции миокарда, повышение нервно-мышечной возбудимости за счет увеличения проницаемости клеточных мембран (из-за гипокалиемии).

Лабораторные показатели метаболического алкалоза:

- рН, АВ, SB, BB повышены;
- BE резко положительный;
- рСО₂ умеренно повышен;
- гипернатриемия, гипохлоремия, гипокалиемия, гипокальциемия.

Дыхательный алкалоз возникает при гипервентиляции лёгких (при вдыхании чистого кислорода, компенсаторной одышке, сопровождающей ряд заболеваний, в том числе нейротоксический синдром, инфекционно-вирусные состояния). Кроме того, причиной дыхательного алкалоза может быть стимуляция дыхательного центра при патологических процессах в центральной нервной системе (травмы, опухолевой процесс). При этом вследствие быстрого выведения из организма СО₂ развивается гипокапния, т.е. понижение рСО₂ в артериальной крови (менее 35 мм рт. ст.); снижение содержания угольной кислоты в артериальной крови сопровождается уменьшением бикарбонатов в плазме крови (снижается щелочной резерв крови), поскольку часть их компенсаторно превращается в угольную кислоту. Хотя этот механизм часто оказывается недостаточным, чтобы компенсировать уменьшение содержания Н₂СО₃. При дыхательном алкалозе отмечается снижение кислотности мочи и содержания в ней аммиака.

Клинические проявления респираторного алкалоза связаны со снижением тканевого кровотока, нарушениями микроциркуляции, снижением тканевого

метаболизма в жизненно важных органах. Наблюдаются расстройства ЦНС, сердечные нарушения, нервно-мышечные расстройства.

Лабораторные показатели респираторного алкалоза:

- рН крови и рН мочи повышены;
- резкое снижение pCO_2 ;
- АВ, SB, BB снижены;
- BE умеренно отрицательный;
- гипокальциемия.

На практике изолированные формы дыхательных или метаболических нарушений КОР встречаются редко: чаще всего имеют место их сочетания. Так, к примеру, смешанный ацидоз является результатом изменения как "метаболических", так и "дыхательных" показателей; такие нарушения КОР нередко наблюдаются при бронхолегочной патологии.

Если при различных по характеру сдвигах КОР крови значения рН остаются в пределах нормы, такие изменения КОР можно считать компенсированными (табл. 14); если же величина рН выходит за границы нормы, тогда нарушения КОР могут быть либо частично компенсированными, либо некомпенсированными (в зависимости от степени отклонения рН).

Таблица 14

Механизмы компенсации нарушений кислотно-основного равновесия

Виды нарушений КОР	Механизмы компенсации
Респираторный ацидоз	Снижение рН компенсируется увеличением реабсорбции бикарбонатов почками и возвращением его в кровь. Артериальная гипоксия компенсируется увеличением количества эритроцитов.
Респираторный алкалоз	Компенсация за счет буферных систем: Почки – усиленное выведение бикарбонатов с мочой вследствие снижения реабсорбции в почках.
Метаболический ацидоз	За счет респираторных механизмов: Снижение парциального давления углекислого газа.
Метаболический алкалоз	За счет респираторных механизмов: Путем вывода из легких CO_2 .

Изменения отношения $\text{HNCO}_3 / \text{H}_2\text{CO}_3$ могут происходить как за счет числителя, так и за счет знаменателя. В первом случае сдвиги носят метаболический характер, они говорят об активной реакции буферных систем. Во втором случае имеет место реакция системы-дыхания, приводящая к замедлению или ускорению выведения CO_2 легкими.

Если HNCO_3 первично увеличен, компенсация развивается по пути увеличения H_2CO_3 за счет гиповентиляции для восстановления соотношения $\text{HNCO}_3 / \text{H}_2\text{CO}_3 = 20:1$ и возвращения pH к норме (метаболический алкалоз, компенсированный дыхательным ацидозом). При этом pH имеет тенденцию к увеличению.

Если метаболические процессы приводят к увеличению содержания кислых продуктов обмена в крови, развивается метаболический ацидоз, буферные основания (SB , BB) уменьшаются, их дефицит (BE) растет, развивается компенсаторная гипервентиляция, снижается P_{CO_2} крови, отношение $\text{HNCO}_3/\text{H}_2\text{CO}_3$ выравнивается за счет уменьшения знаменателя, pH – возвращается к норме, pO_2 увеличено (метаболический ацидоз, компенсированный дыхательным алкалозом).

В случае, когда гипервентиляция первично приводит к вымыванию из крови углекислоты и снижению $\text{pCO}_2 >$ развивается компенсация за счет метаболических сдвигов – снижаются SB , BB ; увеличивается BE , и pH возвращается к норме. Обычно при этом pO_2 увеличено, pCO_2 уменьшено (дыхательный алкалоз, компенсированный метаболическим ацидозом).

Отличие первичных сдвигов КОС от компенсаторных вторичных не всегда возможно выявить. Обычно первичные сдвиги показателей КОС выражены больше, чем компенсаторные. Чтобы избежать ошибок в трактовке кислотно-основного состояния, наряду с оценкой всех компонентов анализа КОС необходимо учитывать pO_2 и общую клиническую картину состояния больного.

Для нейтрализации ацидотических сдвигов КОС применяют щелочные растворы (бикарбонат натрия, трисамин и т.п.), для коррекции алкалоза, напротив, – растворы, содержащие кислые валентности (кислота хлористоводородная или соляная т.п.). Важно, что коррекция КОС должна проводиться под строгим контролем изменений показателей кислотно-основного равновесия.

Неотложные/экстренные лабораторные исследования – совокупность методов качественного и/или количественного анализа различного биологического материала, которые позволяют получить результат лабораторного исследования в течение короткого времени. При проведении неотложных лабораторных исследований время от взятия биологического материала до получения результата исследования не должно превышать 40 мин для специализированных лечебных учреждений и 1 ч для экспресс-лабораторий многопрофильных лечебных учреждений. Для успешного оказания реанимационной помощи время выполнения экстренных лабораторных исследований не должно превышать 3 – 5 мин. К таким исследованиям относятся: исследование кислотно-основного состояния, определение гемоглобина, гематокрита, глюкозы крови, исследование электролитов (калий, натрий, кальций, хлориды), лактата и т.д. (табл. 15).

Таблица 15

Структура анализов в экспресс-лаборатории

коагулологические исследования	6 – 8%
гематологические исследования	23 – 26%
иммуногематологические исследования	1,0 – 1,5%
общеклинические исследования	5 – 7%
биохимические исследования	58 – 65%
из них исследование КОС и электролитов	24 – 32%

Кислотно-основное состояние крови является важнейшим показателем для оценки состояния организма в экстремальных ситуациях в реанимационной практике. В настоящее время исследование кислотно-основного состояния крови проводится на газовых анализаторах, которые с учетом температуры крови и давления напрямую определяют концентрацию ионов H^+ (величину рН) и показатель pCO_2 (количество CO_2).

Важным для выполнения неотложных лабораторных исследований является приложение № 10 приказа МЗСР РФ от 13 апреля 2011 года № 315н «Об утверждении Порядка оказания анестезиолого-реанимационной помощи

взрослому населению», в котором представлено «Положение об организации деятельности врача анестезиолога-реаниматолога» (табл. 16).

Таблица 16

Положение об организации деятельности врача анестезиолога-реаниматолога

Приказы	Рекомендации
<p>Приказ от 6 июля 2009 г. N 389н «Об утверждении порядка оказания медицинской помощи больным с острыми нарушениями мозгового кровообращения»</p>	<p>Неврологическое отделение для больных с острыми нарушениями мозгового кровообращения должно провести определение глюкозы в периферической крови, МНО, АЧТВ в течение 20 минут от момента забора крови.</p>
<p>Приказ от 19 августа 2009 г. N 599н «Об утверждении порядка оказания плановой и неотложной медицинской помощи населению российской федерации при болезнях системы кровообращения кардиологического профиля»</p>	<p>В лечебно-профилактическом учреждении, где оказывается неотложная помощь больным с сердечно-сосудистыми заболеваниями, в экстренном (безотлагательном) порядке и в любое время суток обеспечивается: определение гематокрита; уровня глюкозы, натрия, калия, магния, креатинина, тропонинов, КФК, МВ-КФК, D-димера, фибриногена в сыворотке крови; активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ); активированного времени свертывания (АВС); кислотно-щелочного баланса и газового состава крови.</p> <p>Стандарт оснащения блока интенсивной терапии отделения неотложной кардиологии, стандарт оснащения отделения неотложной кардиологии:</p> <p>Лабораторное оборудование для автоматического определения гемоглобина, гематокрита, параметров коагулограммы (активированного времени свертывания, АЧТВ, фибриногена, МНО, D-димера), электролитов (K, Na), тропонина, глюкозы, креатинина, билирубина, газов крови.</p>
<p>Приказ от 8 декабря 2009 г. N 966н «Об утверждении порядка оказания медицинской помощи больным с урологическими заболеваниями»</p>	<p>В лечебно-профилактическом учреждении, при котором создано урологическое отделение, обеспечивается определение/ проведение медицинских исследований в экстренном порядке (в любое время суток): гематокрита; уровня глюкозы, натрия, калия, креатинина, мочевины в сыворотке крови; определение кислотно-щелочного состояния.</p>

В пункте 11 приложения указывается, что при осуществлении интенсивного лечения, врач анестезиолог-реаниматолог осуществляет весь комплекс лечебных, профилактических и **диагностических** мероприятий, направленных на восстановление, стабилизацию и нормализацию нарушенных функций жизненно-важных органов и систем, включающих симптоматическое и патогенетическое лечение, временное протезирование нарушенных функций, их своевременную диагностику и контроль (мониторинг) за ними. Пункт имеет существенное практическое значение для организации выполнения лабораторных анализов в палате пробуждения и операционном блоке (при отсутствии палат для реанимации и интенсивной терапии), т.е. в тех случаях, когда специалисты лаборатории не предусмотрены штатным расписанием.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

1. Кислотно-щелочной баланс организма.
2. Механизм работы буферной системы гемоглобина.
3. Роль физиологических систем в поддержании кислотно-щелочного равновесия (легкие, почки, печень).
4. Формы нарушения кислотно-щелочного баланса. Алкалоз и ацидоз (респираторный, метаболический, компенсированный, декомпенсированный).
5. Клинико-диагностическое значение изменений показателей КЩС.
6. Диагностика неотложных состояний в анестезиологии и реаниматологии.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

1. Записать протокол практического занятия с указанием ее цели и задач, основных буферных систем организма.
2. Записать основные лабораторные методики, используемые для оценки кислотно-щелочного равновесия организма.
3. Расшифровать анализ кислотно-щелочного баланса при различных патологических состояниях организма человека. Дать заключение с внесением в протокол.

7. Тема занятия: Молекулярно–генетические методы диагностики в КЛД.

Цель занятия: Сформировать понятие о молекулярно-генетических методах диагностики и их применении в лабораторной практике.

Перечень знаний и практических навыков:

- Изучить молекулярные основы наследственности.
- Охарактеризовать гены и их признаки.
- Знать молекулярно-генетические методы диагностики и области их применения.
- Познакомиться с устройством и оснащением молекулярно-генетической лаборатории.
- Уметь интерпретировать результаты полимеразной цепной реакции.

Молекулярные основы наследственности составляют нуклеиновые кислоты – ДНК (у всех микробов, одноклеточных, растительных организмов, насекомых, животных) и РНК (у некоторых вирусов, в частности онкогенных). Именно в этих крупных биополимерах с помощью единого языка, алфавит которого составляют 4 буквы – нуклеозиды, записана генетическая информация живых существ. В ДНК информация изложена чередованием аденина (А), тимина (Т), гуанина (Г) и цитозина (Ц), которые образуют определенные последовательности, связываясь остатками дезоксирибозы и фосфором в одноцепочечных молекулу. При этом две комплементарные друг другу цепи образуют водородные связи: аденин-тимин (АТ) и гуанин-цитозин (ГЦ), которые закручиваются и образуют двойную спираль. Молекула РНК имеет односпиральную структуру. В ее состав вместо тимина входит урацил (У), а вместо остатка дезоксирибозы – рибоза (химически несколько иная пентоза).

Молекула нуклеиновой кислоты (НК) имеет способность к размножению, удвоение или репликации. Размножаются, тиражируются не белки, а нуклеиновые кислоты. При наличии необходимых компонентов и соответствующих ферментов на матрице каждой нити двуспиральной ДНК (после их разъединения) синтезируется комплементарный цепь новой ДНК.

При реализации генетической информации происходит декодирование: речь нуклеиновых кислот (четыре буквы А, Т, Г, Ц) должна быть переведена на язык белков (20 аминокислот, условно 20 букв). Это возможно благодаря кодовому принципу: одной аминокислоте соответствует запись из трех нуклеотидов в нуклеиновой кислоте. Например, последовательность аденин, аденин, аденин (AAA) кодирует фенилаланин, а АТТ – лизин. Поэтому генетический код – триплетный. Но из 4 букв (А, Т, Г, Ц) можно получить 64 различные комбинации по 3 буквы ($4^3 = 64$), а в природе существует только 20 аминокислот.

Другие триплеты (кодоны) – сочетание трех нуклеотидов – не лишние. Три из них (АТЦ АЦТ, АТТ) – терминаторы, они свидетельствуют о конце синтеза, знаки препинания (как в языке – точка, запятая и т.д.). Другие обеспечивают запас прочности генома, так как кодируют те же аминокислоты, что и основные триплеты. Поэтому генетический код – вырожденный: одна аминокислота может быть закодирована в ДНК 2 – 4 триплетами. В одном гене кодоны расположены друг за другом, как слова в предложении, не перекрываются, что упрощает запись и делает его стабильным.

Реализация генетической информации, а именно синтез белка, осуществляется в цитоплазматических структурах – рибосомах. Для того чтобы план строения белка донести от ДНК к рибосомам, клетка имеет специальные механизмы и подвижные молекулы. Механизм называется транскрипцией, а молекулы – это различные виды РНК. Транскрипция означает переписывание информации с ДНК на РНК. Главным же в синтезе белка является трансляция – перевод информации с одного языка на другой.

Кодовая запись о структуре белковой молекулы переносится с ДНК на информационную (матричную) РНК путем комплементарного, матричного синтеза РНК на ДНК. Молекула РНК копирует весь ген эукариот вместе с незначимыми интронами. Такие временные молекулы называются пре-иРНК.

Молекулы пре-иРНК перемещаются из ядра к цитоплазме, а именно – к рибосомам, состоящим из рибосомных РНК (рРНК) и белков. По пути пре-иРНК модифицируются, из них удаляются незначимые участки кода (интроны). Значение интронов, видимо, очень важное, но еще полностью не расшифровано.

Третий вид РНК составляют относительно маленькие (десятки нуклеотидов) молекулы транспортных РНК (тРНК), которые приносят к рибосомам специфические активированные аминокислоты, ставят их на соответствующее место в полипептидной цепи, определенное кодоном иРНК. Только молекула тРНК имеет в своем составе антикодон, комплементарный к кодону иРНК.

Таким образом, процесс реализации наследственной информации имеет вид ДНК – РНК – белок. Долгое время эта формула считалась центральной догмой генетики.

Молекулярно-генетические методы изучения наследственности человека – это большая группа методов, позволяющих выявлять варианты структуры исследуемого участка ДНК. В основе методов лежат различные манипуляции с ДНК и РНК.

Сегодня молекулярно-генетические методы используются для диагностики различных заболеваний и выявления их причин. Уже стало рутинным тестирование крови для выявления ДНК/РНК различных вирусов, исследование генома пациента для поиска маркеров наследственных и онкологических заболеваний, а также аллельных вариантов различных генов.

Задача молекулярно-генетических исследований в том, чтобы в крови или другом биологическом материале пациента выявить и охарактеризовать последовательности ДНК - чужеродные (вирусные, бактериальные или грибковые) или собственную ДНК пациента. Метод, позволяющий выполнять все эти исследования, - полимеразная цепная реакция. Для ее проведения требуется несколько десятков нанограммов ДНК/РНК. Обычно для исследований берется от одного до десяти миллилитров крови, при этом выделяются десятки тысяч нанограммов ДНК. Следовательно, количества любой ДНК - геномной, вирусной или бактериальной, выделенной из этого объема крови, хватит на десятки или даже сотни молекулярно-генетических определений. Таким образом, большинство исследований можно проводить на материале, полученном в результате одного взятия крови, пункции или биопсии. Если архивировать образцы ДНК больных, то с ними можно проводить исследования, необходимость в которых возникла в

процессе лечения, не делая новых заборов крови. Таким образом, минимизируется травмирование пациента, количество реактивов для выделения генетического материала и соответствующие трудозатраты, а значит, стоимость анализа, время исследования и вместе с тем возрастает его информативность.

Выделение ДНК

Первым этапом любого молекулярно-генетического исследования является выделение нуклеиновых кислот из образца ткани. Для выделения ДНК пригодны любые ядродержащие клетки организма. Чаще всего на практике используется периферическая кровь (лейкоциты).

Выделенная из клеток ДНК представляет собой весь геном организма (геномная ДНК). Для выделения ДНК применяется обработка крови солевыми растворами различной концентрации для разрушения плазматической мембраны и ядерной оболочки и очистка препаратов. Выделенная ДНК пригодна для любых молекулярно-генетических исследований и может продолжительное время сохраняться в замороженном виде.

В большинстве случаев для анализа (например, для диагностики болезни) достаточно исследования небольшого фрагмента генома. Для этого исследуемый фрагмент необходимо получить в большом количестве копий (амплификация). Амплифицировать фрагмент ДНК можно при помощи методов молекулярного клонирования и полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Молекулярное клонирование

Молекулярное клонирование (генная инженерия, технология рекомбинантных ДНК) – это совокупность методов, позволяющих осуществлять перенос генетического материала (ДНК) из одного организма в другой.

Молекулярное клонирование состоит из следующих этапов:

- Выделение ДНК из организма – донора.
- Расщепление ДНК ферментами рестриктазами с образованием фрагментов ДНК с «липкими концами».
- Расщепление векторной молекулы (плазмида, фаг, космида и др.) той же рестриктазой, что и исследуемый образец ДНК.

- Лигирование (сшивание) векторной молекулы и фрагмента исследуемой ДНК с образованием гибридной (рекомбинантной) молекулы.
- Введение рекомбинантной молекулы в клетку-хозяина (реципиента). Этот процесс называется трансформацией.
- Отбор клеток, несущих рекомбинантную ДНК (трансформированные клетки).
- Получение специфического белкового продукта, синтезируемого клетками-хозяевами (рис. 7).

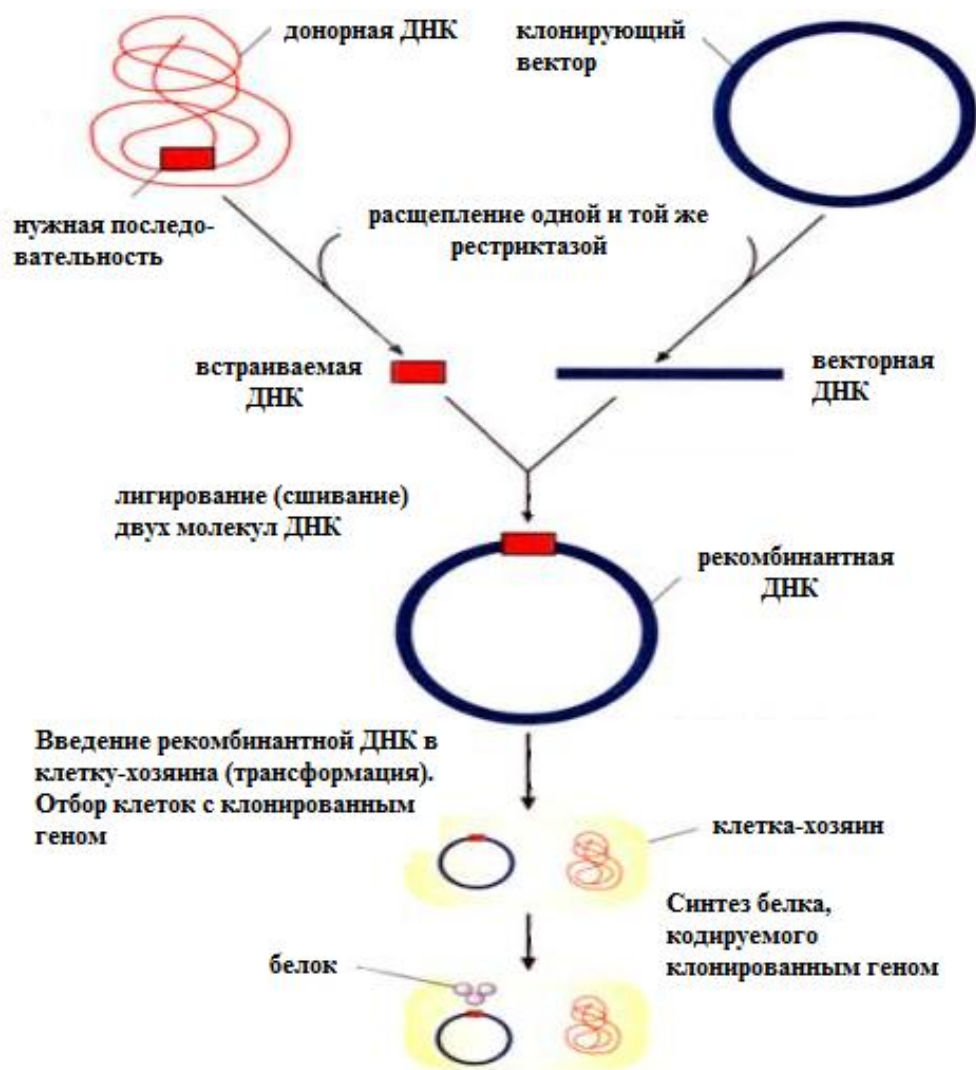


Рис. 7. Схема молекулярного клонирования

Для молекулярного клонирования необходимо:

1. Ферменты рестриктазы.
2. Клонировующий вектор.
3. Встраиваемая ДНК (ген, фрагмент гена).

Рестриктазы – ферменты, разрезающие ДНК в строго определенном месте (сайте). Рестриктазы выделяют из клеток бактерий разных видов. Каждая рестриктаза узнает только свой сайт рестрикции. В настоящее время выделено более 500 рестриктаз.

Например, рестриктаза EcoRI узнает и расщепляет ДНК по палиндромной нуклеотидной последовательности GAATTC. В результате расщепления образуются комплементарные одноцепочечные «липкие» концы:

GAATTC

CTTAAG → обработка рестриктазой EcoRI →

GAATTC

CTTAAGG

Векторами для молекулярного клонирования являются молекулы ДНК, которые могут доставлять в клетку-хозяина чужеродную ДНК. Вектор должен быть небольшого размера, иметь сайт рестрикции, в который может быть осуществлена вставка, иметь один или более селективный генетический маркер для отбора реципиентных клеток, несущих чужеродную ДНК. Векторами для клонирования являются:

1. Плазмиды – кольцевые двухцепочечные экстрахромосомные самореплицирующиеся молекулы ДНК бактерий. В плаزمидах клонируют фрагменты ДНК до 10 т.п.н.

2. Фаги. Первыми были разработаны векторы на основе фага λ E. coli. ДНК фага λ составляет примерно 50 т.п.н. Значительная часть (20 т.п.н.) несущественна для размножения фага и может быть заменена на чужеродную ДНК. В фаге можно клонировать фрагмент ДНК до 20 т.п.н.

3. Космиды – векторы, объединяющие в себе свойства плазмиды и фага. Созданы искусственно. Могут амплифицироваться в бактерии как плазмиды и упаковываться в фаговые головки. Могут включать вставку чужеродной ДНК до 40 т.п.н.

4. Искусственная дрожжевая хромосома (yeast artificial chromosome – YAC). Вектор разработан на основе ДНК дрожжей. Применяются для клонирования больших фрагментов ДНК (от 100 до 1000 т.п.н.) эукариот.

С использованием технологий рекомбинантных ДНК получают инсулин, соматотропный и другие гормоны человека.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Метод амплификации (увеличение количества копий) ДНК *in vitro*. Метод позволяет в течение нескольких часов получить большое количество копий исследуемой ДНК.

Возможность осуществления репликации ДНК в пробирке давно интересовала ученых. Особенно интересной представлялась возможность накопления большого количества копий ДНК для последующих исследований. Этот процесс стал возможным после открытия термостабильной Tag-полимеразы из термофильных бактерий *Thermis aquaticus*. Принцип метода ПЦР был разработан КэриМюллісом (США) в 1983 году и в настоящее время используется как для научных целей, так и для диагностики в практическом здравоохранении. В основе метода ПЦР лежит комплементарное достраивание ДНК-матрицы, осуществляемое *in vitro* с помощью фермента ДНК-полимеразы (т.е. осуществляется репликация). Обычная ДНК-полимераза не может работать при высоких температурах. Оптимум работы Tag-полимеразы находится в области 70 – 72°C, что позволило сделать процесс репликации циклическим. При многократном повторении циклов синтеза происходит экспоненциальное увеличение числа копий специфического фрагмента ДНК, что позволяет из небольшого количества анализируемого материала (не определяемое современными методами) получить достаточное количество копий ДНК для идентификации их методом электрофореза.

Комплементарное достраивание цепи начинается не в любой точке последовательности ДНК, а только в определенных стартовых блоках – коротких двунитевых участках. При присоединении таких блоков к специфическим участкам ДНК можно направлять процесс синтеза новой цепи только в этом участке, а не по всей длине цепи. Для создания стартовых блоков в заданных участках ДНК

используют две олигонуклеотидные заправки – праймеры. Праймеры комплементарны последовательностям ДНК на левой и правой границах специфического фрагмента и ориентированы таким образом, что достраивание новой цепи ДНК протекает только между ними. Таким образом, метод ПЦР представляет собой многократное увеличение числа копий (амплификация) специфического участка ДНК, катализируемое ферментом ДНК-полимеразой.

Каждый цикл амплификации включает 3 этапа, протекающих в различных температурных режимах.

1 этап: Денатурация ДНК.

Протекает при 93 – 94°C в течение 30 – 40 сек.

2 этап: Присоединение праймеров (отжиг).

Присоединение праймеров происходит комплементарно к соответствующим последовательностям на противоположных цепях ДНК на границах соответствующего участка. Для каждой пары праймеров существует своя температура отжига, значения которой располагаются в интервале 50 – 65°C. Время отжига 20 – 60 сек.

3 этап: Достраивание цепи (элонгация). Комплементарное достраивание цепей происходит от 5'-конца к 3'-концу в противоположных направлениях, начиная с участков присоединения праймеров. Материалом для синтеза новых цепей служат добавляемые в раствор нуклеотиды. Синтез происходит при температуре 70 – 72°C, время синтеза – 20 – 40 сек. Образовавшиеся в первом цикле амплификации новые цепи ДНК служат матрицами для нового цикла амплификации, в котором происходит образование искомого специфического фрагмента ДНК (ампликона). В последующих циклах амплификации ампликоны служат матрицей для синтеза новых цепей. Таким образом, происходит накопление ампликонов в растворе по формуле 2^n , где n – число циклов амплификации. Поэтому, даже если в исходном растворе первоначально находилась всего одна двухцепочечная молекула ДНК, то за 30 – 40 циклов в растворе накапливается около 10^8 в восьмой степени молекул ампликона. Этого количества достаточно для достоверной визуальной детекции этого фрагмента методом электрофореза в агарозном геле. Процесс амплификации

проводится в специальном программируемом термостате (амплификаторе), который по заданной программе осуществляет смену температур согласно числу циклов амплификации.

Применение ПЦР:

1. Клиническая лабораторная диагностика

- диагностика вирусных инфекций (ВИЧ, гепатит, половые инфекции и др.),
- определение отцовства,
- диагностика генных болезней (выявление мутаций),
- судебная медицина (напр. Идентификация личности).

2. Фундаментальная наука и практика

- секвенирование (определение нуклеотидной последовательности),
- клонирование генов,
- генная инженерия (создание трансгенных животных и растений),
- генная терапия,
- направленный мутагенез.

Электрофорез фрагментов ДНК

Электрофорез применяется для визуализации результатов экспериментов (ПЦР и др.). Электрофорез фрагментов ДНК обеспечивает их разделение и распределение в агарозном или полиакриламидном геле (рис. 8, 9) Фрагменты ДНК движутся в электрическом поле от отрицательного полюса к положительному в зависимости от их размеров. Чем больше молекулярная масса фрагмента, тем медленнее он движется в электрическом поле. После окончания электрофореза каждый фрагмент ДНК занимает определенное положение в геле в виде полосы. Длину каждого фрагмента можно определить путем сравнения пройденного фрагментом расстояния с расстоянием, пройденным стандартным образцом ДНК с известным размером (маркер). Для визуализации результатов экспериментов гели окрашивают. Чаще всего применяется окраска геля этидия бромидом, который связывается с ДНК. Полосы, соответствующие фрагментам ДНК выявляются при ультрафиолетовом облучении геля (свечение в красной области спектра).



Рис. 8. Агарозный гель, окрашенный этидия бромидом. В ультрафиолетовом свете видны полосы, соответствующие фрагментам ДНК разной длины.

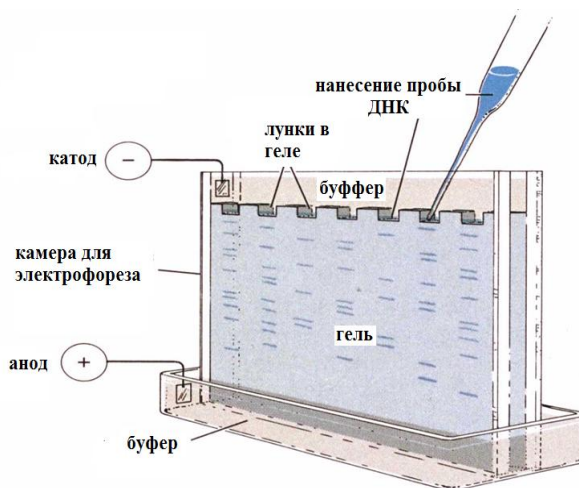


Рис. 9. Камера для электрофореза в полиакриламидном геле. Образцы ДНК наносятся в специальные лунки в геле. В камеру заливается буферный солевой раствор, через который пропускается электрический ток.

При использовании ПЦР с последующим разделением фрагментов при помощи электрофореза можно обнаружить делеции и вставки в исследуемом гене. В случае делеций после ПЦР образуются фрагменты меньшей длины по сравнению с нормальным геном, а в случае вставок (дупликаций) – большей. Замены оснований не изменяют длину фрагментов, поэтому для их определения можно использовать метод полиморфизма длины рестрикционных фрагментов и секвенирование.

Метод полиморфизма длины рестрикционных фрагментов

Значительное число нуклеотидных замен приводит к появлению в последовательности ДНК новых сайтов для различных рестриктаз. В результате нормальный фрагмент ДНК и фрагмент с заменой нуклеотида будут разрезаться одной рестриктазой на разное число фрагментов, отличающихся по длине. Различной длины фрагменты легко выявляются при помощи электрофореза.

Секвенирование ДНК

Секвенирование – определение нуклеотидной последовательности ДНК. Метод применяется для изучения генома человека, как в норме, так и в патологии.

При помощи секвенирования определяют аллельные варианты генов, а также различные типы генных мутаций (чаще по замене оснований). Программа «Геном человека», результатом которой явилась расшифровка нуклеотидной последовательности генома человека (основная часть программы закончена в 2003г.) была осуществлена с применением методов секвенирования ДНК.

Существует несколько различных способов секвенирования ДНК. Первым был предложен химический метод Максама-Гилберта, затем ферментативный метод Сенгера. В настоящее время в основном применяется дидезоксинуклеотидный метод секвенирования ДНК (метод обрыва цепи).

В этой процедуре одноцепочечная молекула ДНК, последовательность которой определяется, служит матрицей для синтеза серии комплементарных цепей, обрывающихся в момент присоединения к растущей цепи специфических нуклеотидов. Для обрыва синтеза используют дидезоксинуклеотиды – искусственно синтезированные нуклеотиды, лишенные 2' и 3'- гидроксильных групп и поэтому не способные присоединять к цепи следующий нуклеотид. Проба ДНК делится на 4 пробирки, в которые добавляют праймер, ДНК-полимеразу, смесь четырех трифосфатов (дАТФ, дГТФ, дТТФ, дЦТФ) и небольшое количество одного из дидезоксирибонуклеотидов (ддАТФ, ддГТФ, ддТТФ, ддЦТФ). Во время синтеза ДНК-полимеразы случайным образом включает в цепь нормальные нуклеотиды и дидезоксинуклеотиды. При этом в каждой пробирке образуется набор фрагментов разной длины, заканчивающихся на один из дидезоксинуклеотидов.

После этого проводится электрофорез, что позволяет разделить отличающиеся на один нуклеотид фрагменты ДНК. В результате в геле образуется набор полос, напоминающих лестницу.

Нуклеотидная последовательность ДНК читается в геле снизу вверх, согласно направлению 5'-3' цепи ДНК.

Для определения нуклеотидной последовательности больших фрагментов ДНК используются автоматизированные машины (ДНК-секвенаторы).

Кроме перечисленных, применяется большое количество других молекулярных методов изучения последовательности ДНК человека.

Требования к организации лабораторных исследований по верификации возбудителей ИППП (инфекций, передающихся половым путем)

Проведение исследований по выявлению возбудителей ИППП, относящихся к III–IV группам патогенности, сопряжено с необходимостью обеспечения правил биологической безопасности работ.

Работа с патологическими биологическими агентами (ПБА) может проводиться только в лабораториях, имеющих специальное разрешение на проведение исследований с микроорганизмами III–IV групп патогенности и должна выполняться в соответствии с требованиями СНиП-СП1.2.731-99 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности и гельминтами».

Разрешение выдается Главным государственным санитарным врачом административной территории на срок до 5 лет. Оно утрачивает силу при передислокации или перепланировке лаборатории, а также может быть аннулировано при нарушениях требований биологической безопасности.

Лицензирование и сертификация лабораторий, осуществляющих диагностику заболеваний, передающихся половым путем, осуществляются в соответствии с действующим законодательством в установленном порядке.

Требования к помещениям лабораторий

Для обеспечения возможности проведения комплекса работ в лабораториях рекомендуется иметь регламентированный набор помещений. Устройство лаборатории, расположение и организация рабочих мест должны обеспечивать необходимую при работе с патологическими биологическими агентами безопасность персонала, а также предотвращать контаминацию патогенами как внутри лаборатории, так и за ее пределами.

В соответствии со СНиП-СП1.2.731-99 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности и гельминтами» все помещения лаборатории должны быть разделены на «чистую» и «грязную» зоны.

Помещения «чистой зоны» включают:

- комнату (гардероб) для верхней одежды;

- комнату для надевания рабочей одежды;
- помещения для проведения подготовительных работ (препараторская, мочная, дистилляционная);
- стерилизационную;
- комнату для приготовления питательных сред;
- помещение с холодильниками для хранения диагностических препаратов;
- комнату отдыха и приема пищи;
- комнату выдачи результатов исследований.

Комплекс помещений «грязной зоны» включает:

- помещение для приема и регистрации патологического биологического материала;
- помещение первичной обработки биологических материалов (центрифугирование, инаktivация, пробоподготовка);
- комнаты для проведения бактериологических исследований;
- комнаты для проведения серологических исследований;
- комната для проведения люминесцентной микроскопии;
- автоклавная для обеззараживания патологических биологических материалов;
- боксированное помещение или помещение, оснащенное боксами биологической безопасности или ламинарными шкафами для бактериологических и молекулярно-биологических исследований.

В помещениях «грязной зоны» создается эпидемиологическая цепочка последовательного движения исследуемых биологических материалов в процессе приема, обработки, исследования и последующего обеззараживания и утилизации отработанных материалов. Перемещение патологических биологических агентов из «заразной» в «чистую» зону не допускается.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

1. Молекулярные основы наследственности.
2. Классификация и структура генов.
3. Молекулярно–генетические методы диагностики.
4. Полимеразная цепная реакция. Этапы. Применение.
5. Метод ПЦР, ПДРФ.
6. Электрофорез амплифицированных фрагментов.
7. Метод секвенирования.
8. Оборудование и организация работы молекулярно–генетических лабораторий.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

1. Записать протокол практического занятия с указанием ее цели и задач, методов генетической диагностики.
2. Записать основные разновидности полимеразной цепной реакции.
3. Записать основные виды наследственных заболеваний.

8. Тема занятия: Молекулярно-генетические методы диагностики инфекционных и наследственных болезней.

Цель занятия: Молекулярно-генетические методы диагностики инфекционных и наследственных заболеваний.

Перечень знаний и практических навыков:

- Знать основные разновидности молекулярно-генетических методов диагностики.
- Усвоить роль полимеразной цепной реакции в диагностике инфекционных и наследственных заболеваний.
- Ознакомиться с диагностикой урогенитальных инфекций.
- Знать методы диагностики вирусных заболеваний человека.
- Уметь интерпретировать результаты ПЦР в реальном времени.

Молекулярно-генетические методы – это большая группа методов, позволяющих выявлять варианты структуры исследуемого участка ДНК. В основе методов лежат различные манипуляции с ДНК и РНК. Эти методы направлены на выявление фрагментов нуклеиновых кислот, специфичных для конкретного заболевания.

Базируясь на технологии получения нуклеотидных последовательностей ДНК, можно выделить следующие методы молекулярной генетики:

1. Метод секвенирования – определение нуклеотидной последовательности ДНК. Таким методом полностью определена последовательность нуклеотидов генов глобина, некоторых гормонов (инсулина, гормона роста, пролактина и др.).
2. Метод полимеразной цепной реакции (используется для увеличения числа фрагментов ДНК).
3. Метод получения праймеров, соответствующих известным генам.
4. Метод гибридизации нуклеиновых кислот.
5. Метод клонирования ДНК.
6. Метод получения рекомбинантных молекул ДНК.
7. Метод получения белков с помощью рекомбинантных молекул ДНК.

8. Создание библиотеки генов – полного набора (коллекции) клонированных фрагментов ДНК, полученных в результате рестрикции тотальной ДНК.

ПЦР в диагностике инфекционных заболеваний

Ключевыми показателями лабораторной диагностики являются чувствительность и специфичность методов выявления возбудителей инфекций (грибов, простейших, бактерий и вирусов).

- **Чувствительность** – это минимальное количество материала, которое можно выявить данным методом. Материалом могут быть целые микроорганизмы и фрагменты молекул возбудителей, а также специфические антитела, выработанные человеческим организмом в ответ на инфекцию. Чем меньше материала способен выявить метод, тем выше его чувствительность. Если лабораторное исследование не выявляет микроорганизмы, которые присутствуют в образце и для выявления которых разработана тест-система, результат называется ложно-отрицательным. Чем выше чувствительность метода, тем меньше ложно-отрицательных [ложно(-)] результатов.

- **Специфичность** – это способность метода указывать на наличие в образце только того объекта, для выявления которого была разработана тест-система. Если метод указывает на наличие в образце микроорганизмов, которые там не содержатся, результат называется ложно-положительным. Чем выше специфичность метода, тем меньше ложно-положительных [ложно (+)] результатов.

Все методы лабораторной диагностики можно разделить на две группы: методы прямого и непрямого выявления микроорганизмов.

- **Прямые методы** названы так потому, что выявляют непосредственно возбудителей инфекций или материал, входящий в состав возбудителя, или им продуцируемый. Обычно это антигены или генетический материал. К числу прямых методов относятся следующие (табл. 17):

Прямые методы лабораторной диагностики

Методы	Принцип метода	Специфичность	Чувствительность
Микробиологический	Выделение чистой культуры возбудителя	100% “золотой стандарт” лабораторной диагностики	1000 – 10000 кл/мл
Цитологический (микроскопия)	Исследование окрашенных мазков	20 – 80%	1000 – 100000 кл/мл
Иммуноцитологический и серологический	Выявление антигенов после связывания с антителами РИФ, ИФА	70 – 90%	1000 – 100000 кл/мл
Молекулярно-биологический	Определение специфического участка ДНК/РНК в геноме возбудителя	99 – 100% приравнивается к “золотому стандарту”	200 кл/мл (1 клетка в реакции)

- Ложно (+) результаты связаны в случае цитологического метода с субъективностью оценки результатов, в случае иммунологических методов – с перекрестным реагированием антигенов с антителами.

- Ложно (-) результаты в прямых методах могут быть обусловлены недоступностью возбудителя во время забора клинического материала, для микробиологического метода - гибелью микроорганизма в процессе транспортировки образца и в случае некультивируемой формы.

- **Непрямые методы** названы так потому, что выявляют материал не самого возбудителя, а специфические антитела, выработанные человеком в ответ на инфекцию данного типа, т.е. являются иммунологическими. К таким методам относятся: реакция связывания комплимента (РСК), реакция непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ), реакция микроиммунофлуоресценции (МИФ),

рекомбинантный липополисахаридный ИФА (r – ELISA), иммуноферментный анализ (ИФА). Чувствительность этих методов – 1000 – 100000 кл/мл.

При использовании иммунологических методов практически во всех случаях ложно (+) результаты связаны с неспецифическим связыванием антител с антигенами или перекрёстным реагированием антигенов с антителами. Ложно (–) результаты возникают из-за недостаточного количества специфических антител или антигенов в пробе и недостаточной чувствительности методов определения.

Несмотря на значительные успехи современной лабораторной диагностики ни один метод на практике не гарантирует сочетания 100% чувствительности и специфичности. А значит, не дает 100% верного ответа. Поэтому для постановки диагноза врачу нередко необходимо использовать минимум два различных метода, причем каждое исследование лучше проводить в двух- или трёхкратном повторении. Это является требованием при диагностике таких болезней, как туберкулёз, хламидиоз и ряда других.

ПЦР диагностика является одним из наиболее современных и совершенных лабораторных диагностических методов, позволяющий специфично выявлять ДНК единичных клеток возбудителей инфекционных заболеваний в образце.

Есть принципиальное отличие методов молекулярной диагностики, включая ПЦР, от любых других традиционных методов. Это отличие состоит в том, что традиционные методы выявляют продукты деятельности генов микроорганизмов (белки, антигены и более сложно организованные признаки), тогда как ПЦР выявляет непосредственно генетический материал. Таким образом, микроорганизм обнаруживается методом ПЦР в независимости от особенностей функционирования генома, каких-то атипичных проявлений.

Можно сказать, что ПЦР достигает предельно возможной чувствительности. Чувствительность ПЦР-тест-систем составляет 10 – 1000 клеток в пробе, в то время как чувствительность иммунологических и микроскопических методов – 1000 – 100000 клеток в пробе. Благодаря высокой чувствительности, тест-системы на основе ПЦР незаменимы в тех случаях, когда исследуемого материала (возбудителя заболевания) очень мало.

Благодаря высокой чувствительности исследование методом ПЦР позволяет осуществлять раннюю диагностику заболеваний (например, во время профилактических осмотров населения), уточнять диагноз на фоне антибиотикотерапии, проверять излеченность (эффективность проведенного лечения), а также обнаруживать персистирующие микроорганизмы. Для некоторых возбудителей, таких как *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans*, чувствительность диагностических ПЦР-тест-систем не должна быть высокой. Специально разрабатываются и утверждаются показатели чувствительности, начиная с 10^{5-6} клеток в мл. Такие тест-системы выявляют диагностически значимое количество этих микроорганизмов.

При выявлении трудно культивируемых, некультивируемых и персистирующих форм патогенных микроорганизмов только прямой метод, выявляющий ДНК возбудителя, дает необходимый диагностический ответ. Другие способы диагностики (иммунологические, бактериологические, микроскопические) затруднены или даже невозможны. В случае персистирующих микроорганизмов это может быть связано с изменениями в антигенной структуре возбудителей или с переходом таких микроорганизмов в некультивируемую форму. Об этом необходимо помнить при диагностике латентных и хронических инфекций.

Высокая специфичность метода ПЦР задается нуклеотидной последовательностью праймеров и специально отработываемыми при создании ПЦР-тест-системы условиями их присоединения к специфическому строго для данного возбудителя фрагменту ДНК (мишени). В зависимости от выбранных праймеров ПЦР-тест-система может дифференцировать роды, виды, серотипы и даже патогенные и непатогенные штаммы микроорганизмов одного вида.

С помощью ПЦР диагностики инфекций можно определять чувствительность (или устойчивость) возбудителей ко многим из применяемых антибиотиков. Это особенно актуально в тех случаях, когда микробиологический метод исследования применить невозможно.

Для ПЦР-анализа пригоден любой клинический материал, потенциально содержащий возбудителей инфекций – кровь, сыворотка, лаважная жидкость,

мокрота, слюна, желудочный сок, биопсийный материал, мазки, смывы. Исследуемым материалом могут быть пробы с объектов внешней среды (смывы, отпечатки, мазки, вода, почва и т.д.).

ПЦР является унифицированным и автоматизированным методом, что позволяет стандартно выдерживать регламент, утвержденный в разрешительных документах к использованию данной ПЦР-тест-системы и обеспечивает высокую точность и воспроизводимость результатов.

Лабораторная диагностика методом ПЦР – быстрый и надёжный способ выявления возбудителей инфекционных заболеваний. ПЦР-лаборатория даёт ответ через 48 часов с момента доставки материала на исследование. (чистое время исследования каждого образца составляет всего несколько часов.)

В одном клиническом образце можно одновременно определять наличие более 20 возбудителей.

Урогенитальные инфекции.

Микоплазмоз – заболевание, вызываемое грамотрицательными бактериями *Mycoplasma hominis* и *Mycoplasma genitalium*.

В большинстве случаев заражение осуществляется половым путём. Лишь изредка человек может заразиться бытовым путём. Во время данного заболевания у мужчин поражаются яички, семейные пузырьки, мочевого пузырь, парауретральные ходы и другое. Что касается женщин, то у них поражаются уретра, влагалище, шейка матки, яичники, маточные трубы, вестибулярные железы.

Уреаплазмоз – заболевание, вызываемое малыми микроорганизмами *Ureaplasma urealyticum* (уреаплазма уреалитикум), относящимся к грамотрицательным микробам, имеющим дополнительную липидную мембрану, скрывающую клеточную стенку.

Инфекция передаётся как при половом акте. При рождении от больной матери микробы могут попадать в половые пути ребёнка во время родов и сохраняться там всю жизнь, находясь в неактивном состоянии. В настоящее время убедительных доказательств возможности инфицирования контактно-бытовым способом нет.

Уреаплазма может годами жить в организме, не вызывая какой-либо симптоматики и никак себя не проявляя. Главный фактор защиты организма – нормальная микрофлора, которая и является физиологическим барьером. Как только нарушается баланс микроорганизмов, барьер исчезает, количество уреоплазм быстро растет, и начинается заболевание уреоплазмоз.

Гарднереллез (бактериальный вагиноз) – довольно распространенное гинекологическое заболевание, развивающееся в результате повышения концентрации во влагалище бактерий *Gardnerella vaginalis*. *Gardnerella vaginalis* (Гарднерелла вагиналис) – единственный вид микроорганизмов монотипического рода *Gardnerella*, факультативные анаэробы, в небольшом количестве является постоянным представителем микрофлоры женского организма. Род *Gardnerella* был выделен в 1980 году из рода *Haemophilus*.

При развитии гарднереллеза гарднереллы активно размножаются в микрофлоре влагалища и уретры, быстро уничтожая нормальную микрофлору.

Кандидоз (молочница) – одна из разновидностей грибковой инфекции, вызывается микроскопическими дрожжеподобными грибами рода *Candida* (*Candida albicans*). Всех представителей данного рода относят к условно-патогенным.

Микроорганизмы рода *Candida* входят в состав нормальной микрофлоры рта, влагалища и толстой кишки большинства здоровых людей. Заболевание обусловлено не просто наличием грибов рода *Candida*, а их размножением в большом количестве, и/или попаданием более патогенных штаммов гриба. Чаще всего кандидоз возникает при снижении общего и местного иммунитета.

Молекулярно-генетическая диагностика.

Для выявления возбудителя урогенитальных инфекций применяют метод посева и ПЦР. Метод ПЦР обладает высокой чувствительностью и специфичностью в сравнении с культуральными и микроскопическими методами исследования. Материалом для исследования могут служить не только выделения из мочеиспускательного канала, шейки матки, влагалища, но и моча. Сначала проводится выделение ДНК из исследуемого материала, а затем – амплификация со специфическими праймерами. В настоящее время существуют наборы для выявления

инфекций в реальном времени с флуоресцентной детекцией. Время от взятия материала для исследования до получения результатов обычно составляет 1 – 2 сут.

Вирусные инфекции

Герпесви́русы (лат. Herpesviridae) – это большое семейство ДНК-содержащих вирусов, вызывающее разнообразные болезни не только у человека и других млекопитающих, но и у птиц, рептилий, амфибий, рыб. Герпесвирусами заражено большинство населения нашей планеты.

Классифицируют восемь типов вирусов герпеса, вызывающих разные по тяжести процесса заболевания у людей (табл. 18). Характерной особенностью заболеваний является нахождение вирусов в организме человека в латентном состоянии.

Таблица 18

Классификация вирусов герпеса, вызывающих заболевания у людей

Тип герпесвируса человека	Вид вируса	Подсемейство вирусов	Род вирусов	Вызываемая болезнь
Герпесвирус человека тип 1 (Human Herpesvirus-1, HHV-1)	Вирус простого герпеса первого типа, ВПГ-1 (Herpes simplex virus-1, HSV-1)	Альфа-герпесвирусов	Симплексовирусов (Simplex virus):	Вызывает: оральные и генитальные герпесы, но чаще оральные (герпетический стоматит, губной герпес).
Герпесвирус человека тип 2 (Human Herpesvirus-2, HHV-2)	Вирус простого герпеса второго типа, ВПГ-2 (Herpes simplex virus-2, HSV-2)	Альфа-герпесвирусов	Симплексовирусов (Simplex virus):	Вызывает: оральные и генитальные герпесы, но чаще генитальный и вагинальный герпес.
Герпесвирус человека тип 3 (Human Herpesvirus-3, HHV-3)	Вирус ветряной оспы (Varicella-zoster virus, VZV)	Альфагерпесвирусов	Вариоцелловирусов (Varicello virus)	Вызывает ветряную оспу (варицелла, varicella), опоясывающий лишай (зостер, zoster).

Герпесвиру с человека тип 4 (Human Herpesvirus- 4, HHV-4)	Вирус Эпштейна – Барр, ВЭБ (Epstein-Barr virus, EBV)	Гамма- герпес- вирусов	Лимфо- крипто- вирусов (Lympho cryptovir us)	Вызывает: инфекционный мононуклеоз, лимфому Беркитта, лимфомы ЦНС у больных с иммунодефицитным синдромом, посттрансплантантный лимфопролиферативный синдром (post-transplant lymphoproliferative syndrome, PTLD), назофарингеальную карциному.
Герпесвиру с человека тип 5 (Human Herpesvirus- 5, HHV-5)	Цитомегалов ирус человека, ЦМВ (Human cytomegalovir us, HCMV)	Бета- герпес- вирусов	Цито- мегало- вирусов (Cytomeg alovirus):	Вызывает инфекционный мононуклеоз, ретинит, гепатит, увеличение органов брюшной полости, воспаление слюнных желез (так называемое слюнотечение)
Герпесвиру с человека тип 6 , ВГЧ-6 (Human Herpesvirus- 6, HHV-6)	Розеоловирус (HHV-6А и 6В)	Бета- герпес- вирусов	Розеоло- вирус	Вызывает шестую болезнь – детскую розеолу (розеола инфантум, roseola infantum) или экзантему (экзантема субитум, exanthem subitum)
Герпесвиру с человека тип 7, ВГЧ- 7 (Human Herpesvirus- 7, HHV-7)	Розеоловирус (HHV-7 (англ.))	Бета- герпес- вирусов	Розеоло- вирус	Является вероятной причиной СХУ (синдрома хронической усталости). Часто сосуществует с вирусом герпеса 6 типа.
Герпесвиру с человека тип 8, ВГЧ- 8 (Human Herpesvirus- 8, HHV-8)	Герпесвирус, ассоциирован ный с саркомой Капоши (Kaposi's sarcoma- associated herpesvirus, KSHV)	Гамма- герпес- вирусов	Радино- вирус (Rhadino virus)	Вызывает саркому Капоши, первичную лимфому серозных полостей, некоторые разновидности болезни Кастельмана

Вирусный гепатит – воспаление ткани печени, вызываемое вирусами.

Вирусы гепатита относятся к разным таксонам и отличаются по биохимическим и молекулярным признакам, но все эти вирусы объединяет то, что они вызывают гепатиты у людей.

Вирус гепатита А принадлежит к семейству Picornaviridae, не имеет оболочки и содержит (+) одноцепочечную РНК, упакованную в белковый капсид. Описан лишь один серотип вируса, однако описано много вирусных генотипов. Вирус гепатита А имеет слабый внутренний участок посадки рибосомы. Участок генома, который кодирует капсид вируса гепатита А, содержит консервативные кластеры кодонов, ограничивающих антигенную вариабельность.

Вирус гепатита В – ДНК-содержащий вирус из семейства гепаднавирусов, возбудитель вирусного гепатита В. В мире по различным оценкам от 3 до 6 % людей инфицировано вирусом гепатита В. Носительство вируса не обязательно сопровождается гепатитом, однако носитель вируса может заражать других людей.

Вирус гепатита С – РНК-содержащий вирус с размером вириона 30 – 60 нм, относящимся к семейству Flaviviridae. Вирусные частицы HCV имеют оболочку, содержатся в крови в следовых количествах и ассоциированы с липопротеинами низкой плотности и антителами к белкам вируса гепатита С. Вирусы, выделенные из комплексов с липопротеинами и анти-HCV антителами, имеют диаметр 60 – 70 нм. При электронно-микроскопическом изучении на поверхности вириона выявлены хорошо выраженные выступы высотой 6 – 8 нм.

Лабораторная диагностика вирусных гепатитов основана на определении специфических антигенов или антител, а также на выявлении возбудителя в крови или биоптате.

Диагностика наследственных заболеваний

Наследственные заболевания – заболевания, возникновение и развитие которых связано с дефектами в наследственном аппарате клеток, передаваемыми по наследству через гаметы. Термин употребляется в отношении полиэтиологических заболеваний, в отличие от более узкой группы

– генные болезни. Наследственные заболевания обусловлены нарушениями в процессах хранения, передачи и реализации генетической информации.

От наследственных заболеваний следует отличать врождённые заболевания, которые обусловлены внутриутробными повреждениями, вызванными, например, инфекцией (сифилис или токсоплазмоз) или воздействием иных повреждающих факторов на плод во время беременности. Наследственные болезни и врождённые заболевания представляют собой два частично перекрывающихся множества.

При наследственных заболеваниях могут иметь место цитогенетические нарушения различного характера и локализации. Эти болезни могут быть связаны с нарушениями ядерной (хромосомной) или митохондриальной ДНК. Они могут развиваться в результате генных (точечных) мутаций (транзиции, трансверсии, мутации сдвига рамки считывания), либо довольно грубых изменений структуры хромосом или мтДНК (делеции, дупликации, инверсии, транслокации, транспозиции), а также вследствие геномных мутаций (изменения числа хромосом).

В современной медицине применяются следующие методы диагностики наследственных заболеваний:

- молекулярно-генетическая диагностика наследственных заболеваний – позволяет выявить наследственные заболевания на уровне ДНК;
- биохимическая диагностика наследственных заболеваний – с помощью современных методов биохимии проверяют наследственную предрасположенность к болезням, связанным с обменом веществ;
- иммуногенетическая диагностика наследственных заболеваний – позволяет выявить наследственный иммунодефицит, оценить совместимость матери и плода;
- цитологическая диагностика наследственных заболеваний – необходима для выявления наследственных кожных заболеваний;
- метод сцепления генов – когда невозможно провести прямую диагностику, с его помощью выясняется, унаследовали ли будущий ребенок мутантный ген.

Все вышеперечисленные методы значительно облегчают диагностику наследственных заболеваний даже на ранних стадиях беременности. Наиболее важной является молекулярно-генетическая диагностика. Ведь именно она позволяет выявить мутационные гены и оценить риски развития наследственных болезней.

Для постнатальной диагностики наследственных заболеваний проще всего использовать кровь пациента. В пренатальной диагностике для получения материала используют следующие методы:

1. Биопсия хориона и плаценты.
2. Амниоцентез.
3. Кордоцентез.
4. Биопсия тканей плода.
5. Фетоскопия.

Биопсия применяется для получения небольших кусочков плаценты в период с 7-й по 16-ую неделю беременности. Первоначально этот метод развивался для использования в пренатальной диагностике в 1-м триместре беременности. Процедура осуществляется трансабдоминально или трансцервикально под контролем УЗИ. Принципиально различия между показаниями для применения этих двух способов биопсии нет. Эффективность диагностики зависит от того, каким методом специалист владеет лучше. Хотя по оперативной технике хорионбиопсия относится к простым операциям, необходимы достаточный опыт и постоянное его подкрепление. Хорошие результаты отмечаются у акушеров, делающих не менее 200 – 400 хорионбиопсий в год. Неудачи взятия образцов ткани хориона составляют 1 – 4%. Образцы хориона (ворсины) подлежат лабораторной диагностике наследственных болезней. При аспирации ворсин хориона в материал могут попадать клетки слизистой оболочки матки, что может приводить к некоторым диагностическим ошибкам. Считается, что в 4% случаев лабораторная диагностика биоптатов хориона дает ложноположительные результаты, а иногда хотя и редко ложноотрицательные.

Амниоцентез, или прокол плодного пузыря, с целью получения околоплодной жидкости и находящихся в ней слущенных клеток амниона и плода используется для пренатальной диагностики с начала 70-х годов. Уже накоплен опыт проведения этой процедуры. Диагностическая значимость метода не вызывает сомнений. Эта процедура осуществляется на 15 – 18-й неделе беременности. Амниоцентез делают чрезбрюшинно под контролем УЗИ, чтобы не повредить плаценту. Чрезвлагалищный амниоцентез возможен, но такой подход применяется редко. Предлагавшиеся ранее биохимическое и вирусологическое исследование амниотической жидкости малоинформативно для пренатальной диагностики. Основным источником диагностического материала при амниоцентезе являются клетки. Их обязательно надо культивировать и для цитогенетических, и для биохимических исследований. Только молекулярно-генетические варианты (ПЦР или секвенирование) не требуют культивирования клеток.

Кордоцентез, т.е. взятие крови из пуповины, стал использоваться шире после того, как эту процедуру начали осуществлять под контролем УЗИ, т. е. без фотоскопии. Процедуру проводят в срок с 18-й по 22-ую неделю беременности. Образцы крови являются объектом для цитогенетических, молекулярно-генетических и биохимических методов диагностики наследственных болезней. Кордоцентез используют для диагностики хромосомных болезней, гематологических наследственных болезней, иммунодефицитов, гематологического статуса при резус-сенсбилизации, внутриутробных инфекций. Преимущество кордоцентеза по сравнению с амниоцентезом заключается в том, что кровь является более удобным объектом для исследования, чем клетки амниотической жидкости.

Биопсия тканей плода как диагностическая процедура осуществляется во 2-м триместре беременности под контролем УЗИ. Для диагностики тяжелых наследственных болезней кожи делают биопсию кожи плода. Далее проводится патоморфологические исследования. Морфологические критерии наличия наследственных болезней кожи позволяют поставить точный диагноз или подтвердить его. Для диагностики мышечной дистрофии Дюшенна на внутриутробной стадии развития разработан иммунофлюоресцентный метод. Для

этого производят биопсию мышц плода. Биоптат обрабатывается моноклональными мечеными антителами к белку дистрофину, который у больных не синтезируется. Соответствующая флюоресцентная обработка "высвечивает" белок. При унаследовании патологического гена свечение отсутствует. Этот прием является примером диагностики наследственной болезни на уровне первичного продукта гена. В случае миопатии Дюшенна такой метод дает более правильные результаты, чем молекулярно – генетическая диагностика.

Фетоскопия (введение зонда и осмотр плода) при современной гибкооптической технике не представляет больших трудностей. Однако метод визуального обследования плода для выявления врожденных пороков развития используется редко – только при особых показаниях. Он применяется на 18 – 23 недели беременности. Дело в том, что почти все врожденные пороки развития, которые можно увидеть с помощью оптического зонда, диагностируются с помощью УЗИ. Понятно, что процедура УЗИ проще и безопаснее. Для фетоскопии требуется вхождение зонда в амниотическую полость, что может вызвать осложнение беременности.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

1. Молекулярно-генетические методы диагностики, их классификация.
2. Роль ПЦР в диагностике заболеваний.
3. Диагностика урогенитальных инфекций.
4. Диагностика вирусных заболеваний.
5. Диагностика наследственных заболеваний.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

1. Записать протокол практического занятия с указанием ее цели и задач, молекулярно-генетических методов диагностики.
2. Записать методы исследования при инфекционных и наследственных заболеваниях.
3. Расшифровать результаты ПЦР в реальном времени при различных инфекционных заболеваниях. Дать заключение с внесением в протокол.

9. Тема занятия: Организация лаборатории для исследований объектов окружающей среды.

Цель: знать структуру и организацию работы лабораторий, проводящих исследования объектов окружающей среды обитания человека для осуществления мероприятий по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения.

Перечень знаний и практических навыков:

- знать структуру и основные задачи испытательной лаборатории (центра) в исследовании объектов окружающей среды;
- уметь работать с объектами испытаний: отбор, доставка, хранение и уничтожение (утилизация) проб.

Лабораторное дело является одним из основных звеньев в профилактике заболеваний человека. Для выполнения этих функций в арсенале службы Роспотребнадзора существуют санитарно-гигиенические лаборатории, осуществляющие санитарно-гигиенические исследования.

Санитарно-гигиенические исследования – совокупность научных подходов и методов, которые используются для изучения объектов окружающей среды и их влияния на организм человека. Данные исследования позволяют получить сведения о состоянии объектов окружающей среды, их взаимосвязи с состоянием здоровья человека, причинами заболеваний, разработках профилактических мероприятий, направленных на охрану здоровья и улучшение условий жизни населения.

Санитарно-гигиеническая лаборатория входит в состав аккредитованного Испытательного лабораторного центра (ИЛЦ) Федерального государственного учреждения здравоохранения «Центр гигиены и эпидемиологии региона».

ИЛЦ осуществляет свою деятельность в области испытаний, измерений и исследований в полном соответствии с установленными в нормативной документации требованиями и санитарно-гигиеническими и эпидемиологическими нормами с гарантированной точностью, достоверностью и объективностью.

В испытательный лабораторный центр входят:

1. Отдел стандартизации (организации лабораторного контроля и метрологического обеспечения).

2. Санитарно-гигиеническая лаборатория в составе:

- отделение гигиены питания;
- отделение физико-химических методов исследований;
- отделение по исследованию воды, почвы, атмосферного воздуха.

3. Микробиологическая лаборатория в составе:

- отделение санитарной бактериологии;
- отделение эпидемиологической бактериологии;
- отделение особо опасных инфекций;
- отделение вирусологии;
- отделение паразитологии.

4. Отдел профилактической токсикологии в составе:

- отделение токсиколого-гигиенических оценок и экспертиз;
- отделение токсикологических и гигиенических исследований.

5. Отдел гигиены источников неионизирующих излучений.

6. Отдел гигиены источников ионизирующих излучений.

Исследуемые объекты окружающей среды в испытательных лабораторных центрах представлены в табл. 19.

Таблица 19

**Перечень объектов окружающей среды
исследуемых в испытательных лабораторных центрах**

Название объектов	Определяемые показатели
Пищевые продукты, продовольственное сырье и пищевые добавки	Органолептические, физико-химические, токсичные элементы, микотоксины, пестициды, витамины, минеральные вещества, микробиологические, количественное и качественное определение рекомбинантной (генетически модифицированной) ДНК, радиационной безопасности, паразитологические (яйца и личинки гельминтов)

Биологически активные добавки к пище - БАД	Органолептические, физико-химические, токсичные элементы, микотоксины, пестициды, витамины, минеральные вещества, показатели подлинности, микробиологические, радиационной безопасности
Генетические модифицированные источники пищи - ГМИ	Количественное и качественное определение рекомбинантной (генетически модифицированной) ДНК
Вода централизованных систем питьевого водоснабжения, нецентрализованного водоснабжения, питьевая, расфасованная в емкости, дистиллированная	Органолептические, физико-химические, пестициды, токсичные элементы, микробиологические, паразитологические (цисты лямблий, ооцисты криптоспоридий, яйца и личинки гельминтов), вирусологические
Вода плавательных бассейнов, вода открытых водоемов, вода сточная и донные отложения	Органолептические, физико-химические, микробиологические, паразитологические, вирусологические, возбудители особо опасных инфекций
Материалы, контактирующие с пищевыми продуктами	Органолептические (образцов и вытяжек), санитарно-химические, общая токсичность
Игрушки и елочные украшения, предметы игрового обихода, игры, игрушки, изготовленные из полимерных материалов и резин, игрушки мягконабивные	Органолептические (образцов и вытяжек), санитарно-химические, общая токсичность
Товары бытовой химии	Органолептические, санитарно-химические, общая токсичность, физико-химические, токсикологические
Материалы строительные, кроме сборных железобетонных конструкций и деталей	Органолептические, санитарно-химические, токсикологические, радиационной безопасности
Мебель	Органолептические, санитарно-химические, токсикологические
Продукция текстильной, трикотажной промышленности, изделия швейные	Органолептические, санитарно-химические, физико-химические
Продукция резинотехническая, в т. ч. изделия медицинского назначения	Органолептические, санитарно-химические, общая токсичность, микробиологические

Продукция целлюлозно-бумажной промышленности: бумага, картон, тетради, обои, товары бумажно-беловые, тара из бумаги и картона	Органолептические, санитарно-химические, общая токсичность
Издания книжные, журнальные, газетные, нотные календари, плакаты, открытки, тетради	Санитарно-химические
Видеодисплейные терминалы, персональные ЭВМ и элементы систем на их основе	Органолептические (образцов и вытяжек), параметры электромагнитного излучения (электрическое и магнитное поле диапазона 5 Гц - 2 кГц, электрическое и магнитное поле диапазона 2 кГц - 400 кГц, электростатический потенциал), визуальные эргономические параметры дисплеев (яркость, отраженная блёсткость, коэффициент пульсации), шум, вибрация, санитарно-химические
Продукция машиностроения, транспорт, оборудование светотехническое, вычислительная техника, приборы и средства автоматизации, приборы и аппаратура оптические, оборудование технологическое, средства проводной связи и аппаратура радиосвязи оконечная и промежуточная, изделия культурно-бытового, хозяйственного, учебного назначения	Шум, вибрация, ЭМП, ЭМП - промышленной частоты 50 Гц, освещенность, микроклимат, электростатическое поле, инфразвук, МП промышленной частоты, ЭП промышленной частоты, постоянное магнитное поле, рентгеновское излучение, вредные вещества в воздухе, инфразвук
Лом черных и цветных металлов	Радиационной безопасности
Удобрения минеральные	Радиационной безопасности
Химические вещества и соединения	Токсикологические, общая токсичность
Производственные помещения, производственные зоны и рабочие места, в т.ч. для целей аттестации рабочих мест, жилые и общественные здания	Физические факторы, радиационной безопасности

Территория жилой застройки	Физические факторы, радиационной безопасности, паразитологические, энтомологические
Атмосферный воздух, воздух жилых и общественных зданий, воздух рабочей зоны	Санитарно-химические, микробиологические, радиационной безопасности
Смывы с объектов окружающей среды	Микробиологические, паразитологические, возбудители особо опасных инфекций
Грунты, почвы	Санитарно-химические, микробиологические, паразитологические, радиационной безопасности, возбудители особо опасных инфекций
Строительное сырьё и материала, отходы промышленного производства, используемые для изготовления строительных материалов и изделий	Радиационной безопасности
Минеральное сырьё и материала с повышенным содержанием природных радионуклидов	Радиационной безопасности
Продукция лесозаготовительной и лесоперерабатывающей промышленности	Радиационной безопасности
Материалы и изделия, загрязненные или содержащие радионуклиды	Радиационной безопасности
Площадки под строительство (почва, грунт)	Санитарно-химические, радиационной безопасности, микробиологические, в т. ч. особо опасные инфекции (сибирская язва)

Отбор проб объектов окружающей среды

Нормативные документы:

Отбор проб воды:

— ГН 2.1.5.1315-03 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования».

— ГН 2.1.5.2280-07 «Дополнения и изменения к ГН 2.1.5.1315-03».

— СанПиН 2.1.4.1074-01 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества».

— СанПиН 2.1.5.980-00 «Водоотведение населённых мест, санитарная охрана водных объектов. Гигиенические требования к охране поверхностных вод».

— ГОСТ Р 51592-2000 «Вода. Общие требования к отбору проб».

Отбор проб грунта:

— СанПиН 2.1.7.1287-03 «Санитарно-эпидемиологические требования к качеству почвы».

— ГН 2.1.7.2041-06 «Предельно-допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в почве».

— 17.4.3.01-83 «Охрана природы. Почвы. Общие требования к отбору проб».

— ГОСТ 17.4.4.02-84 «Охрана природы. Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа».

Отбор проб атмосферы:

— РД 52.04.186-89 «Руководство по контролю загрязнений атмосферы».

— ГН 2.1.6.1338-03 «Предельно-допустимые концентрации (ПДК) загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населённых мест».

— ГН 2.1.6.2309-07 «Ориентировочно-безопасные уровни воздействия (ОБУВ) загрязняющих веществ в воздухе населённых мест».

— Дополнения и изменения 2 к ГН 2.1.6.1338-03, ГН 2.1.6.1983-05 «Предельно-допустимые концентрации (ПДК) загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населённых мест».

— ГН 2.2.5.1313-3 «Предельно-допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны».

Отбор проб отходов производства и потребления:

— СанПиН 2.1.7.1322-03. Гигиенические требования к размещению и обезвреживанию отходов производства и потребления.

Отбор проб осуществляют с целью последующего анализа в лаборатории на предмет соответствия санитарным нормам. В зависимости от целей применения объектов окружающей среды используются различные методики и требования к отбору проб. Обязательным условием отбора проб является соблюдение правил безопасности работы с возбудителями инфекционных заболеваний I–II групп

патогенности, с химическими и радиоактивными веществами, а также их комбинациями (все процедуры во время получения, распаковки и регистрации проб осуществляют в защитной одежде и резиновых перчатках).

Отобранная проба помещается в пластиковый пакет или другую лабораторную посуду с плотно закрывающимися пробками или, что более предпочтительно, навинчивающимися крышками (крышки должны надежно предохранять содержимое емкости от протечек), затем в металлический контейнер или бикс, который опломбируется и обрабатывается дезинфицирующим раствором, маркируют, помещают в термоконтейнеры/термосы, обеспечивающие температурный режим 4 – 8°C, и доставляют в лабораторию. На отобранные пробы составляется направление, включающее следующие данные:

- дата и час отбора проб, место отбора;
- характеристика пробы (почва, вода, пищевые продукты, животные и т.д.);
- если проб несколько, то указывается номер и место отбора каждой;
- куда направляется проба и на предмет каких исследований;
- фамилия лица, отбиравшего пробу;
- дата направления.

После доставки проб в лабораторию термоконтейнер (термос) распаковывают в отведенной для этого зоне, соблюдая правила биологической безопасности. В зоне, где происходит распаковка, должны иметься емкость для мусора, тампоны, смоченные 70%-ным раствором этилового спирта. При обработке проб могут образовываться аэрозоли. Поэтому все работы по подготовке проб для исследования проводятся в биологическом защитном укрытии (БЗУ) 2-го класса защиты.

Распаковка и регистрация материалов осуществляется двумя сотрудниками – один регистрирует поступившие материалы в рабочем журнале, другой открывает упаковку, проверяет целостность емкостей с материалом, отсутствие протечек, полноту сопроводительных документов. В этот момент фиксируется состояние присланных проб – отсутствие протечек, соблюдение температурного режима, полнота документации.

Каждой пробе присваивают идентификационный номер, под которым она регистрируется в лабораторном журнале. Далее этим номером помечают все емкости (центрифужные пробирки, флаконы/пробирки с культурой клеток и пр.), относящиеся к данной пробе в процессе ее исследования и хранения в данной лаборатории.

Обработку проб следует начать незамедлительно после доставки в лабораторию. Если обработка будет начата в течение 48 ч, пробы можно поместить в холодильник (0 – 8°C). В любом случае следует помнить, что исследование предпринимается для получения оперативной информации и последующего оперативного реагирования, поэтому пробы не должны накапливаться в лаборатории для ретроспективного исследования.

Отбор проб воды.

При отборе воды из распределительных сетей пробы берут из крана, после предварительной его стерилизации и спуска воды в течение 10 минут при полностью открытом кране.

Для взятия проб из глубинных открытых водоемов и колодцев или бассейнов используются специальные приборы: батометры, прибор Исаченко. При отсутствии батометров пробу воды можно отбирать с помощью бутылки, в крышку которой вмонтированы две стеклянные трубки, соединенные резиновым шлангом. Посуда обязательно должна быть стерильной. Для взятия проб питьевой воды используют стерильные склянки емкостью 0,5 л или 1,0 л.

Воду наливают в бутылки с соблюдением стерильности, не смачивая горла и пробки.

Родниковую воду берут непосредственно из струи или из седины текущего родника, на расстоянии 10,0 – 15,0 см от поверхности дна.

Артезианскую и колодезную воду забирают на глубине 10,0 – 15,0 см.

Из открытых водоемов, как правило, берут серию проб на разном удалении от берега и на различной глубине.

Пробы сточных вод также забирают в стерильные бутылки. В некоторых случаях для выяснения источника распространения инфекции приходится исследовать сточные воды из больничных отделений или жилых домов.

Существуют два принципа отбора проб воды:

– Одномоментный, при котором отбирают определенный объем воды в определенное время или, что предпочтительнее, серию проб определенного объема отбирают в разное заранее намеченное время, чтобы затем составить смешанную пробу. До начала концентрирования пробу (1,0 л) делят на две части (по 500,0 мл) – одну часть подвергают концентрированию (с использованием фильтрующих мембран, ионообменных смол, с помощью метода двухфазного разделения), другую хранят при -20°C для возможного повторного исследования.

– "Адсорбционный", при котором в ток воды на определенное время помещают адсорбирующий материал, а затем проводят элюцию бактериальных и вирусных частиц с адсорбента (метод Риордана, концентрирование на макропористом стекле МПС).

Исходные материалы (образцы воды, собранные одномоментным методом, фракции, полученные при элюции с МПС, и пр.) хранят при -20°C в течение 12 мес. от момента поступления в лабораторию, но не менее 3 мес. от момента подтверждения результата исследования в подтверждающей лаборатории соответствующего уровня. После истечения срока хранения материалы уничтожаются автоклавированием в установленном порядке.

Отбор проб почвы.

Точечные пробы отбирают на пробной площадке из одного или нескольких слоев или горизонтов методом конверта, по диагонали или любым другим способом с таким расчетом, чтобы каждая проба представляла собой часть почвы, типичной для слоев данного типа почвы.

Точечные пробы отбирают ножом или шпателем из прикопок или почвенным буром.

Объединенную пробу составляют путем смешивания точечных проб, отобранных на одной пробной площадке.

Для химического анализа объединенную пробу составляют не менее, чем из пяти точечных проб, взятых с одной пробной площадки. Масса объединенной пробы должна быть не менее 1 кг.

Для контроля загрязнения поверхностно-распределяющимися веществами – нефть, нефтепродукты, тяжелые металлы и др. – точечные пробы отбирают послойно с глубины 0 – 5 и 5 – 20 см массой не более 200 г каждая.

Для контроля загрязнения легко мигрирующими веществами точечные пробы отбирают по генетическим горизонтам на всю глубину почвенного профиля.

Точечные пробы почвы, предназначенные для определения пестицидов, не следует отбирать в полиэтиленовую или пластмассовую тару.

Для бактериологического анализа с одной пробной площадки составляют 10 объединенных проб. Каждую объединенную пробу составляют из трех точечных проб массой от 200 до 250 г каждая, отобранных послойно с глубины 0 – 5 и 5 – 20 см.

Пробы почвы, предназначенные для бактериологического анализа, в целях предотвращения их вторичного загрязнения следует отбирать с соблюдением условий асептики: отбирать стерильными инструментами, перемешивать на стерильной поверхности, помещать в стерильную тару.

Для гельминтологического анализа с каждой пробной площадки берут одну объединенную пробу массой 200 г, составленную из десяти точечных проб массой 20 г каждая, отобранных послойно с глубины 0 – 5 и 5 – 10 см. При необходимости отбор проб проводят из глубоких слоев почвы послойно или по генетическим горизонтам.

Пробы почвы для химического анализа высушивают до воздушно-сухого состояния по ГОСТ 5180-75. Воздушно-сухие пробы хранят в матерчатых мешочках, в картонных коробках или в стеклянной таре.

Пробы почвы, предназначенные для бактериологического анализа, упаковывают в сумки-холодильники и сразу доставляют в лабораторию на анализ. При невозможности проведения анализа в течение одного дня пробы почвы хранят в холодильнике при температуре от 4 до 5°C не более 24 ч.

При анализе на кишечные палочки и энтерококки пробы почвы хранят в холодильнике не более 3 сут.

Пробы почвы, предназначенные для гельминтологического анализа, доставляют в лабораторию на анализ сразу после отбора. При невозможности немедленного проведения анализа пробы хранят в холодильнике при температуре от 4 до 5°C.

Для исследования на яйца биогельминтов почву без обработки хранят не более 7 сут., для исследования на яйца геогельминтов – не более 1 мес. При хранении проб для предотвращения высыхания и развития личинок в яйцах геогельминтов почву увлажняют и аэрируют один раз в неделю, для чего пробы вынимают из холодильника и оставляют на 3 ч при комнатной температуре, увлажняют водой по мере потери влаги и снова помещают для хранения в холодильник.

При необходимости хранения проб почвы более месяца применяют консервирующие средства: почву пересыпают в кристаллизатор, заливают раствором формалина с массовой долей 3%, приготовленным на изотоническом растворе натрия хлористого с массовой долей 0,85% (жидкость Барбагалло), или раствором соляной кислоты с массовой долей 3%, а затем ставят в холодильник.

Отбор проб воздуха.

Исследование воздуха с целью выявления содержания в нем инфицирующих и токсичных веществ является одной из труднейших задач. Это связано с тем, что, во-первых, воздух представляет собой неустойчивую фазу и, во-вторых, в одной пробе может одновременно находиться большое число различных токсичных и нетоксичных веществ. Кроме того воздух является средой, в которой микроорганизмы не способны размножаться, что обусловлено отсутствием в воздухе питательных веществ, недостатком влаги, губительным действием солнечных лучей. Жизнеспособность микроорганизмов в воздухе обеспечивается нахождением их в частицах воды, слизи, пыли, кусочках почвы.

Отбор проб исследуемого воздуха – важнейшая часть работы, поскольку результат самого точного анализа теряет смысл в случае неправильно отобранной пробы. К процессу отбора проб предъявляются следующие требования:

- получение пробы, соответствующей реальному составу воздуха;

- накопление в пробе достаточного для обнаружения количества искомого вещества.

Способы отбора проб воздуха зависят от ряда причин:

- агрегатного состояния искомого вещества в воздушной среде (аэрозоли конденсации и дезинтеграции, пары, газы);
- возможных химических взаимодействий искомым веществ с воздушной средой;
- числа исследуемых вредных веществ в воздухе;
- метода исследования.

Для микробиологического исследования атмосферный воздух исследуют в жилой зоне на уровне 0,5 – 2,0 м от земли вблизи источников загрязнения. В закрытых помещениях отбор проб проводят в 5-ти различных местах обследуемого помещения (по типу «конверта»): 4 точки отбора по углам помещения (на расстоянии 0,5 м от стен), а 5-я точка отбора – в центре помещения. Пробы воздуха забирают на высоте 1,6 – 1,8 м от пола – на уровне дыхания в жилых помещениях и на уровне коек – в условиях больничных палат. Пробы воздуха необходимо отбирать днем в период активной деятельности человека, после влажной уборки и проветривания помещения.

При проведении лабораторных исследований воздуха используются различные методы отбора проб. Наиболее распространенными являются *аспирационный метод* и *метод отбора проб в сосуды*. Пробы воздуха отбирают в моменты наибольшего его загрязнения, с подветренной стороны от источника загрязнения (не менее 10 проб в каждой точке через равные промежутки времени). Продолжительность отбора пробы 15 – 20 мин. При отборе проб воздуха необходимо производить измерение его температуры и относительной влажности.

Аспириационный метод. Основу аспирационного метода составляет аспирация, т.е. протягивание исследуемого воздуха через специальные вещества, способные поглощать из проходящего воздуха подлежащий определению ингредиент. Такие вещества называются поглотительными средами.

Поглотительные приборы, применяемые для отбора проб, представляют собой стеклянные пробирки, запаянные сверху и спаянные с двумя стеклянными трубочками: длинной, через которую поступает из помещения исследуемый воздух, и короткой, присоединяемой через реометр к воздуходувке. В нижнюю часть поглотителя наливается поглощающая жидкость, через которую просасывается исследуемый воздух (поглотители Полежаева). При отборе проб воздуха нужно следить за скоростью просасывания исследуемого воздуха через поглотитель. Для большинства газов и паров эта скорость составляет 15 – 30 л/час.

Для аспирационного метода широко применяют универсальный электроаспиратор Мигунова-Кабанова (УАМК-3), а также стационарные электроаспираторы – аэрозольный ингалятор АИ-1, портативный аспиратор с аккумуляторными батареями, автоматические и неавтоматические электроаспираторы, работающие на переменном токе и аккумуляторах.

Отбор санитарных проб воздуха для бактериологического исследования производится при помощи прибора Кротова, принцип действия которого основан на чисто механической аспирации воздуха через щель в крышке прибора, расположенной над вращающейся поверхностью питательной среды в чашке Петри, вследствие чего происходит инерционное осаждение бактерий из воздуха на поверхность питательной среды.

Отбор проб в сосуды. Метод удобен тем, что позволяет быстро отобрать пробу, поэтому он используется для массовых проб. В данном методе могут применяться простые бутылки (газовые пипетки, резиновые камеры, шприцы), в которых предварительно создан вакуум; для избирательных проб используются насосы, соединенные с какой-либо силовой установкой или батареей, с помощью которых воздух пропускается в соответствующую емкость через специальные фильтры. В бутылки и газовые пипетки исследуемый воздух отбирают вакуумным способом. Предварительно из них вакуум-насосом откачивают воздух до остаточного давления 20 – 50 мм рт. ст.

Седиментационный метод применяется для микробиологического исследования воздуха, который основан на происходящем под действием силы тяжести осаждении микроорганизмов на поверхность соответствующей плотной питательной среды.

Чашку с питательной средой (открытую) ставят на горизонтальную поверхность на высоте рабочего стола и оставляют на определенное время. Затем чашку закрывают и инкубируют 18 – 24 часа, после чего подсчитывают количество выросших колоний.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

1. Организация лаборатории для исследований объектов окружающей среды.
2. Структура ИЛЦ, ее роль и значение в деятельности ФСПНСЗПП России.
3. Отбор и доставка проб воды в лабораторию.
4. Отбор и доставка проб почвы в лабораторию.
5. Отбор и доставка проб воздуха в лабораторию.
6. Хранение и уничтожение (утилизация) проб.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

1. Записать протокол практического занятия с указанием ее цели и задачи, видов исследования объектов окружающей среды.
2. Записать методы хранения, утилизации проб, способы отбора проб для исследований.

10. Тема занятия: Лабораторные методы исследований объектов окружающей среды.

Цель занятия: познакомиться с методами исследования окружающей среды, применяемыми в лабораторной практике.

Перечень знаний и практических навыков:

- Знать оптикоспектральные, хроматографические, электрохимические, экспресс-методы анализа.
- Усвоить принцип физико-химических, радиологических, паразитологических и вирусологических методов исследований.
- Овладеть навыками бактериологического метода исследования объектов внешней среды.

Лабораторные исследования объектов окружающей среды проводятся в соответствии с действующими нормативно-методическими документами и включают в себя:

- Органолептические методы исследования.
- Физические.
- Химические.
- Биологические.
- Бактериологические.
- Серологические.
- Паразитологические.
- Вирусологические.

Органолептические методы исследования. Эти методы основаны на восприятии органов чувств – зрения, обоняния, вкуса и осязания. При помощи их можно определить внешний вид. Цвет, запах, вкус, консистенцию исследуемого объекта.

Преимуществом органолептических методов является возможность произвести быстрое и массовое исследование объектов, недостатком – их субъективность.

Физические методы чрезвычайно широко применяются в санитарно-гигиенических исследованиях. С их помощью исследуются, например, температура, влажность, скорость движения, электрическое состояние воздуха, барометрическое давление, все виды лучистой энергии, начиная с самых коротковолновых лучей и кончая инфракрасным излучением и радиоволнами различной частоты. Физические методы помогают определить химический состав и структуру веществ. Так, спектрографический анализ позволяет обнаружить ничтожное количество посторонних примесей различных элементов в основном продукте.

Химические методы в санитарно-гигиенических исследованиях используются при изучении химического состава воздуха, воды, почвы; они особенно широко применяются для определения ядохимикатов, различных синтетических веществ и разнообразных токсических веществ, поступающих в биосферу в малых количествах. Важнейшей особенностью химических методов является их высокая чувствительность, позволяющая определять в некоторых случаях миллионные доли миллиграмма вещества на единицу объема воздуха, воды или единицу массы какого-либо продукта.

С помощью химических методов при санитарно-гигиенических исследованиях определяются не только химический состав, свойственный тому или иному объекту, но и примеси, не свойственные их природному составу, которые могут оказывать прямое неблагоприятное воздействие на организм или служить показателем санитарного неблагополучия изучаемого объекта. Например, наличие в воздушной среде оксида углерода, диоксида серы или какого-нибудь другого токсичного вещества указывает на непосредственную опасность для здоровья. Определение же в воздухе жилых помещений повышенного содержания диоксида углерода свидетельствует о санитарном неблагополучии, в частности неудовлетворительной вентиляции помещения.

Биологические методы исследования могут быть разделены на собственно биологические и бактериологические. Под собственно биологическими методами следует понимать такие исследования объектов окружающей среды, в процессе которых определяется наличие микро- и

макроорганизмов и веществ животного и растительного происхождения, характеризующих санитарное состояние объекта.

Примером подобного анализа может служить биологическое исследование воды, заключающееся в изучении населяющих водоемы растительных и животных организмов. При этом главным определяющим моментом является закономерность обитания тех или иных микро- и макроорганизмов в воде водоемов в зависимости от степени ее чистоты.

К биологическим методам относятся также **гельминтологические исследования**, позволяющие выявить жизнеспособные яйца гельминтов в различных объектах окружающей среды (почва, вода), что дает основание судить о степени их фекального загрязнения и непосредственной опасности заражения гельминтами.

Бактериологические методы – это совокупность методов изучения свойств микроорганизмов, определения их систематического положения. Для этого необходимо, прежде всего, изолировать отдельные виды микробов и вырастить их в виде так называемых «чистых культур», а затем идентифицировать, т.е. установить соответствие выделенных микроорганизмов видам, описанным в специальных определителях по морфологическим, тинкториальным, культуральным, биохимическим, антигенным и токсиногенным свойствам.

В практике бактериологический метод исследования объектов окружающей среды часто имеет первостепенное значение, поскольку с его помощью можно не только определять общую обсемененность изучаемого объекта, но также выделять и идентифицировать санитарно-показательные микроорганизмы. Методы бактериологического исследования имеют чрезвычайно важное значение при лабораторных исследованиях питьевой воды, сточных вод, воздуха, почвы, а также других средовых объектов. В практике наиболее часто применяется так называемый краткий санитарный анализ, т.е. определение общего числа колоний микробов и титра кишечной палочки.

Серологические методы служат для идентификации антигена на основании его отношения к данной иммунной сыворотке. Серологические

реакции применяются с целью дополнительной проверки данных, полученных при бактериологических исследованиях. В практике санитарно-гигиенических лабораторий обычно применяются реакции агглютинации, преципитации и связывания комплемента.

Вирусологический метод основан на выделении вирусов и их идентификации с использованием культур клеток или куриных эмбрионов. Определение типа вируса (его идентификация) основано на нейтрализации биологической активности вируса с помощью типоспецифических сывороток. Конечный результат ее может быть установлен на основании следующих признаков: нейтрализация цитопатического действия, нейтрализация реакции гемадсорбции, изменения проявления цветной пробы, задержка (торможение) реакции гемагглютинации, нейтрализация в опыте на животных. Кроме того, для идентификации вирусов применяют методы иммунофлуоресценции, ДНК-ДНК (РНК-РНК)-гибридизации, полимеразной цепной реакции.

Методы исследований, применяемые в лабораторной практике:

1. Оптикоспектральные.

Оптические методы исследования веществ основаны на способности этих веществ порождать оптическое излучение или взаимодействовать с ним.

Фотометрия – совокупность оптических методов и средств измерения фотометрических величин светового потока. Основным понятием фотометрии является поток излучения, смысл которого в мощности переносимого электромагнитного (оптического) излучения.

Спектрофотометрия – определение зависимости фотометрических величин от длины волны излучения.

Спектроскопия или эмиссионный спектральный анализ – определение излучательной способности веществ в зависимости от длины волны излучения.

В лабораторной диагностике широкое применение нашли фотометрические методы количественного анализа, основанные на переводе определяемых компонентов в поглощающие свет соединения с последующим определением их количеств путем измерения светопоглощения растворов.

По окраске растворов окрашенных веществ можно определять концентрацию компонентов при помощи фотоэлектрических приемников оптического излучения (фотоприемников) – приборов, превращающих световую энергию в электрическую. Если измерение ведется без выделения узкого диапазона длин волн, то есть измеряются характеристики всего светового потока, то такой метод анализа часто называется колориметрическим. Если же выделяется характерный для поглощения данным веществом оптический диапазон и измерение проводится на определенной длине волны, тогда говорят о собственно фотометрическом методе анализа. Фотометрический метод является более объективным методом, чем колориметрический, поскольку результаты его меньше зависят от поглощения света другими (интерферирующими) окрашенными веществами.

Фотометрический анализ – один из самых старых и распространенных физико-химических методов, для него требуется относительно простое оборудование, в то же время он характеризуется высокой чувствительностью и возможностью определения большого количества органических веществ. Открытие все новых и новых реагентов, образующих окрашенные соединения с неорганическими ионами и органическими веществами, разработка принципов сопряженных реакций делает в настоящее время применение этого метода почти неограниченным.

Фотометрический метод анализа может применяться для большого диапазона определяемых концентраций. Его используют как для определения основных компонентов различных сложных веществ, так и для определения микропримесей в объектах.

Комбинирование с некоторыми методами разделения и обогащения – хроматографическим, экстракционным – позволяет на несколько порядков повысить чувствительность фотометрических методов.

Фотометрические свойства растворенного вещества характеризуются коэффициентом пропускания T (τ), коэффициентом отражения R (ρ), и коэффициентом поглощения A (α), которые для одного и того же вещества связаны соотношением $T + R + A = 1$.

Определение безразмерных величин T , R и A выполняется с помощью фотометров (приборов для измерения какой-либо фотометрической величины) путем регистрации реакций приемника оптического излучения на соответствующие потоки излучения. При этом в рутинной лабораторной практике принято обозначать приборы, регистрирующие поглощение света веществом, фотометрами, отражение – отражательными фотометрами.

Фотометрические методы применяются также в тех случаях, когда изучается способность веществ рассеивать (нефелометрия) и пропускать излучение (турбидиметрия), переизлучать поглощенное излучение (флуориметрия), изменять степень поляризации излучения при прохождении его через оптически активные вещества (поляриметрия).

Кроме того, одним из важных разделов физической оптики является рефрактометрия, изучающая показатели преломления оптического излучения твердых, жидких и газообразных веществ в зависимости от длины волны излучения.

Названные оптические методы применяются для изучения состояния биологических систем и их изменения в процессах ассоциации-диссоциации, взаимодействия с другими молекулами, образования и распада комплексов фермент-субстрат, антиген-антитело, белок-липид, белок-нуклеиновая кислота; фотофизических и фотохимических процессов и т.д.

Высокая чувствительностью, точность, быстродействие и удобство использования для рутинных исследований определяют широкое применение оптических методов в клинической лабораторной диагностике.

2. Хроматографические.

Впервые хроматография была предложена в 1903 г. русским ученым М.С. Цветом.

В настоящее время является наиболее широко используемым методом исследования объектов окружающей среды.

Хроматография – это динамический метод разделения и определения веществ, основанный на многократном 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 неудерживаемыми, а время их удерживания определяет “мертвое время” колонки).

Хроматографические методы анализа настолько разнообразны, что единой классификации их не существует. Чаще всего используют несколько классификаций, в основу которых положены следующие признаки:

- агрегатное состояние подвижной и неподвижной фаз;
- механизм взаимодействия вещества с сорбентом;
- техника выполнения анализа (способ оформления процесса);
- способ хроматографирования (способ продвижения вещества через колонку);
- цель хроматографирования.

В зависимости от агрегатного состояния фаз различают:

- газовую хроматографию (подвижная фаза – газ или пар);
- жидкостную хроматографию (подвижная фаза – жидкость).

По механизму взаимодействия вещества с сорбентом различают следующие виды хроматографии:

- адсорбционную;
- распределительную;

- ионообменную;
- электронообменную;
- электрофорез;
- гель-хроматографию.

В зависимости от способа оформления процесса различают: колоночную и плоскостную хроматографию. В колоночной хроматографии процесс разделения ведут в колонках, заполненных сорбентом. Плоскостная хроматография включает в себя две разновидности: хроматографию на бумаге и тонкослойную хроматографию на пластинках.

В зависимости от способа хроматографирования различают следующие виды хроматографии:

- элюентная (проявительная) хроматография;
- вытеснительная хроматография;
- фронтальная хроматография.

Чаще всего используется проявительный способ хроматографирования. Он заключается в том, что в непрерывный поток подвижной фазы (элюента) вводят смесь веществ, которые сорбируются лучше элюента. По мере движения элюента через колонку с сорбированными веществами они перемещаются вдоль слоя сорбента с различной скоростью и, наконец, выходят из неё отдельными зонами, разделёнными элюентом.

Вытеснительный способ хроматографирования заключается в том, что в поток подвижной фазы вводят смесь веществ, а затем начинают непрерывно пропускать поток вещества-вытеснителя, которое сорбируется сильнее всех остальных веществ. По мере того, как вытеснитель продвигается по колонке, он постепенно вытесняет из неё (десорбирует) сорбированные компоненты смеси в порядке увеличения их сорбционной способности.

Фронтальный способ хроматографирования заключается в том, что анализируемую смесь веществ непрерывно пропускают через слой сорбента. По мере заполнения колонки веществами они начинают выходить в порядке увеличения их сорбционной способности.

По цели проведения хроматографического процесса различают следующие виды хроматографии: аналитическую хроматографию – самостоятельный метод разделения, качественного и количественного анализа веществ; препаративную хроматографию для выделения чистых веществ из смеси.

Хроматография является важным методом идентификации и определения веществ. Современными хроматографическими методами можно определять газообразные, жидкие и твердые вещества с молекулярной массой от единиц до 10^6 . Выбор конкретных условий проведения хроматографического анализа определяется природой и составом анализируемого объекта. Методы газовой хроматографии, включающие газоадсорбционную и газожидкостную, позволяют анализировать летучие термостабильные вещества с молекулярной массой меньше 400 независимо от их агрегатного состояния. Так, газоадсорбционную хроматографию широко используют для анализа смесей газов и низкокипящих углеводородов, не содержащих активных функциональных групп. Газожидкостная хроматография незаменима в нефтехимии, определении пестицидов, удобрений, лекарственных препаратов и т.д.

Жидкостная хроматография в различных вариантах – это метод разделения и анализа многокомпонентных смесей нелетучих веществ в растворах. Жидкостная хроматография применима для более широкого круга веществ чем газовая, так как большинство соединений не обладает летучестью и термостабильностью.

Следует особо отметить экспрессность хроматографического разделения смесей. Так, при использовании современной безинерционной детектирующей и регистрирующей аппаратуры разделение нескольких компонентов можно осуществить за минуты и даже секунды. Хроматографические методы определения обладают высокой чувствительностью (до 10⁻⁸) и точностью (до 0,5%).

Отличительной особенностью хроматографических методов является их универсальность, то есть возможность использования:

- для очистки веществ;
- концентрирования веществ из сильно разбавленных растворов;

- разделения сложных смесей органических и неорганических веществ;
- идентификации веществ;
- определения количественного состава.

3. Электрохимические. Основаны на электродных реакциях и на переносе электричества через растворы.

Применение электрохимических методов в количественном анализе базируется на использовании зависимостей величин измеряемых параметров электрохимических процессов (разность электрических потенциалов, ток, количество электричества) от содержания определяемого вещества в анализируемом растворе, участвующего в данном электрохимическом процессе.

Электрохимические процессы – такие процессы, которые сопровождаются одновременным протеканием химических реакций и изменением электрических свойств системы, которую в подобных случаях можно назвать электрохимической системой. В аналитической практике электрохимическая система обычно содержит электрохимическую ячейку, включающую сосуд с электропроводящим анализируемым раствором, в который погружены электроды.

Различают две группы электрохимических методов:

а) Методы без наложения внешнего (постороннего) потенциала.

Источником электрической энергии служит сама электрохимическая система, представляющая собой гальванический элемент (гальваническую цепь). К таким методам относятся потенциометрические методы. Электродвижущая сила и электродные потенциалы в такой системе зависят от содержания определяемого вещества в растворе.

б) Методы с наложением внешнего (постороннего) потенциала. К таким методам относятся:

- кондуктометрический анализ – основан на измерении электрической проводимости растворов как функции их концентрации;
- вольтамперметрический анализ – основан на измерении тока как функции приложенной известной разности потенциалов и концентрации раствора;

- кулонометрический анализ – основан на измерении количества электричества, прошедшего через раствор, как функции его концентрации;
- электрогравиметрический анализ – основан на измерении массы продукта электрохимической реакции.

По способу применения электрохимических методов различают прямые и косвенные методы:

А. Прямые методы. Измеряют электрохимический параметр как известную функцию концентрации раствора и по показанию соответствующего измерительного прибора находят содержание определяемого вещества в растворе.

Б. Косвенные методы – это методы титрования, в которых окончание титрования фиксируют на основании измерения электрических параметров системы.

В соответствии с данной классификацией различают, например, прямую кондуктометрию и кондуктометрическое титрование.

Экспресс-методы лабораторного исследования – 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. Прототипом экспресс-метода в химии было использование лакмусовой бумажки для определения кислотно-щелочного состояния среды. Широкое развитие данного метода стало возможным с 50-х годов 20 в. 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 в форме таблеток, гранул, дозированных порошков для определения в биожидкости какого-либо одного вещества, и политесты - комбинированные реактивные полоски (обычно из бумаги), на которых имеется несколько индикаторных зон, предназначенных для исследования 5 и более биохимических параметров одновременно. Результаты анализа могут быть только качественными или позволяют

приблизительно определить концентрацию вещества в исследуемой жидкости, т.е. являются полуколичественными.

Реактивные полоски чувствительны к действию влаги и тепла, поэтому их хранят в плотно закрытых упаковках в прохладном месте; не допускается прикосновение пальцами к зонам индикации. Следует регулярно проводить контроль результатов исследований сравнением их с данными, полученными рутинными методами. Для проведения исследования с помощью экспресс-тестов на индикаторную зону полоски или на таблетку наносят исследуемую жидкость либо погружают таблетку, полоску в исследуемую жидкость. По времени появления окраски, интенсивности цвета или величине окрашенной зоны судят о наличии или отсутствии искомого вещества. Приблизительную количественную оценку его содержания получают сравнением интенсивности окраски индикаторной зоны с цветными бумажными стандартами. Качественные результаты отличаются высокой надежностью, а полуколичественные экспресс-тесты обладают к тому же точностью, достаточной для диагностических лабораторных исследований.

ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

1. Классификация методов исследования объектов окружающей среды.
2. Принцип оптико-спектральных методов.
3. Принцип и применение хроматографических методов.
4. Принцип и применение электрохимических методов исследования.
5. Принцип и применение бактериологических методов исследования.
6. Экспресс-методы исследования.

САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА СТУДЕНТОВ

1. Записать протокол практического занятия с указанием его цели и задач, основных методов исследования окружающей среды.
2. Записать алгоритм бактериологического исследования окружающей среды.

Рекомендуемая литература

Основная литература:

1. Кишкун А. А. Клиническая лабораторная диагностика [Электронный ресурс] : учеб. пособие / Кишкун А. А. - М. : ГЭОТАР-Медиа , 2009 . – Режим доступа: <http://www.studmedlib.ru>

2. Кишкун А. А. Клиническая лабораторная диагностика [Текст] : учеб. пособие / Кишкун А. А. - М. : ГЭОТАР-Медиа , 2010 . - 971 с. : ил.

3. Кишкун А. А. Руководство по лабораторным методам диагностики [Электронный ресурс] : [учеб. пособие] для врачей и фельдш., оказывающих первич. мед.-сан. помощь / Кишкун А. А.; Ассоц. мед. о-в по качеству . - М. : ГЭОТАР-Медиа , 2009. – 780 с. : ил. – Режим доступа: <http://www.studmedlib.ru>

4. Биохимия [Электронный ресурс] : учебник / под ред. Е.С.Северина; [авт. кол.: Л.В.Авдеева и др.] . - 5-е изд. . - М. : ГЭОТАР-Медиа , 2009 . - 759с.:ил. . - Режим доступа: <http://www.studmedlib.ru>

5. 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.studmedlib.ru>

Дополнительная литература:

1. Цыганенко А. Я. Клиническая биохимия [Текст] : учеб. пособие / Цыганенко А. Я., Жуков В. И., Мясоедов В. В. и др. . - М. : Триада-Х , 2002 . - 500 с.: ил.

2. Маршалл В. Дж. Клиническая биохимия [Текст] / Маршалл В. Дж. ; Пер. с англ. под ред. Н. И. Новикова . - 2-е изд., перераб. и доп. . - М. : БИНОМ; СПб.: Нев. Диалект , 2002 . - 383 с.: ил.

3. Вебер В. Р. Лабораторные методы исследования. Диагностическое значение [Текст] : учеб. пособие / Вебер В. Р., Швецова Т. П. . - М. : МИА , 2008 . - 496 с. : ил.

4. Никулин Б. А. Пособие по клинической биохимии [Текст] : для системы послевуз. проф. образования / Никулин Б. А. ; [под ред. Л. В. Акуленко] . - М. : ГЭОТАР-Медиа , 2007 . - 250 с. : ил.

5. Новиков Д. А. Статистические методы в медико-биологическом эксперименте (типовые случаи) [Текст] / Новиков Д. А., Новочадов В. В. ; РАМН, Волг. науч. центр РАМН и Адм. Волг. обл. . - Волгоград : Изд-во ВолГМУ , 2005 . - 84 с.: ил.

Тестовые задания для самоконтроля

Выберите один правильный ответ

01. ОСНОВНЫЕ ФАЗЫ ФАГОЦИТОЗА:

- 1) положительный хемотаксис, адгезия, захват объекта, переваривание объекта и обработка антигена для презентации
- 2) альтерация, экссудация, пролиферация
- 3) скольжение, качение, экстравазация
- 4) рецепторное взаимодействие и дегрануляция

02. К КЛЕТКАМ-ЭФФЕКТОРАМ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИММУННОЙ ЗАЩИТЫ ОТНОСЯТ:

- 1) нейтрофилы
- 2) Т-лимфоциты
- 3) макрофаги
- 4) НК-клетки

03. СИНТЕЗ БЕЛКОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ ОСУЩЕСТВЛЯЮТ:

- 1) печень
- 2) селезенка
- 3) мышцы
- 4) тонкий кишечник

04. КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЩЕГО БЕЛКА СЫВОРОТКИ ОСНОВАНЫ:

- 1) на определении количества белкового азота, образующегося при разрушении аминокислот, входящих в состав белков
- 2) на высушивании белков до постоянной массы и взвешивании на аналитических весах
- 3) на снижении растворимости белков и образовании суспензии взвешенных частиц под воздействием различных агентов
- 4) на измерении степени светопоглощения в ультрафиолетовой области при двух длинах волн с дальнейшим расчетом по специальным формулам
- 5) на способности растворов белка к преломлению светового потока
- 6) на цветных реакциях белков с хромоген-образующими реактивами или на неспецифическом связывании красителя

05. ГОРМОН, ПОВЫШАЮЩИЙ УРОВЕНЬ САХАРА В КРОВИ:

- 1) инсулин
- 2) глюкагон
- 3) паратгормон
- 4) альдостерон

06. О ЧЕМ ГОВОРИТ УВЕЛИЧЕНИЕ УРОВНЯ АМИЛАЗЫ В СЫВОРОТКЕ:

- 1) холецистит
- 2) панкреатит
- 3) гепатит
- 4) инфаркт миокарда

07. ПОРАЖЕНИЕ МИОКАРДА, ВЫЗВАННОЕ НАРУШЕНИЕМ КРОВОТОКА В КОРОНАРНЫХ АРТЕРИЯХ:

- 1) артериальная гипертензия
- 2) атеросклероз
- 3) ишемическая болезнь сердца

08. ПРАВИЛА ВЗЯТИЯ КРОВИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА:

- 1) забор крови утром натощак через 12-14 часов после приема пищи
- 2) перед исследованием пациент 2 недели придерживается вегетарианской диеты
- 3) вечером накануне взятия крови исключить прием углеводной пищи

09. АНТИКОАГУЛЯНТОМ ЯВЛЯЕТСЯ:

- 1) плазминоген
- 2) фактор III
- 3) антитромбин III
- 4) стрептокиназа
- 5) АДФ

10. КОАГУЛОГРАММОЙ НАЗЫВАЕТСЯ:

- 1) направление на исследование системы гемостаза
- 2) определение протромбинового времени
- 3) исследование агрегационных свойств тромбоцитов

- 4) набор гемокоагулологических тестов, отвечающих на поставленную клиницистом задачу
11. рН ОЗНАЧАЕТ:
- 1) концентрацию ионов водорода
 - 2) символ, являющийся отрицательным десятичным логарифмом молярной концентрации ионов водорода
 - 3) концентрацию гидроксильных групп
 - 4) отношение концентрации H^+ к концентраций гидроксильных групп
 - 5) напряжение ионов водорода
12. МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ АЦИДОЗ РАЗВИВАЕТСЯ ПРИ:
- 1) истерии
 - 2) диабете
 - 3) стенозе привратника
 - 4) гипокалиемии
 - 5) отеках
13. МЕТОД АМПЛИФИКАЦИИ ДНК IN VITRO НАЗЫВАЮТ:
- 1) секвенирование
 - 2) полимеразная цепная реакция
 - 3) рестрикция
 - 4) отжиг
14. ДЛЯ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИИ АМПЛИФИЦИРОВАННОЙ ДНК ИСПОЛЬЗУЮТ КРАСИТЕЛЬ:
- 1) метилоранж
 - 2) конго красный
 - 3) этидиум бромид
 - 4) гематоксилин
15. ВОЗБУДИТЕЛЕМ БАКТЕРИАЛЬНОГО ВАГИНОЗА ЯВЛЯЕТСЯ:
- 1) микоплазма
 - 2) уреоплазма
 - 3) гарднерелла
 - 4) кандида
16. ДЛЯ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ИСПОЛЬЗУЮТ СЛЕДУЮЩИЙ МАТЕРИАЛ:
- 1) амниоцентез
 - 2) кровь пациента

- 3) мочу пациента
 - 4) слюну пациента
17. ХОРОШИЙ МАЗОК ДОЛЖЕН БЫТЬ:
- 1) толстым
 - 2) максимально тонким
 - 3) комковатым
 - 4) волнообразным
18. ДЛЯ ХРАНЕНИЯ ЧИСТЫХ ПРЕДМЕТНЫХ СТЕКОЛ ИСПОЛЬЗУЮТ:
- 1) этиловый спирт
 - 2) метиловый спирт
 - 3) смесь Никифорова
 - 4) диэтиловый эфир
19. СВОЙСТВО КЛЕТОК И ТКАНЕЙ ОКРАШИВАТЬСЯ В ЦВЕТОВОЙ ТОН, ОТЛИЧАЮЩИЙСЯ ОТ ЦВЕТА САМОГО КРАСИТЕЛЯ:
- 1) ацидофилия
 - 2) базофилия
 - 3) метахромазия
 - 4) ахромазия
20. К КИСЛЫМ КРАСИТЕЛЯМ ОТНОСЯТ:
- 1) гематоксилин
 - 2) эозин
 - 3) азур
 - 4) конго красный

ОТВЕТЫ НА ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

№ тестового задания	№ ответа
01	1
02	2
03	1
04	6
05	2
06	2
07	3
08	1
09	3
10	4
11	2
12	2
13	2
14	3
15	3
16	1
17	2
18	3
19	3
20	2